



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO**

**SCUOLA DI MEDICINA DI TORINO**

**CORSO DI LAUREA IN  
TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO**

**TESI DI LAUREA**

La ricerca di SARS-CoV-2 nei reflui urbani: aspetti  
analitici

Detection of SARS-CoV-2 in urban wastewater: analytical  
aspects

*RELATORE:*

*Prof./Dott Sara Agata Caterina SCUTERA*

*CORRELATORE:*

*Prof./Dott Maria Francesca BORNEY*

*CANDIDATO  
Sylvie PIGNET*

*Anno Accademico 2020-2021*



# ABSTRACT

## *Italiano*

Nel periodo precedente alla pandemia da SARS-CoV-2 l'epidemiologia basata sulle acque reflue ("*Wastewater Based Epidemiology*") era impiegata prevalentemente per la ricerca di virus enterici attraverso numerosi metodi analitici. Oggi lo stesso tipo di sorveglianza viene applicata anche per SARS-CoV-2.

Lo scopo del mio lavoro, svolto in ARPA Valle d'Aosta, è quello di descrivere il piano di sorveglianza ambientale del SARS-CoV-2 attraverso l'analisi dei reflui urbani, concentrandomi in particolare sugli aspetti analitici.

In particolare ci siamo soffermati sulla fase di concentrazione del campione per la quale abbiamo impiegato due protocolli differenti: la PEG-precipitazione e, in seguito, la PEG-centrifugazione. Per quanto riguarda l'estrazione del virus abbiamo utilizzato il kit "*QIAmp Viral RNA mini*" di Qiagen, il kit "*NucliSENS*" di *Biomerieux* e il "*Viral RNA Extraction Spin Kit*" di *Bosphore*. Infine, per la rilevazione di SARS-CoV-2, è stata impiegata la *Real time* RT-PCR: abbiamo utilizzato il kit di *Viasure* per la ricerca del gene *N* e del gene *ORF1ab* e il Kit *AgPath-ID™ One-Step* per la ricerca di una parte della regione *ORF1ab*.

Paragonando i due metodi di concentrazione impiegati nello studio è risultata evidente la miglior *performance* della PEG-centrifugazione, motivo per cui il primo metodo di concentrazione è stato abbandonato. Inoltre, l'estrazione con il kit *Qiagen* e la rilevazione con la PCR *Viasure* sembrano essere le più facilmente applicabili per la ricerca del SARS-CoV-2 e quelle con cui abbiamo ottenuto una minor variabilità e risultati più soddisfacenti.

Tuttavia, anche la PCR ISS ha dimostrato di ottenere buoni risultati, nonostante risulti, in qualche caso, essere meno sensibile dell'altro metodo. L'intero processo analitico si è dimostrato estremamente ripetibile e riproducibile, in quanto abbiamo ottenuto coefficienti di variazione percentuali bassi per tutti i metodi presi in analisi. Ciò nonostante, per poter definire con certezza il metodo migliore da impiegare è necessario attendere ulteriori studi, che sono momentaneamente in corso, per approfondire la ricerca.

### *Inglese*

In the period before the SARS-CoV-2 pandemic, "Wastewater Based Epidemiology" was mainly used to detect enteric viruses by means of several analytical methods. Today the same type of surveillance is also applied to SARS-CoV-2.

The aim of my work, carried out in ARPA Valle d'Aosta, is to describe the environmental surveillance plan of SARS-CoV-2 through the analysis of urban wastewater, in particular focusing on the analytical aspects.

First, we focused on the sample concentration step for which we employed two different protocols: PEG-precipitation and, later, PEG-centrifugation. For virus extraction we used the "QIAmp Viral RNA mini" kit by Qiagen, the "NucliSENS" kit by Biomérieux and the "Viral RNA Extraction Spin Kit" by Bosphore. Real time RT-PCR was used for the detection of SARS-CoV-2. In particular, we used the Viasure kit for the detection of the N gene and the ORF1ab gene and the AgPath-ID™ One-Step Kit for the detection of a part of the ORF1ab region.

Comparing the two concentration methods used in the study, the better performance of PEG-centrifugation was evident, which is why the first concentration method was abandoned. In addition, extraction with the Qiagen kit and detection with Viasure PCR seem to be the most easily

applicable for the detection of SARS-CoV-2 with less variability and more satisfactory results.

However, ISS PCR has also been shown to obtain good results, although it appears, in some cases, to be less sensitive than the other method.

