



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

REV. 3 del 25.07.2021

Sorveglianza di SARS-CoV-2 in reflui urbani

Protocollo progetto SARI

A cura di:

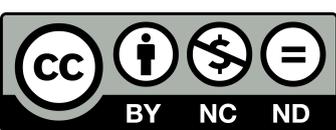
Giuseppina La Rosa, Lucia Bonadonna

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	3
1. SCOPO.....	3
2. TERMINI E DEFINIZIONI.....	4
3. STRUMENTAZIONE, MATERIALI E REAGENTI.....	5
4. CAMPIONAMENTO.....	7
5. CONCENTRAZIONE DEI CAMPIONI	8
6. ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI	9
7. RILEVAZIONE DI SARS-COV-2 MEDIANTE REAL-TIME RT-PCR	10
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	24
Acquisto di reagenti e materiali	26

SORVEGLIANZA NAZIONALE SU SARS-COV-2 IN REFLUI URBANI

1. 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 determinazione di SARS-CoV-2 da utilizzare nell'ambito della sorveglianza di SARS-CoV-2 e delle sue varianti nelle acque reflue. L'obiettivo è quello di applicare criteri di analisi comuni al fine di ottenere risultati confrontabili, in conformità con le specifiche tecniche delineate nella Raccomandazione 2021/472 della Commissione Europea. Nella revisione di questa guida (rev.3) ci si è focalizzati principalmente sui siti di campionamento e sulla fase di real-time RT-qPCR, introducendo le specifiche per trasformare le determinazioni di tipo qualitativo descritte nella rev.2 in analisi di tipo quantitativo. Sono stati inoltre inseriti i diversi controlli di qualità (negativo di estrazione, controllo dell'inibizione, controllo dell'efficienza di concentrazione/estrazione, etc.) esplicitati all'interno della citata Raccomandazione 2021/472.

2. TERMINI E DEFINIZIONI

2.1. Quantificazione di SARS-CoV-2

Stima del numero di copie genomiche di SARS-CoV-2 in un volume predeterminato (1 litro) di refluo urbano.

2.2. Virus controllo di processo

Virus aggiunto al campione (o ad una sua porzione) prima della fase della concentrazione per stimare l'efficienza di concentrazione/estrazione. Per tale scopo posso essere utilizzati diversi tipi di virus (es. Mengo virus, Norovirus Murino, etc.). L'efficienza di concentrazione/estrazione deve essere verificata per ogni campione.

2.3. RNA del virus controllo di processo

RNA estratto dal virus controllo di processo per la costruzione della curva standard del controllo di processo e la stima dell'efficienza di concentrazione/estrazione.

2.4. Controllo negativo di processo

Campione privo del target analitico (es. acqua distillata sterile), sottoposto a tutte le fasi del metodo (concentrazione, estrazione degli acidi nucleici e procedure di rilevazione) per monitorare eventi di contaminazione.

2.5. Controllo negativo di estrazione

Controllo privo del RNA target di SARS-CoV-2 sottoposto alle fasi di estrazione degli acidi nucleici e alle procedure di rilevazione per monitorare eventi di contaminazione.

2.6. Controllo negativo di PCR

Reazione di real-time PCR contenente acqua per biologia molecolare usata per monitorare la presenza di contaminazioni nei reattivi di PCR

2.7. Controllo positivo di PCR

Reazione di real-time PCR contenente RNA di controllo usata per verificare il corretto funzionamento della reazione di amplificazione in real-time RT-qPCR

2.8. RNA di controllo

RNA di sintesi contenente la sequenza target di SARS-CoV-2 utilizzato nella real-time RT-qPCR con i seguenti scopi: a) controllo positivo di PCR (2.6); b) verifica dell'efficienza della PCR mediante analisi di diluizioni seriali di uno standard a RNA; c) controllo esterno di inibizione (RNA-EC) della PCR (2.8). L'uso del RNA come controllo positivo e per la verifica dell'efficienza di PCR deve essere effettuato ad ogni corsa di PCR. La presenza di inibizione deve essere verificata per ogni campione.

2.9. DNA a doppio filamento (dsDNA)

DNA di sintesi contenente la sequenza target di SARS-CoV-2, opportunamente quantizzato, utilizzato nella real-time RT-qPCR in diluizioni seriali per la costruzione della curva standard di PCR e per la stima della quantità di virus nel campione.

3. 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.

3.1. 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
- Micropipetta (P100)
- 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

Materiali di riferimento:

Virus controllo di processo¹

3.2. Estrazione degli acidi nucleici

Strumentazione e materiali:

- Piattaforma per estrazione semi-automatica degli acidi nucleici (es. MiniMag, eGeneUP, etc)
- Set di micropipette (P100, P1000)
- Puntali con filtro (P100, P1000)
- Sistema di aspirazione per piattaforma MiniMag (opzionale)
- Magnete per tubi falcon e per provette eppendorf (opzionale)
- Thermomixer per le fasi di eluizione delle piattaforme MiniMag e eGeneUP (opzionale)

Reagenti:

Buffer di lisi a base di guanidina tiocianato

¹ Per l'esecuzione della procedura, l'ISS può fornire due tipologie di virus controllo di processo: a) Mengovirus, un Cardiovirus murino prodotto mediante propagazione in coltura cellulare del ceppo attenuato vaccinale vMC0. Il ceppo vMC0 è un Microrganismo Geneticamente Modificato (MOGM) il cui impiego confinato richiede autorizzazione; b) Norovirus Murino, Calicivirus murino prodotto mediante propagazione in coltura cellulare del ceppo MNV-1. Il ceppo MNV-1 è un agente biologico di classe II.