The whole analytical process proved to be extremely repeatable and reproducible, as we obtained low percentage coefficients of variation for all the methods taken into account. Nevertheless, to be able to define with certainty the best method to use it is necessary to wait for further studies, which are currently in progress, to further the research.

# SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	8
1.1 I Coronavirus.....	8
1.2 Origine .....	10
1.3 I pipistrelli.....	11
1.4 Struttura del SARS-CoV-2 .....	12
1.5 Replicazione.....	14
1.5.1 Attacco-ingresso.....	14
1.5.2 Espressione dei geni virali e sintesi dell'RNA .....	15
1.5.3 Assemblaggio virioni e uscita dalla cellula.....	18
1.6 Caratteristiche cliniche .....	18
1.7 Presenza di SARS-CoV-2 nelle feci .....	19
1.8 SARS-CoV-2 nelle acque reflue.....	20
1.9 Monitoraggio delle acque reflue .....	21
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	24
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	26
3.1 Aree di lavoro e misure di sicurezza.....	26
3.2 Campionamento .....	27
3.3 Concentrazione 1.....	28
3.3.1 Strumentazione e materiali .....	29
3.3.2 Reagenti .....	29
3.3.3 Procedimento di concentrazione:.....	30
3.4 Concentrazione 2.....	32
3.4.1 Strumentazione e materiali .....	32
3.4.2 Reagenti .....	32
3.4.3 Procedimento di concentrazione .....	32
3.5 Estrazione 1 Qiagen.....	34
3.5.1 Procedimento estrazione.....	36
3.6 Estrazione 2 Biomérieux .....	37
3.6.1 Procedimento estrazione.....	38

3.7 Estrazione 3 Bosphore.....	42
3.7.1 Procedimento estrazione.....	42
3.8 Rilevazione mediante Real Time RT-PCR: .....	44
3.8.1 Caratteristiche generali di una Real time RT-PCR.....	44
3.8.2 Alcune definizioni riguardanti la Real time RT-PCR.....	48
3.9 Controlli di PCR.....	50
4. Calcolo della resa di concentrazione/ estrazione .....	52
4.1.1 Metodo numero 1 .....	52
4.1.2 Metodo numero 2 .....	53
4.1.3 Metodo numero 3 .....	54
5. Calcolo dell'efficienza di PCR .....	55
6. Rilevazione di SARS-CoV-2 mediante Real Time RT-PCR con metodo ISS.....	55
6.1 Interpretazione dei risultati con metodo ISS .....	57
7. Rilevazione di SARS-CoV-2 mediante Real Time RT-PCR con metodo Viasure .....	58
7.1 Interpretazione dei risultati con metodo Viasure.....	59
<b>8. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	61
8.1 Analisi statistica dei risultati.....	61
8.2 Concentrazione campioni .....	63
8.3 Estrazione RNA campioni .....	71
8.4 Rilevazione RNA virale con Real Time RT-PCR .....	77
8.5 Analisi dei risultati ottenuti su campioni naturali.....	81
<b>9. CONCLUSIONI</b> .....	84
<b>10. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA</b> .....	88

# 1. INTRODUZIONE

Alla fine del 2019 a Wuhan, nella provincia cinese di Hubei, scoppiò un focolaio di polmonite dall'eziologia sconosciuta. In breve tempo, a seguito di ricerche ed analisi, venne identificata la causa della malattia: un nuovo *Coronavirus* che l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) denominò, successivamente, SARS-CoV-2, acronimo dell'inglese *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*, in cui il 2 è dovuto alla stretta parentela con il virus causa della SARS, appunto denominato SARS-CoV, il quale contagiò circa 8000 persone tra il 2002 e il 2004.<sup>1</sup>

Dopo una rapidissima trasmissione del virus nella zona, verso il 20 gennaio 2020 ne furono confermate le modalità di trasmissione per via aerea. La città di Wuhan venne isolata, ma, nonostante le misure preventive attuate dal governo cinese, il virus continuò ad espandersi nel resto della Cina e poi in ogni regione del mondo, tant'è che l'11 marzo 2020 l'OMS dichiarò che il COVID-19, acronimo dell'inglese *COronaVirus Disease 19*, ossia "malattia da Coronavirus del 2019" - con riferimento all'anno di identificazione del nuovo virus, rappresentava una pandemia mondiale.

## 1.1 I CORONAVIRUS

I *Coronavirus* sono una famiglia numerosa di virus rivestiti, a singolo filamento di RNA a polarità positiva. Questi virus sono conosciuti da diversi anni; il primo *Coronavirus* di interesse umano, infatti, viene descritto nel 1965 nel *The British Medical Journal*: il virus B814, isolato dal muco di un paziente che soffriva di un raffreddore comune.<sup>2</sup>

La maggior parte dei virus conosciuti facenti parte di questa famiglia danno, infatti, affezioni dell'apparato respiratorio. I *Coronavirus*



appartengono all'ordine dei *Nidovirales*, famiglia *Coronaviridae*, sotto ordine delle *Coronavirinae* e genere *Coronavirus*, che si suddivide in *alpha*, *beta*, *delta* e *gamma Coronavirus* (Tabella 1). I *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* infettano un ampio range di specie animali, in particolare quelle aviarie. Gli *Alpha e Beta Coronavirus* infettano, invece, prevalentemente i mammiferi, tra cui l'uomo. Quelli che circolano da più tempo all'interno della popolazione sono i ceppi HCoV-229, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 e HCoV-OC43, i quali causano infezioni respiratorie stagionali, simili al raffreddore comune.

Negli ultimi anni sono emersi invece dei Coronavirus che possono causare patologie dell'apparato respiratorio più severe e potenzialmente fatali, come MERS-CoV (*Middle East Respiratory Sindrome*), SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Sindrome*) e SARS-CoV2 (*Severe Acute Respiratory Sindrome 2*).<sup>3</sup>

Order: <i>Nidovirales</i>					
Family: <i>Coronaviridae</i>					
Sub-family	Genus	Sub-genus	Species	Sub-species	
<i>Orthocoronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Duvinacoronavirus</i>	<i>HCoV-229</i>		
		<i>Setracovirus</i>	<i>HCoV-NL63</i>		
	<i>Betacoronavirus</i>	<i>Embecovirus</i>		<i>HCoV-HKU1</i>	
				<i>Betacoronavirus 1</i>	<i>HCoV-OC43</i>
		<i>Merbecovirus</i>	<i>MERS-CoV</i>		
		<i>Sarbecovirus</i>	<i>SARS-CoV</i>		
			<i>SARS-CoV2</i>		
	<i>Deltacoronavirus</i>				
	<i>Gammacoronavirus</i>				

TABELLA 1: Tassonomia dei coronavirus.

(European Centre for Disease Prevention and Control, An agency of the European Union, Coronavirus, <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/coronaviruses>)

## 1.2 ORIGINE

Il SARS-CoV-2 è stato isolato per la prima volta da un *cluster* di casi di polmonite associati al *South China Seafood Market*, un "wet" market con un'ampia varietà di animali esotici in vendita, tra cui serpenti, pipistrelli e pangolini.

A seguito del sequenziamento del genoma del SARS-CoV-2 si sono evidenziate delle omologie nucleotidiche con il genoma di alcuni *Coronavirus* che infettano il pipistrello ed il pangolino. Vi sono inoltre omologie di sequenza anche con il MERS-CoV e SARS-CoV. Le percentuali di omologia sono qui sotto riportate:

- Bat CoV RaTG13 (96%)
- Bat CoV RmYN02 (93%)
- Pangolin CoV (90%)
- MERS-CoV (50%)
- SARS-CoV (80%)<sup>4</sup>

Tali omologie fanno pensare ad una possibile trasmissione del virus dai pipistrelli ad un ospite intermedio, che può essere il pangolino, il serpente oppure lo zibetto delle palme. (Figura1)

Uno di questi ospiti intermedi infine, entrando in contatto con l'uomo, può avergli trasmesso il virus.