Set di buffer di lavaggio

Silica magnetica

Buffer di eluizione degli acidi nucleici (es. TE buffer, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)

Inibitore delle RNAsi

3.3. 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
- Cappa per preparazione mix PCR
- Cappa o ambiente dedicato per la dispensazione dei campioni e degli standard
- Congelatore -20°C
- Congelatore -70/-80°C
- Piastre o provette per real-time PCR
- Tappi o fogli sigillanti per piastre
- Centrifuga per piastre da PCR (opzionale)

Reagenti:

Inibitore delle RNAsi

TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)

Kit di One Step Real-Time RT-PCR (vedi procedura e Annex)

Oligonucleotidi e sonde marcate (vedi procedura e Annex)

Materiali di riferimento:

RNA di sintesi di controllo contenente la sequenza target di SARS-CoV-2

dsDNA contenente la sequenza target di SARS-CoV-2

4. 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. In linea generale, si raccomanda il monitoraggio con frequenza possibilmente bisettimanale dei comuni con più di 150.000 abitanti residenti, in attuazione della Raccomandazione (UE) 2021/472 della Commissione del 17 marzo 2021, e il monitoraggio con frequenza settimanale dei comuni con un numero di abitanti residenti compreso tra 50.000 e 150.000. Laddove in ambito regionale e/o di provincia autonoma non sussistano aggregati urbani con un numero di abitanti residenti maggiore di 50.000, il monitoraggio dovrà essere effettuato su almeno due siti identificati come maggiormente rappresentativi rispetto alla popolazione della regione/provincia autonoma. Inoltre, ove rilevante per il monitoraggio di particolari zone a vocazione turistica, o particolari zone a rischio identificate dalla sorveglianza epidemiologica, è tuttavia possibile effettuare prelievi ed eseguire le analisi su impianti in comuni di dimensioni inferiori rispetto a quanto indicato. Il campionamento va eseguito da personale adeguatamente formato, in genere gli operatori all'interno dell'impianto di depurazione che già provvedono a campionare per le analisi interne di routine. 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.

4.1. Campionamento, frequenza di prelievo, conservazione dei campioni

I campioni di refluo grezzo (100 ml) vanno raccolti con frequenza settimanale o bisettimanale 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. I campioni devono essere conservati 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 processata tempestivamente in modo da poter fornire il risultato preferibilmente entro 48 ore dal prelievo, come previsto dalla Raccomandazione.

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 casi eccezionali 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.

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

4.2. Trasporto dei campioni

Qualora fosse prevista una spedizione dei campioni di refluo urbano via corriere espresso verso i laboratori di riferimento che effettuano le analisi, 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. I contenitori termici devono essere disinfettati con ipoclorito di sodio al 10% o etanolo al 70% prima dell'uso. I campioni possono essere spediti con all'interno siberini refrigerati di adeguato numero e dimensioni con consegna entro le 24 ore. Qualora fosse prevista una spedizione dei campioni di RNA estratti, è necessario che i campioni siano spediti in ghiaccio secco con consegna entro le 24 ore.

5. 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.

5.1. 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. Scongela una quantità idonea di virus controllo di processo (2.2) per l'analisi di tutti i campioni della sessione analitica; conservare una aliquota da 100 µl di virus di controllo di processo per l'estrazione del suo RNA (2.3);
6. Aggiungere 100 µl di virus di controllo di processo² (2.2);
7. Centrifugare i campioni a +4°C, 4500 × g per 30 min;
8. 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;
9. 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;
10. 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;
11. 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;
12. Bilanciare a due a due le provette e posizzionarle 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);
13. Centrifugare i campioni a +4 °C, 12000 × g per 2 ore;
14. 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.
15. Per eliminare eventuali piccole quantità di liquido surnatante rimanente, se il pellet è

² Laddove venissero utilizzati sistemi/kit commerciali per la determinazione dell'efficienza di estrazione dal campione, seguire le istruzioni del fornitore.

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 ed andare perso nelle successive fasi del protocollo) e centrifugare a 12000 × 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, risospendere 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.

Nota: Ai fini dell'assicurazione della qualità del dato, contestualmente ai campioni analitici, dovrebbe essere effettuato un controllo negativo di processo (vedi 2.4). La frequenza di esecuzione di questo controllo deve essere stabilita dal laboratorio in funzione della propria analisi del rischio di contaminazione e tenendo in considerazione le specifiche modalità di organizzazione del lavoro.

6. 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 µl.

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. Altre piattaforme di estrazione degli acidi nucleici possono essere utilizzate, mantenendo il volume di 100 µl per l'eluizione del RNA.

6.1. Procedura di estrazione

- Controllo negativo di estrazione (2.4): aggiungere 100 µL di acqua per biologia molecolare a 2 mL di buffer di lisi;
- Estrazione del RNA del virus controllo di processo (2.3)³: aggiungere 100 µL di virus controllo di processo a 2 mL di buffer di lisi;
- Campioni: risospendere il pellet di cui al punto 14 della sezione "Procedura di concentrazione" in 2

³ L'estrazione del RNA del virus controllo di processo ad ogni sessione analitica non è indispensabile: laddove il laboratorio utilizzi sempre lo stesso stock di virus controllo di processo, è possibile effettuare l'estrazione del RNA del virus controllo di processo e conservare tale RNA a -80°C in aliquote per singolo uso (i.e. non effettuando ripetuti scongelamenti del campione). Laddove venissero utilizzati sistemi/kit commerciali per la determinazione dell'efficienza di concentrazione/estrazione dal campione, seguire le istruzioni del fornitore anche per quanto concerne l'estrazione del RNA del virus controllo di processo.

mL di buffer di lisi spipettando accuratamente dal lato della provetta in cui è stato segnato il pellet (che potrebbe essere invisibile);

- Attendere 20 minuti per la lisi virale e il rilascio degli acidi nucleici;
- Aggiungere 50 µL di silice magnetica e mescolare per distribuirla 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 magnetico⁴ 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;
- Risospingere la silice con il primo buffer di lavaggio (400 µl) e trasferire la sospensione nelle provette tipo eppendorf utilizzate per la piattaforma MiniMag;
- Completare le fasi successive secondo istruzioni della ditta.

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.

Altre piattaforme per estrazione degli acidi nucleici:

Procedere secondo le istruzioni del produttore

Dopo l'estrazione degli acidi nucleici si raccomanda l'utilizzo per i campioni di un kit per l'eliminazione degli inibitori (ad esempio OneStep PCR Inhibitor Removal Kits, Zymo Research, o prodotti similari). 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 del RNA). Non è necessario l'utilizzo di kit di rimozione degli inibenti di PCR per il controllo negativo di estrazione e/o per l'RNA del virus controllo di processo.