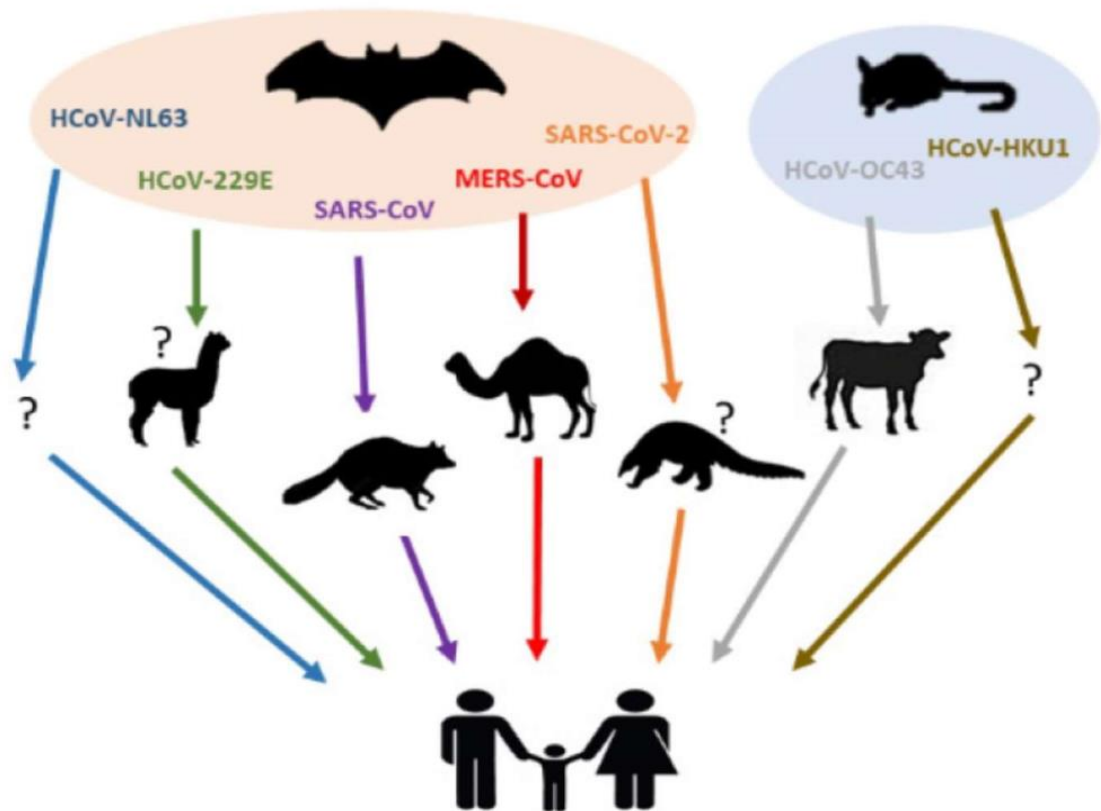


FIGURA 1: alcuni esempi di malattie che hanno un ospite primario (pipistrello), un ospite intermedio (alpaca, zibetto, cammello, pangolino o mucca) e un ospite definitivo (l'uomo).

(Zoonotic origins of human coronaviruses, Zi-Wei Ye, et al, Int J Biol Sci. 2020; 16(10): 1686–1697, 2020 Marzo 15. doi: 10.7150/ijbs.45472

### 1.3 I PIPISTRELLI

I pipistrelli sono presenti in tutto il mondo e, dopo i roditori, sono il sottogruppo più numeroso di mammiferi, contando oltre 1300 specie. È noto ormai da anni come i pipistrelli siano la fonte di altre zoonosi, come per esempio quella causata dall'*Hendra virus*, dall'*Ebola virus* e dalla MERS. I pipistrelli possiedono un metabolismo molto accelerato, dovuto alla loro capacità di volare, ed un sistema immunitario innato estremamente efficiente. Questo permette ai virus di sopravvivere all'interno del loro organismo senza causare malattie troppo gravi che, in qualsiasi altro

animale, porterebbero probabilmente alla morte. Vivendo ammassati in grotte e in spazi ristretti, diffondono molto facilmente i virus all'interno delle colonie e, grazie alla loro capacità di volare, la trasmissione agli altri animali risulta essere facilitata.<sup>5</sup>

## 1.4 STRUTTURA DEL SARS-COV-2

La particella virale, se osservata al microscopio elettronico, è di forma tondeggiante o ovalare, del diametro di circa 60-100 nm. Inoltre presenta le tipiche protuberanze superficiali, formate dalle proteine *Spike*, che richiamano la forma di una corona, da cui il nome “*Coronavirus*”.<sup>6</sup>

Il SARS CoV-2 è un virus rivestito a singolo filamento di RNA, a polarità positiva, con capside elicoidale. Il suo genoma è di circa 29,9 kb e contiene un numero variabile, da 6 a 11, di *open reading frames* (ORF). Tra questi ORF1a e ORF1b occupano i due terzi del genoma poliadenilato e sono poi trascritti in due poliproteine (pp1a e pp1b) e tradotti in 16 proteine non strutturali (NSP), necessarie per la replicazione virale e per la formazione del complesso di trascrizione (RTC). Le rimanenti ORF producono proteine strutturali e proteine accessorie.<sup>7</sup>

Il restante genoma codifica per quattro proteine strutturali, essenziali per il virus:

- Glicoproteina S (*Spike*): glicoproteina di fusione di classe 1, che media l'ingresso del virus nella cellula ospite tramite il legame con il recettore ACE2 (*Angiotensin-converting-enzyme 2*). Si divide in due parti: S1 contiene il *receptor binding domain* (RBD) che determina il tropismo del virus, e S2, che determina la fusione con la membrana

cellulare tramite due *heptad repeats* (HR1 e HR2).