Nota: Gli RNA dei campioni devono essere conservati a -70/-80°C. Gli RNA costituiscono il "campione di archivio" da inviare all'ISS per eventuali prove di conferma o ulteriori determinazioni. Laddove possibile si consiglia di aggiungere agli RNA 1 U/µL di inibitore delle RNAsi, che blocca l'attività di una vasta gamma di ribonucleasi per proteggere l'RNA dalla digestione. Tale aggiunta consentirà il mantenimento ottimale dei acidi nucleici destinati alle analisi per la ricerca delle varianti di SARS-CoV-2.

7. RILEVAZIONE DI SARS-COV-2 MEDIANTE REAL-TIME RT-PCR

La presente procedura prevede la determinazione quantitativa di SARS-CoV-2 mediante reazione di real-time RT-qPCR one-step (i.e. retrotrascrizione del RNA virale seguita dalla amplificazione genica in unica reazione).

⁴ 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 accordo con le indicazioni della Raccomandazione 2021/472 della Commissione Europea il metodo di determinazione include i seguenti elementi:

- a) analisi quantitativa del target;
- b) applicazione di un ciclo soglia (*C_q* cutoff) per la determinazione della presenza del target <40;
- c) analisi dei campioni in doppio (i.e. 2 repliche/campione);
- d) verifica dell'efficienza di concentrazione/estrazione;
- e) verifica di assenza di inibizione significativa;
- f) presenza di uno standard a RNA sintetico in 3 diluizioni seriali e 3 repliche;
- g) presenza di controlli positivi e negativi di PCR;
- h) analisi di un controllo negativo di estrazione

Il presente protocollo e i suoi Annex descrivono una modalità di esecuzione delle determinazioni quantitative di SARS-CoV-2 mediante determinazione dell'ORF-1ab (nsp14) del virus, in accordo con le indicazioni della Raccomandazione 2021/472 della Commissione Europea. Metodi alternativi possono essere utilizzati purché rispondenti alle indicazioni sopra elencate.

Ai fini dell'ottemperanza ai requisiti della Raccomandazione 2021/472 della Commissione Europea è altresì richiesta la partecipazione a prove valutative (i.e. proficiency tests).

7.1. Analisi del virus target

- Preparare diluizioni 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} del dsDNA in TE buffer pH 8.0
- Preparare diluizioni 10^{-1} e 10^{-2} del RNA di controllo in TE buffer pH 8.0

Preparare la mix di real-time RT-qPCR per un numero di reazioni sufficienti ad eseguire tutte le determinazioni di seguito elencate e distribuire, in ogni pozzetto, 20 ± 1 μ l di mix.

Le modalità di esecuzione della real-time RT-qPCR per la determinazione di SARS-CoV-2 mediante ricerca di ORF-1ab, nsp14 sono riportate nell'Annex 1. L'Annex 2 fornisce uno schema esemplificativo della modalità di predisposizione di una plate per la determinazione.

Per ogni campione preparare:

- 2 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di RNA del campione
- 1 reazione con 5 ± 0.5 μ l di RNA del campione e 1 ± 0.1 μ l di RNA di controllo non diluito (10^0) per l'esecuzione del controllo esterno di inibizione

Per l'RNA di controllo preparare:

- 3 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di RNA di controllo non diluito (10^0)
- 3 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di RNA di controllo diluizione 10^{-1}
- 3 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di RNA di controllo diluizione 10^{-2}
- 1 reazione con 5 ± 0.5 μ l di acqua per biologia molecolare e 1 ± 0.1 μ l di RNA di controllo non diluito (10^0) per l'esecuzione del controllo esterno di inibizione

Per il dsDNA preparare:

- 2 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di dsDNA non diluito (10^0)
- 2 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di dsDNA diluizione 10^{-1}
- 2 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di dsDNA diluizione 10^{-2}
- 2 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di dsDNA diluizione 10^{-3}
- 2 reazioni con 5 ± 0.5 μ l di dsDNA diluizione 10^{-4}

Per i controlli negativi preparare:

- 2 reazioni con 5 ± 0.5 μL di acqua per biologia molecolare (controllo negativo di PCR)
- 2 reazioni con 5 ± 0.5 μL di controllo negativo di estrazione

Nota 1: le concentrazioni del dsDNA di controllo fornito dall'ISS (dsDNA SARS-CoV-2 nsp14), espresse in copie genomiche/ μL di acido nucleico testato, sono indicate nei relativi certificati di sintesi.

Nota 2: le concentrazioni approssimative del RNA di controllo fornito dall'ISS (RNA SARS-CoV-2 nsp14), espresse in copie genomiche/ μL di acido nucleico testato, sono indicate nei relativi certificati di sintesi.

Nota 3: le tre diluizioni seriali in triplice reazione di RNA di controllo sono state incluse nella presente procedura in ottemperanza con i requisiti tecnici definiti nella Raccomandazione 2021/472. Tuttavia, in considerazione della maggiore stabilità del dsDNA rispetto al ssRNA e ai fini della garanzia della qualità del dato analitico, si è preferito adottare per la quantizzazione di SARS-CoV-2, una curva standard a dsDNA. Pertanto, nella presente procedura, le suddette reazioni, sono utilizzate solo per la verifica dell'efficienza della PCR, e non per la quantizzazione del target analitico. Con il progredire della sorveglianza e l'acquisizione di dati nell'ambito della sorveglianza SARI, verrà valutata l'opportunità di ridurre il numero delle reazioni da eseguire sull' RNA di controllo.

7.2. Analisi del virus controllo di processo

- Preparare diluizioni 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} del RNA del virus controllo di processo in TE buffer pH 8.0

Preparare la mix di real-time RT-qPCR per un numero di reazioni sufficienti ad eseguire tutte le determinazioni di seguito elencate e distribuire, in ogni pozzetto, 20 ± 1 μL di mix.

Le modalità di esecuzione della real-time RT-qPCR per la determinazione del virus controllo di processo fornito dall'ISS sono riportate nell'Annex 1. L'Annex 2 fornisce uno schema esemplificativo della modalità di predisposizione di una plate per la determinazione.

Per ogni campione preparare:

- 1 reazione con 5 ± 0.5 μL di RNA del campione

Per l'RNA del virus controllo di processo preparare:

- 1 reazione con 5 ± 0.5 μL di RNA del virus controllo di processo non diluito (10^0)
- 1 reazione con 5 ± 0.5 μL di RNA del virus controllo di processo diluizione 10^{-1}
- 1 reazione con 5 ± 0.5 μL di RNA del virus controllo di processo diluizione 10^{-2}
- 1 reazione con 5 ± 0.5 μL di RNA del virus controllo di processo diluizione 10^{-3}

Per i controlli negativi preparare:

- 1 reazione con 5 ± 0.5 μL di acqua per biologia molecolare (controllo negativo di PCR)
- 1 reazione con 5 ± 0.5 μL di controllo negativo di estrazione

Nota 1: le concentrazioni del virus controllo di processo non sono necessarie ai fini della determinazione del recupero, che viene effettuato come analisi relativa. A tale scopo è sufficiente indicare "100" come valore di riferimento del virus controllo di processo non diluito (10^0), e "10", "1", "0.1" per gli RNA del virus controllo di processo rispettivamente nelle diluizioni 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

Nota 2: l'Annex 3 presenta un approccio alternativo per la determinazione dell'efficienza di

concentrazione/estrazione e dell'inibizione di PCR in reazione multiplex.

7.3. Interpretazione dei risultati

Le threshold di PCR devono essere poste nell'area dove le curve di amplificazione (rappresentate in visualizzazione logaritmica) sono parallele (fase esponenziale dell'amplificazione).

Tutte le curve di amplificazione devono essere controllate per identificare eventuali risultati falso-positivi (reazioni con valori non nulli di Cq associati a segnali non esponenziali). Le matrici ambientali possono occasionalmente mostrare un'elevata fluorescenza basale e determinare una deriva (aumento non esponenziale) della stessa. Per l'interpretazione dei risultati è pertanto necessario controllare visivamente che le curve di fluorescenza mostrino andamento esponenziale.

Sono considerati positivi i campioni con valore di $Cq \leq 40$.

Curve standard ottimali per la quantificazione di SARS-CoV-2 e per il calcolo dell'efficienza di concentrazione/estrazione dovrebbero avere slope compresi fra -3.1 e -3.6 e un coefficiente di correlazione di Pearson (R^2) ≥ 0.98 . Laddove alcuni punti deviassero dalla curva standard ottenuta (presenza di *outliers*) è possibile la rimozione di tali punti per migliorare i valori di slope e/o di R^2 . Tale rimozione può riguardare fino a due punti della curva standard a dsDNA e fino ad un punto della curva standard del virus controllo di processo.

Al fine di agevolare l'interpretazione dei risultati, la presente procedura è corredata di un foglio di calcolo Excel per l'esecuzione dei calcoli inerenti alla verifica dell'inibizione, l'efficienza di concentrazione/estrazione, la verifica dell'efficienza di PCR, e la concentrazione di SARS-CoV-2 nel campione (espressa in copie genomiche / L di refluo). I laboratori sono invitati a mantenere, insieme alla documentazione delle analisi condotte, copia dei report analitici prodotti dagli strumenti di real-time e copia del foglio di calcolo compilato.

7.4. Verifica dell'inibizione di PCR

La verifica di inibizione della PCR viene effettuata come parametro di qualità delle determinazioni. Non si effettua correzione dei risultati di quantizzazione in base ai livelli di inibizione del campione.

Per la verifica dell'inibizione si confronta il valore di Cq della reazione contenente il campione addizionato con 1 μ l di RNA di controllo con il valore di Cq della reazione contenente acqua per biologia molecolare addizionata con 1 μ l di RNA secondo la seguente formula:

$$\Delta Cq = Cq (\text{campione} + \text{RNA di controllo}) - Cq (\text{acqua} + \text{RNA di controllo})$$

Il campione è considerato accettabile se $\Delta Cq \leq 2$ (corrispondente ad una inibizione della PCR del 75%).

In presenza di valori di $\Delta Cq > 2$ è necessario effettuare una purificazione del RNA del campione ripetendo la procedura di rimozione degli inibenti mediante kit di rimozione degli inibenti di PCR. E' possibile, in alternativa, ripetere le determinazioni di real-time RT-qPCR utilizzando diluizioni del campione (es. diluizione 1:2, 1:5 o 1:10).

7.5. Calcolo dell'efficienza di concentrazione/estrazione

La verifica di efficienza di concentrazione/estrazione viene effettuata come parametro di qualità delle determinazioni. Non si effettua correzione dei risultati di quantizzazione in base ai livelli di recupero dal campione.

Per la verifica dell'efficienza di concentrazione/estrazione del virus controllo di processo si confronta il valore di Cq della reazione contenente il campione con il valore di Cq della reazione contenente l'RNA del virus controllo di processo non diluito secondo la seguente formula:

$$\text{Efficienza di concentrazione/estrazione (\%)} = 10^{(\Delta Cq/m)} \times F \times 100$$

dove

$\Delta Cq = Cq$ (campione) - Cq (RNA del virus controllo di processo non diluito)

m = slope della curva standard del virus controllo di processo

F = frazione del campione iniziale sottoposta al processo di concentrazione ed estrazione. Per campioni processati secondo quanto descritto nel § 5.1 (i.e. aggiunta del virus controllo di processo a 45 mL di campione e, successivamente alla centrifugazione, recupero di 40 mL), tale fattore equivale a 1.125.

Il campione è considerato accettabile se l'efficienza di concentrazione/estrazione è $\geq 1\%$.

In presenza di valori di efficienza di concentrazione/estrazione $< 1\%$ non è possibile considerare accettabile l'esito analitico e il campione dovrebbe essere ritestato a partire dalla fase di concentrazione (§5.1).

In particolare, in presenza di un esito analitico negativo, una bassa efficienza di concentrazione/estrazione non consente di convalidare come negativo il campione, essendo tale esito potenzialmente influenzato dal ridotto recupero (i.e. esito falso-negativo).

In presenza di un campione che, nonostante il recupero non idoneo, risulti positivo, non è possibile accettare l'esito della quantizzazione; è tuttavia possibile esprimere un risultato di tipo qualitativo (i.e. rilevazione del virus).

Nota: laddove i campioni risultassero inibiti secondo quanto descritto al § 7.4, anche le determinazioni del virus controllo di processo risulteranno negativamente influenzate dalla presenza di inibenti. E' pertanto necessario operare, anche per questa determinazione, le medesime procedure di mitigazione dell'inibizione (i.e. ripetizione della purificazione del RNA o analisi del campione in diluizione).