- Proteina M di membrana: attraversa l'*envelope* e interagisce con il complesso RNA-proteina nel virione.
- Dimero emoaagglutinina-esterasi: proteina del rivestimento (*envelope*), fondamentale per la fase di rilascio del virus all'interno della cellula ospite.
- Proteina E: proteina del rivestimento (*envelope*). L'espressione di questa proteina aiuta la glicoproteina S, e quindi il virus, ad attaccarsi alla membrana della cellula bersaglio.
- Proteina N: associata al singolo filamento di RNA ne aumenta la stabilità.<sup>8</sup> (Figura 2)

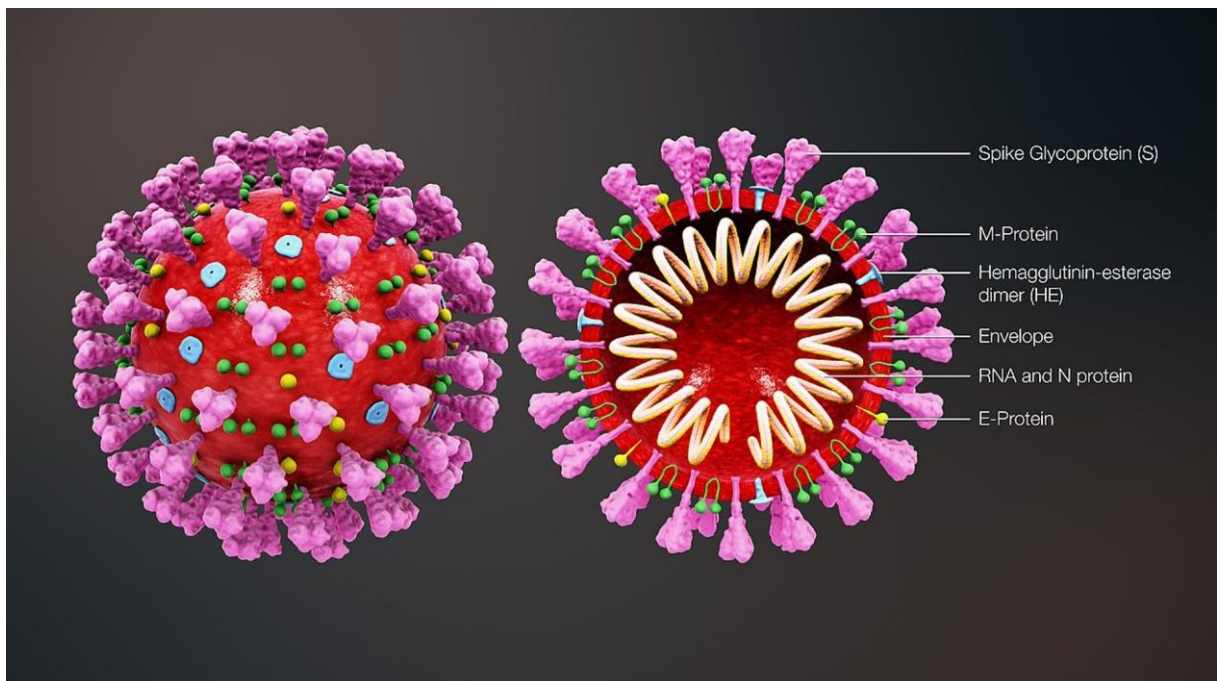


FIGURA 2: la biologia strutturale per SARS-CoV-2: la proteina Spike. (Università Vita-Salute San Raffaele, <https://www.unisr.it/news/2020/6/la-biologia-strutturale-per-sars-cov-2-la-proteina-spike>)

## 1.5 REPLICAZIONE

### 1.5.1. Attacco-ingresso

La glicoproteina S, o proteina *Spike*; che protrude dall'*envelope* del virus, garantisce la specificità per i recettori cellulari delle cellule ospiti. Questa si suddivide in due parti:

- S1: contiene una regione che serve a legarsi alla cellula bersaglio, aderendo al recettore ACE2 (*Angiotensin-converting-enzyme 2*), espresso sulle cellule degli alveoli polmonari, intestino, vene ed arterie;
- S2: consente l'ingresso del virus nella cellula.<sup>9</sup> (Figura 3)