7.6. Verifica dell'efficienza della PCR mediante standard a RNA

La verifica dell'efficienza della PCR mediante standard a RNA viene effettuata come parametro di qualità delle determinazioni. Il materiale standard a RNA non viene utilizzato per la quantizzazione del target analitico e non si effettua correzione dei risultati di quantizzazione in base all'efficienza di PCR desumibile dallo standard a RNA.

La verifica dell'efficienza di PCR è condotta con tre modalità:

a) Verificare la presenza di segnale positivo in tutte le repliche analitiche testate e, in particolare, in tutte le repliche del RNA di controllo diluizione 10^{-2} . Tale controllo consente di valutare rapidamente le prestazioni della real-time RT-PCR in presenza di concentrazioni ridotte di RNA target.

b) Calcolare l'efficienza della RT-PCR come segue:

- per ciascuna diluizione, calcolare il Cq medio
- calcolare la *covarianza* della seguente matrice:

1	Cq medio RNA di controllo diluizione 10^{-2}
2	Cq medio RNA di controllo diluizione 10^{-1}
3	Cq medio RNA di controllo non diluito (10^0)

- calcolare l'efficienza della reazione di amplificazione applicando la formula

$$E_{RT-PCR} (\%) = 10^{(-1/covarianza)} - 1 \times 100$$

c) Calcolare il rapporto fra l'efficienza di amplificazione della sequenza target a ssRNA (E_{RT-PCR}) e l'efficienza di amplificazione della sequenza target a dsDNA (E_{PCR}) dividendo la *covarianza* di cui al punto b) per lo slope della curva standard a dsDNA. Tale calcolo consente di valutare se sussiste una sostanziale differenza fra l'efficienza della reazione di retrotrascrizione seguita da PCR e l'efficienza della sola reazione di PCR.

L'amplificazione è considerata accettabile se:

- è verificata la presenza di segnale positivo in tutte le repliche analitiche di RNA di controllo testate
- l'efficienza della reazione di amplificazione è $\geq 90\%$
- il rapporto E_{RT-PCR} / E_{PCR} è compreso fra 0.9 e 1.1

Si consiglia inoltre di verificare che, nel corso del tempo, i valori di Cq medio del RNA di controllo si mantengano costanti. Un repentino incremento dei valori di Cq medio del RNA di controllo potrebbero essere indicativi di un problema nei reagenti di PCR o della degradazione del RNA stesso a causa di RNAsi presenti nell'ambiente e/o nei materiali di lavoro.

Nota: Poiché le tre modalità di analisi sono informative rispetto a diversi aspetti dell'efficienza della reazione di RT-PCR, il mancato raggiungimento di tutti i criteri di cui sopra non comporta necessariamente l'invalidità degli esiti analitici ottenuti, ma richiede di effettuarne una valutazione critica e di valutare i fattori che potrebbero aver influenzato le reazioni (es. qualità e stato di conservazione dei reagenti, proporzionalità delle diluizioni seriali, potenziale presenza di RNAsi, etc).

7.7. Quantificazione di SARS-CoV-2 nel campione

Per ogni campione e per ciascuna replica di ogni campione, calcolare la concentrazione di SARS-CoV-2 in copie genomiche / μL di RNA, facendo riferimento per la quantizzazione alla curva a dsDNA. Tale dato viene normalmente fornito dal software dell'apparecchio di real-time PCR. Abbastanza comunemente il software determina automaticamente anche il valore medio per le determinazioni in replica. Laddove tale funzione non fosse presente, operare la media matematica delle concentrazioni osservate nelle due repliche di ciascun campione.

Calcolare la concentrazione di SARS-CoV-2 in copie genomiche / L di refluò come segue:

$$\text{SARS-CoV-2 (c.g./L refluò)} = C \times 100 \times 25$$

dove

C = copie genomiche / μL di RNA

100 = volume totale del RNA del campione estratto

25 = fattore di proporzione fra quantità analizzata e volume di riferimento (1 L)

ANNEX 1

Real-time RT-qPCR per la determinazione di SARS-CoV-2 mediante ricerca di ORF-1ab, nsp14 (Protocollo standard)

Primers e sonda per la determinazione di SARS-CoV-2 ORF-1ab (nsp14)

2297 (CoV-2-F): ACA TGG CTT TGA GTT GAC ATC T

2298 (CoV-2-R): AGC AGT GGA AAA GCA TGT GG

2299 (CoV-2-P): FAM-CAT AGA CAA CAG GTG CGC TC-MGBEQ

Sonda marcata 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' MGB (minor groove binder) EQ (Eclipse Quencher*)

Reference: [10]

* Eclipse Quencher è un nonfluorescent quencher a brevetto ELITechGroup (precedentemente Epoch Biosciences Inc.)

Primers e sonda per la determinazione del virus controllo di processo Mengovirus

Mengo 110 (FW): GCG GGT CCT GCC GAA AGT

Mengo 209 (REV): GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC

Mengo 147 (PROBE): FAM-ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC-MGBNFQ

Sonda marcata 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' MGB (minor groove binder) NFQ (nonfluorescent quencher)

Reference: [13]

Primers e sonda per la determinazione del virus controllo di processo Norovirus Murino (MNV)

MNV orf1/2junct (FW): CAC GCC ACC GAT CTG TTC TG

MNV orf1/2junct (REV): GCG CTG CGC CAT CAC TC

MNV orf1/2junct (PROBE): FAM-CGC TTT GGA ACA ATG-MGBNFQ

Sonda marcata 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' MGB (minor groove binder) NFQ (nonfluorescent quencher)

Reference: [2]

Mix per la determinazione di SARS-CoV-2 ORF-1ab (nsp14)

(AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents – Applied BioSystems)

<i>Reagenti</i>	<i>Concentrazione finale (in 25 µl di reazione)</i>	<i>Volume per reazione</i>
2× RT-PCR Buffer	1×	12,5 µL
Primer F 2297 (12,5 µM)	500 nM	1 µL
Primer R 2298 (22,5 µM)	900 nM	1 µL
Probe 2299 (6,25 µM)	250 nM	1 µL
25× RT-PCR Enzyme Mix	-	1 µL
Detection enhancer*	-	1,67 µL
Nuclease-free Water	-	1,83 µL
Volume finale	-	20 ± 0.2

* 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

Mix per la determinazione del virus controllo di processo Mengovirus
(AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents – Applied BioSystems)

<i>Reagenti</i>	<i>Concentrazione finale (in 25 µl di reazione)</i>	<i>Volume per reazione</i>
2× RT-PCR Buffer	1×	12,5 µL
Primer F Mengo 110 (12,5 µM)	500 nM	1 µL
Primer R Mengo 209 (22,5 µM)	900 nM	1 µL
Probe Mengo 147 (6,25 µM)	250 nM	1 µL
25× RT-PCR Enzyme Mix	-	1 µL
Nuclease-free Water	-	3,5 µL
Volume finale	-	20 ± 0.2

Mix per la determinazione del virus controllo di processo Norovirus Murino (MNV)
(AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents – Applied BioSystems)

<i>Reagenti</i>	<i>Concentrazione finale (in 25 µl di reazione)</i>	<i>Volume per reazione</i>
2× RT-PCR Buffer	1×	12,5 µL
Primer F MNV (12,5 µM)	500 nM	1 µL
Primer R MNV (22,5 µM)	900 nM	1 µL
Probe MNV (5 µM)	200 nM	1 µL
25× RT-PCR Enzyme Mix	-	1 µL
Nuclease-free Water	-	3,5 µL
Volume finale	-	20 ± 0.2

Profilo termico per la determinazione di SARS-CoV-2 ORF-1ab (nsp14), del virus controllo di processo Mengovirus e del virus controllo di processo Norovirus Murino (MNV)

<i>Step</i>		<i>Temperatura e tempo</i>	<i>Numero di cicli</i>
Retrotrascrizione		50 °C per 30 min	1
Inattivazione RT		95 °C per 10 min	1
Amplificazione	Denaturazione	95 °C per 15 s	45
	Annealing-extension	60 °C per 45 s	

ANNEX 2
Esempio di caricamento di plate per la determinazione di SARS-CoV-2
mediante ricerca di ORF-1ab, nsp14

Campione replica 1	Campione + RNA contr dil. 10e0	dsDNA CoV-2 dil. 10e0	dsDNA CoV-2 dil. 10e-1	dsDNA CoV-2 dil. 10e-2	dsDNA CoV-2 dil. 10e-3	dsDNA CoV-2 dil. 10e-4	RNA contr CoV-2 dil. 10e0	RNA contr CoV-2 dil. 10e-1	RNA contr CoV-2 dil. 10e-2	Controllo negativo estrazione replica 1	Controllo negativo PCR replica 1	
Campione replica 2	Acqua + RNA contr dil. 10e0	dsDNA CoV-2 dil. 10e0	dsDNA CoV-2 dil. 10e-1	dsDNA CoV-2 dil. 10e-2	dsDNA CoV-2 dil. 10e-3	dsDNA CoV-2 dil. 10e-4	RNA contr CoV-2 dil. 10e0	RNA contr CoV-2 dil. 10e-1	RNA contr CoV-2 dil. 10e-2	Controllo negativo estrazione replica 2	Controllo negativo PCR replica 2	
							RNA contr CoV-2 dil. 10e0	RNA contr CoV-2 dil. 10e-1	RNA contr CoV-2 dil. 10e-2			
Campione replica unica		RNA virus controllo processo dil. 10e0 (100)	RNA virus controllo processo dil. 10e-1 (10)	RNA virus controllo processo dil. 10e-2 (1)	RNA virus controllo processo dil. 10e-3 (0.1)					Controllo negativo estrazione replica unica	Controllo negativo PCR replica unica	

Mix per SARS-CoV-2
Mix per virus controllo di processo

ANNEX 3

Real-time RT-qPCR per la determinazione di SARS-CoV-2 mediante ricerca di ORF-1ab, nsp14 (Protocollo con determinazione di efficienza di concentrazione/estrazione e inibizione di PCR in reazione multiplex)

I laboratori che desiderassero ridurre il numero di reazioni da effettuare per i controlli di inibizione e di efficienza di concentrazione/estrazione possono effettuare tali reazioni in multiplex. Si specifica che l'opzione di analisi in multiplex è relativa alle sole reazioni per la determinazione dell'efficienza di concentrazione/estrazione e per la determinazione dell'inibizione di PCR; le reazioni per la quantizzazione del target SARS-CoV-2 nei campioni di acque reflue sono condotte mediante PCR simplex.

Si richiama l'attenzione sul fatto che, come evidenziato nelle prove di verifica della presente procedura, l'utilizzo del formato PCR multiplex può determinare un incremento dei Cq nelle reazioni. Tuttavia, poiché tanto il calcolo dell'inibizione quanto quello dell'efficienza di concentrazione/estrazione sono effettuate mediante comparazione di Cq , e poiché tale incremento dei valori, nelle prove di ottimizzazione, è risultato equivalente nei campioni e nelle reazioni di riferimento, l'adozione di tale procedura alternativa è possibile senza sostanziale pregiudizio per i risultati.

Poiché tutte le sonde indicate nell'Annex 1 prevedono una marcatura 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), l'adozione di tale approccio richiede di selezionare preventivamente una marcatura alternativa, per una delle due reazioni effettuate in multiplex. La selezione del fluoroforo è strettamente dipendente dalla tipologia di apparecchio di real-time PCR disponibile nei laboratori e deve tenere conto delle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione che lo strumento cui in grado di operare. Prove di verifica sono state effettuate utilizzando la seguente combinazione di sonde:

CoV-2-P Cy5: Cy5-CAT AGA CAA CAG GTG CGC TC-MGBEQ
Mengo 147 (PROBE): FAM-ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC-MGBNFQ

e

CoV-2-P Cy5: Cy5-CAT AGA CAA CAG GTG CGC TC-MGBEQ
MNV orf1/2junct (PROBE): FAM-CGC TTT GGA ACA ATG-MGBNFQ

Per l'esecuzione del controllo di inibizione e di efficienza di concentrazione/estrazione in multiplex, la procedura di cui al § 7.1 (Analisi del virus target) dovrebbe essere così modificata:

Per ogni campione preparare:

- 2 reazioni con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA del campione
- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA del campione e $1 \pm 0.1 \mu\text{l}$ di RNA di controllo per l'esecuzione del controllo esterno di inibizione

Per l'RNA di controllo preparare:

- 3 reazioni con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA di controllo non diluito (10^0)
- 3 reazioni con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA di controllo diluizione 10^{-1}
- 3 reazioni con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA di controllo diluizione 10^{-2}
- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di acqua per biologia molecolare e $1 \pm 0.1 \mu\text{l}$ di RNA di controllo per l'esecuzione del controllo esterno di inibizione"

La procedura di cui al § 7.2 (Analisi del virus controllo di processo) dovrebbe essere così riformulata:

- Preparare diluizioni 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} del RNA del virus controllo di processo in TE buffer pH 8.0

Preparare la mix di real-time RT-qPCR per un numero di reazioni sufficienti ad eseguire tutte le determinazioni di seguito elencate e distribuire, in ogni pozzetto, $20 \pm 1 \mu\text{l}$ di mix.

Per ogni campione preparare:

- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA del campione e $1 \pm 0.1 \mu\text{l}$ di RNA di controllo per l'esecuzione del controllo esterno di inibizione

Per l'RNA del virus controllo di processo preparare:

- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA del virus controllo di processo non diluito (10^0) e $1 \pm 0.1 \mu\text{l}$ di RNA di controllo per l'esecuzione del controllo esterno di inibizione

- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA del virus controllo di processo diluizione 10^{-1}

- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA del virus controllo di processo diluizione 10^{-2}

- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di RNA del virus controllo di processo diluizione 10^{-3}

Nota: le concentrazioni del virus controllo di processo non sono necessarie ai fini della determinazione del recupero, che viene effettuato come analisi relativa. A tale scopo è sufficiente indicare "100" come valore di riferimento del virus controllo di processo non diluito (10^0), e "10", "1", "0.1" per gli RNA del virus controllo di processo rispettivamente nelle diluizioni 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

Per i controlli negativi preparare:

- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di acqua per biologia molecolare (controllo negativo di PCR)

- 1 reazione con $5 \pm 0.5 \mu\text{l}$ di controllo negativo di estrazione

La procedura di cui al § 7.4 (Verifica dell'inibizione di PCR) e § 7.5 (Calcolo dell'efficienza di concentrazione/estrazione) dovrebbe essere così riformulata:

Facendo riferimento all'amplificazione del RNA di controllo (i.e. alla fluorescenza derivante dal probe selezionato per la determinazione dell'inibizione), si confronta il valore di Cq ottenuto per l'amplificazione di SARS-CoV-2 nella reazione contenente il campione addizionato con $1 \mu\text{l}$ di RNA di controllo con il valore di Cq della reazione contenente acqua per biologia molecolare addizionata con $1 \mu\text{l}$ di RNA secondo la seguente formula:

$$\Delta Cq = Cq (\text{campione} + \text{RNA di controllo}) - Cq (\text{RNA del virus controllo di processo non diluito} + \text{RNA di controllo})$$

Il campione è considerato accettabile se $\Delta Cq \leq 2$ (corrispondente ad una inibizione della PCR del 75%).

...

Facendo riferimento all'amplificazione del virus controllo di processo (i.e. alla fluorescenza derivante dal probe selezionato per la determinazione del virus controllo di processo), si confronta il valore di Cq nella reazione contenente il campione, con il valore di Cq della reazione contenente l'RNA del virus controllo di processo non diluito secondo la seguente formula:

$$\text{Efficienza di concentrazione/estrazione} = 10(\Delta Cq/m) \times F \times 100\%$$

dove

$$\Delta Cq = Cq (\text{campione} + \text{RNA di controllo}) - Cq (\text{RNA del virus controllo di processo non diluito} + \text{RNA di controllo})$$

m = slope della curva standard del virus controllo di processo

F = frazione del campione iniziale sottoposta al processo di concentrazione ed estrazione. Per campioni processati secondo quanto descritto nel § 5.1 (i.e. aggiunta del virus controllo di processo a 45 mL di campione e, successivamente alla centrifugazione, recupero di 40 mL), tale fattore equivale a 1.125.

Il campione è considerato accettabile se l'efficienza di concentrazione/estrazione è $\geq 1\%$.

Mix per la determinazione del virus controllo di processo Mengovirus in multiplex con il controllo di inibizione

(AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents – Applied BioSystems)

Reagenti	Concentrazione finale (in 25 µl di reazione)	Volume per reazione
2× RT-PCR Buffer	1×	12,5 µL
Primer F Mengo 110 (12,5 µM)	500 nM	1 µL
Primer R Mengo 209 (22,5 µM)	900 nM	1 µL
Probe Mengo 147 (6,25 µM) *	250 nM	1 µL
Primer F 2297 (12,5 µM)	500 nM	1 µL
Primer R 2298 (22,5 µM)	900 nM	1 µL
Probe 2299 (6,25 µM) *	250 nM	1 µL
25× RT-PCR Enzyme Mix	-	1 µL
Nuclease-free Water	-	0,5 µL
Volume finale	-	20 ± 0.2

* sonde con marcature alternative

Mix per la determinazione del virus controllo di processo Norovirus Murino in multiplex con il controllo di inibizione

(AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents – Applied BioSystems)

Reagenti	Concentrazione finale (in 25 µl di reazione)	Volume per reazione
2× RT-PCR Buffer	1×	12,5 µL
Primer F MNV (12,5 µM)	500 nM	1 µL
Primer R MNV (22,5 µM)	900 nM	1 µL
Probe MNV (5 µM) *	200 nM	1 µL
Primer F 2297 (12,5 µM)	500 nM	1 µL
Primer R 2298 (22,5 µM)	900 nM	1 µL
Probe 2299 (6,25 µM) *	250 nM	1 µL
25× RT-PCR Enzyme Mix	-	1 µL
Nuclease-free Water	-	0,5 µL
Volume finale	-	20 ± 0.2

* sonde con marcature alternative

Profilo termico per la determinazione del virus controllo di processo Mengovirus o del virus controllo di processo Norovirus Murino (MNV) in multiplex con la determinazione dell'inibizione