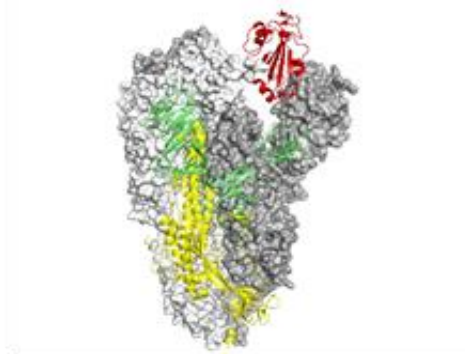


FIGURA 3: struttura della proteina Spike di SARS-CoV-2. La catena S1 è colorata in verde, con in rosso la porzione che serve ad interagire con il recettore ACE2. La catena S2 è colorata in giallo. (La biologia strutturale per SARS-CoV-2: la proteina Spike Università Vita-Salute San Raffaele, 12 giugno 2020, <https://www.univr.it/news/2020/6/la-biologia-strutturale-per-sars-cov-2-la-proteina-spike>).

Il SARS-CoV-2, quando si trova a contatto con la cellula *target*, si lega al recettore ACE2. A questo punto due enzimi, la furina oppure il TMPRSS2, presenti sulla membrana cellulare, rompono la proteina *Spike* a livello del sito di clivaggio tra S1 e S2. Questo evento permette l'esposizione di

peptidi di fusione (piccole catene di amminoacidi) che permettono la fusione della membrana virale con la cellula ospite.<sup>10</sup> Ognuno di questi recettori ed enzimi è ampiamente espresso a livello dell'apparato respiratorio e questo contribuisce alla patogenesi e alla trasmissione del virus. A seguito della fusione della membrana, il genoma del virus entra all'interno del citoplasma della cellula ospite.<sup>3</sup>

### 1.5.2 Espressione dei geni virali e sintesi dell'RNA

A questo punto il virus viene scapsidato e ORF1a/1b viene tradotto nelle due poliproteine pp1a e pp1ab, le quali codificano per proteine non strutturali e per il complesso di replicazione-trascrizione (RTC).<sup>7</sup>

La pp1ab codifica per 16 proteine non strutturali che servono alla replicazione dell'RNA genomico (gRNA) e alla produzione dei differenti RNA messaggeri (mRNA) o sub-genomici virali (sgRNA). La restante parte del genoma contiene le informazioni per produrre proteine strutturali ovvero le proteine S, M, E e N, necessarie per la produzione del nuovo virione e di 6 proteine accessorie (3a, 6, 7a, 7b, 8, 10), le cui funzioni non sono ancora ben note.<sup>11</sup> (Figura 4)

## STRUTTURA DEL gRNA E PROTEINE VIRALI

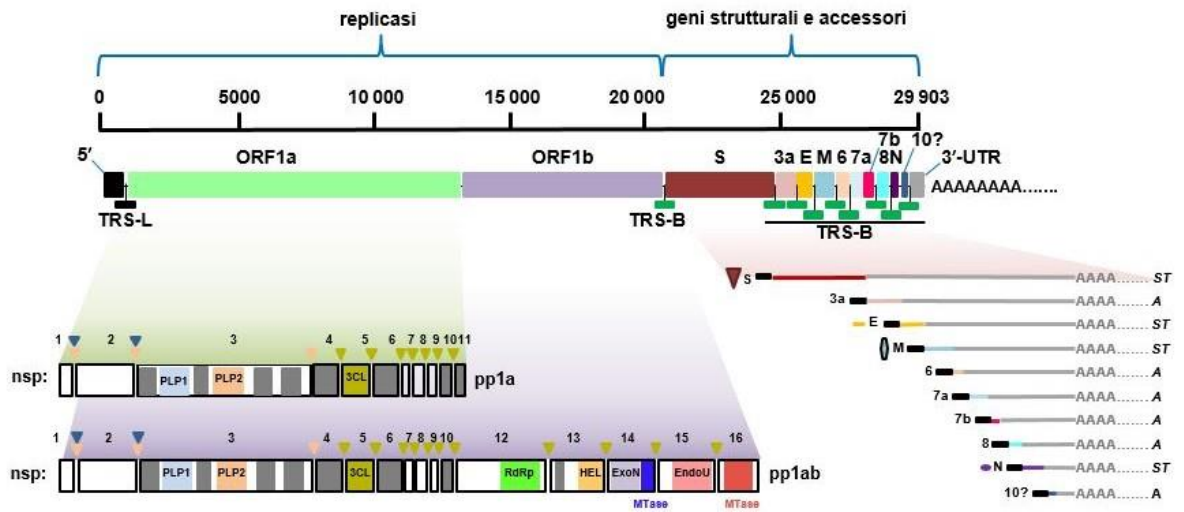


FIGURA 4: struttura e genoma del SARS-CoV-2. (Kim et al., Cell, 2020 and Sola et al., Ann Rev Virol, 2015.)

La produzione di copie del genoma virale per i nuovi virioni (gRNA) avviene grazie ad un processo continuo. Tale processo prevede la sintesi, mediata dalla subunità *nsp12* del complesso proteico, con attività di RNA polimerasi RNA dipendente (RdP), di un intermedio a polarità negativa, che viene usato come stampo per produrre il filamento positivo. Al contrario, la sintesi degli RNA sub genomici (sgRNA) è un processo discontinuo. Ognuno di questi ha, all'estremità 5', una sequenza di 70 nucleotidi chiamata *Leader* (L), che è presente una volta sola all'estremità 5' dell'intero RNA. La sintesi discontinua degli RNA sub genomici dipende da sequenze, chiamate sequenze regolatrici della trascrizione (TRS), presenti a valle del Leader (TRS-L) e che precedono ogni RNA sub genomico (TRS-B). Le TRS sono caratterizzate da sequenze conservate di 6-7 nucleotidi, identiche per il TRS-L e ogni TRS-B e che permettono l'appaiamento della sequenza CS-L, con la sequenza complementare CS-B dell'RNA intermedio nascente negativo, quando l'RNA si piega per allineare la TRS-L con ogni TRS-B 1,2. Questo processo assicura la produzione di ciascun RNA sub genomico, che è, sostanzialmente, una



fusione tra la sequenza Leader all'estremità 5' dell'RNA virale e la sequenza dell'RNA sub genomico preceduto dalla TRS-B.<sup>11</sup> (Figura 5)