Step		Temperatura e tempo	Numero di cicli
Retrotrascrizione		50 °C per 30 min	1
Inattivazione RT		95 °C per 10 min	1
Amplificazione	Denaturazione	95 °C per 15 s	45
	Annealing-extension	60 °C per 45 s	

Esempio di caricamento di plate per la determinazione di SARS-CoV-2 mediante ricerca di ORF-1ab, nsp14 con determinazione di efficienza di concentrazione/estrazione e inibizione di PCR in reazione multiplex

Campione replica 1		dsDNA CoV-2 dil. 10e0	dsDNA CoV-2 dil. 10e-1	dsDNA CoV-2 dil. 10e-2	dsDNA CoV-2 dil. 10e-3	dsDNA CoV-2 dil. 10e-4	RNA contr CoV-2 dil. 10e0	RNA contr CoV-2 dil. 10e-1	RNA contr CoV-2 dil. 10e-2	Controllo negativo estrazione replica 1	Controllo negativo PCR replica 1
Campione replica 2		dsDNA CoV-2 dil. 10e0	dsDNA CoV-2 dil. 10e-1	dsDNA CoV-2 dil. 10e-2	dsDNA CoV-2 dil. 10e-3	dsDNA CoV-2 dil. 10e-4	RNA contr CoV-2 dil. 10e0	RNA contr CoV-2 dil. 10e-1	RNA contr CoV-2 dil. 10e-2	Controllo negativo estrazione replica 2	Controllo negativo PCR replica 2
							RNA contr CoV-2 dil. 10e0	RNA contr CoV-2 dil. 10e-1	RNA contr CoV-2 dil. 10e-2		
Campione replica unica + RNA contr dil. 10e0		RNA virus controllo processo dil. 10e0 (100) + RNA contr dil. 10e0	RNA virus controllo processo dil. 10e-1 (10)	RNA virus controllo processo dil. 10e-2 (1)	RNA virus controllo processo dil. 10e-3 (0.1)					Controllo negativo estrazione replica unica	Controllo negativo PCR replica unica

Mix per SARS-CoV-2
Mix per virus controllo di processo e per SARS-CoV-2 (multiplex)

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] 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.
- [2] Baert L, Wobus CE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(2):543-546. doi:10.1128/AEM.01039-07
- [3] 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>
- [4] 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.
- [5] 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>
- [6] 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.
- [7] 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>
- [8] Kocameci, B. A., Kurtb, H., Hacıođluç S., Yarılcı C., Saatcıd, 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>.
- [9] 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
- [10] 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.
- [11] 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>
- [12] 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
- [13] Pinto, R. M., Costafreda, M. I., & Bosch, A. (2009). Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and Environment Microbiology*, 75, 7350–7355.
- [14] 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

- [15] 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.
- [16] Saththasivam 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.
- [17] 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.
- [18] WHO 2003. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/WHO_V-B_03.03_eng.pdf
- [19] 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
- [20] Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J. M., Maday, Y., Teysou, 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>.

Acquisto di reagenti e materiali

I riferimenti a marchi specifici o codici prodotto sono inseriti in questa guida a puro titolo di esempio, per agevolare le attività dei laboratori coinvolti nella sorveglianza SARI, e non implicano alcuna promozione del prodotto. In nessun caso è precluso l'utilizzo di materiali, strumenti o reagenti di altri produttori.

Fase analitica	Reattivo/Materiale	Ditta	codice
Estrazione di acidi nucleici	Buffer di lisi (4 L)	bioMerieux	280134
Estrazione di acidi nucleici	Buffer di lavaggio 1 (4 L)	bioMerieux	280130
Estrazione di acidi nucleici	Buffer di lavaggio 2 (4 L)	bioMerieux	280131
Estrazione di acidi nucleici	Buffer di lavaggio 3 (4 L)	bioMerieux	280132
Estrazione di acidi nucleici	Silica magnetica (384 rxn)	bioMerieux	280133
Estrazione di acidi nucleici	Nuclisens Lysis Buffer (48 provette da 2 mL)	bioMerieux	200292
Estrazione di acidi nucleici	Solo per piattaforma MiniMag: Nuclisens Magnetic Extraction Reagents (buffer di lavaggio 1, lavaggio 2, lavaggio 3 e silica magnetica in kit per 48 estrazioni). I reattivi sono predispensati in volumi idonei per l'estrazione su piattaforma MiniMag ma sono insufficienti per estrazioni su piattaforma eGeneUP	bioMerieux	200293
Estrazione di acidi nucleici	Deepwells 48	Axygen	Variabile a seconda dei rivenditori
Estrazione di acidi nucleici	Deepwells 48	Caplugs Evergreen	https://www.evergreensci.com/48-well-deep-well-plates
Estrazione di acidi nucleici	Deepwells 48	NEST Biotechnology	https://www.cell-nest.com/page94?_l=en&product_id=101
Real-time RT-qPCR	kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents	Thermo Fisher Scientific (Applied BioSystems)	AM1005, 4387424, 4387391
Real-time RT-qPCR	Detection enhancer	Thermo Fisher Scientific (Applied BioSystems)	A44810, A44811, A44941
Real-time RT-qPCR	Primers Sonde con marcatura FAM, MGB-NFQ e/o MGB-EQ	Eurofins Genomics	https://eurofinsgenomics.eu/ (sintesi su ordinazione)
		Thermo Fisher Scientific (Applied BioSystems)	https://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/applied-biosystems-custom-primers-probes.html https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4316034#/4316034
		IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.)	https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/product-spotlight-mgb-eclipse-probes-for-gmp-applications

		Metabion	https://www.metabion.com/products/dna-and-rna-custom-oligonucleotides/dna-custom-oligos/dna-qpcr-probes/dual-labelled-probes-dlps/
Conservazione RNA dei campioni e dei materiali di riferimento	Inibitore delle RNAsi (concentrazione ≥ 40 U/microL)	Thermo Fisher Scientific	EO0381, EO0382
		Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	AM2682, AM2684
		Merck (Roche)	3335399001, 3335402001
Diluizione materiali di riferimento e Real-time RT-qPCR	TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) concentrazione 100X	Merck (Sigma-Aldrich)	T9285
Diluizione materiali di riferimento	Phosphate-Buffered Saline concentrazione 10X (PBS, pH 7.4)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	AM9624