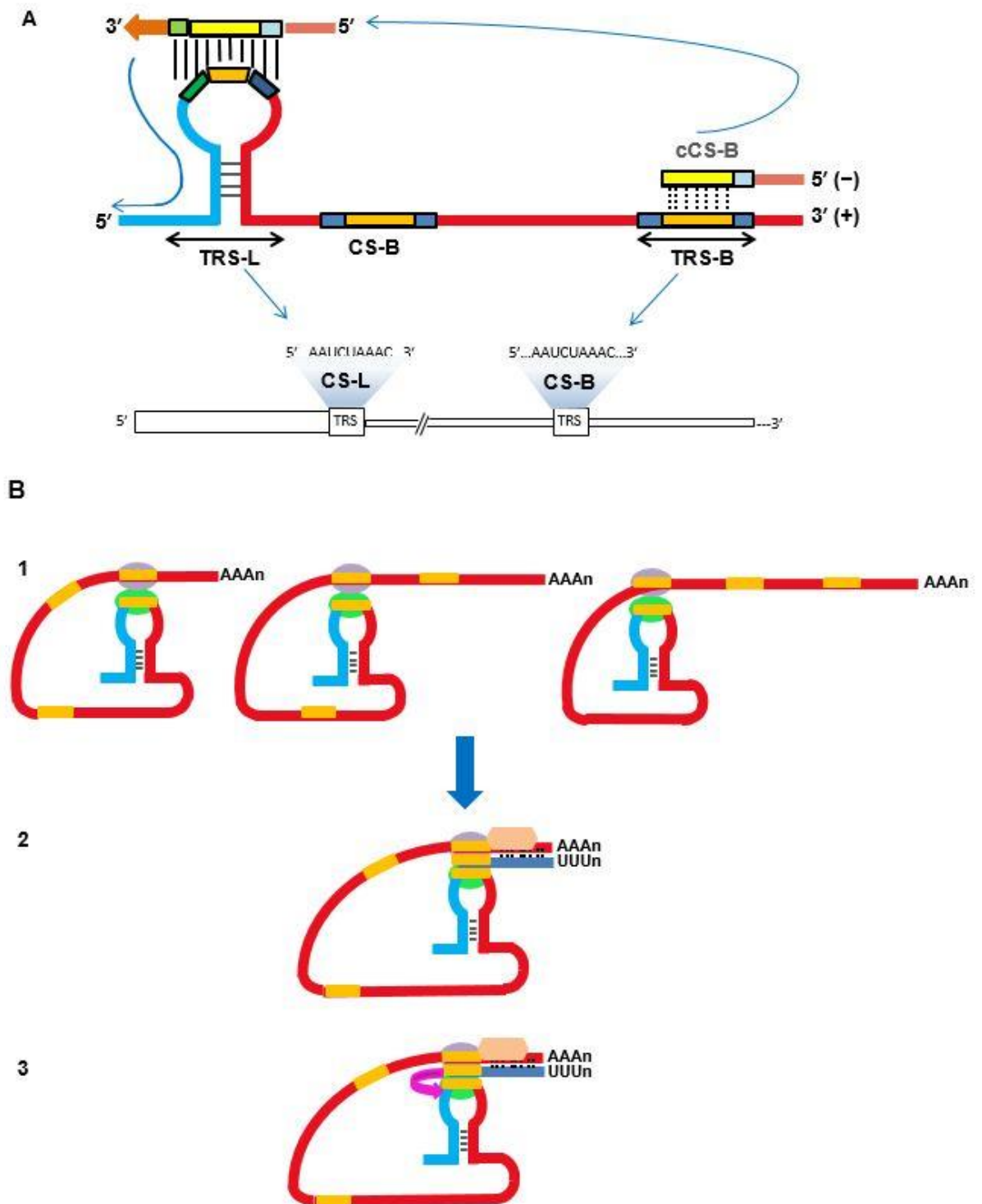


FIGURA 5 (Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses, Sola et al., Ann Rev Virol, 2015)

### 1.5.3 Assemblaggio virioni e uscita dalla cellula

Una volta prodotte le proteine strutturali, queste transitano all'interno delle membrane del reticolo endoplasmatico e successivamente attraverso il compartimento intermedio reticolo endoplasmatico- Golgi (*ERGIC*), nel quale il nuovo RNA genomico prodotto, le proteine capsidiche e le glicoproteine dell'*envelope* si assemblano a formare i nuovi virioni. A questo punto i virioni vengono secreti dalla cellula infetta per esocitosi.<sup>3</sup>

## 1.6 CARATTERISTICHE CLINICHE

COVID-19, essendo una malattia causata da un'infezione respiratoria, viene diffusa principalmente attraverso il tratto respiratorio mediante *droplets*, secrezioni respiratorie e contatto diretto. Ciò nonostante alcuni studi hanno rilevato la presenza di SARS-CoV-2 all'interno di tamponi fecali e nel sangue, indicando nuove possibili opzioni di trasmissione del virus. La trasmissione verticale madre-feto non è ancora stata provata.<sup>12</sup> Il recettore ACE2, responsabile del legame con la proteina *Spike* e quindi dell'entrata del virus, è abbondantemente presente a livello delle cellule epiteliali degli alveoli polmonari e a livello degli enterociti del piccolo intestino, il che ci permette di capire il processo patogenetico e le manifestazioni cliniche.

Secondo gli ultimi aggiornamenti il periodo di incubazione è di 1-14 giorni, più frequentemente tra i 3 e 7 giorni. Il soggetto risulta essere contagioso durante il periodo di latenza e durante la malattia, ovvero quando la carica virale è più elevata. Più difficile è dire con certezza quanto un soggetto asintomatico sia contagioso. Questo virus è altamente trasmissibile tra l'uomo, in particolare tra i soggetti più anziani (> 65 anni) o deboli.<sup>7</sup>

Gli adulti affetti da COVID-19 presentano prevalentemente febbre, tosse e

debolezza, sintomi che possono essere accompagnati da raffreddore, mal di testa, perdita dell'olfatto o del gusto, dolori muscolari, nausea o vomito, brividi e diarrea. Tra coloro che sviluppano sintomi, la maggior parte (circa l'80%) guarisce dalla malattia senza bisogno di cure ospedaliere in circa una settimana. Circa il 15% si ammala gravemente e necessita di ossigeno e il 5% si ammala gravemente e necessita di cure intensive.<sup>13</sup>

L'ultimo caso riguarda quasi prevalentemente i pazienti immunodepressi o con malattie croniche, come per esempio la fibrosi cistica o il diabete. Per questi soggetti le complicanze possono essere molto gravi: insufficienza respiratoria, sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), sepsi e *shock* settico, tromboembolia e insufficienza multiorgano, comprese lesioni al cuore, al fegato o ai reni.

## 1.7 PRESENZA DI SARS-COV-2 NELLE FECI

Il SARS-CoV-2 non infetta soltanto l'apparato respiratorio, ma sappiamo che i recettori specifici ACE2, necessari al virus per l'attacco alla cellula e il suo ingresso, sono presenti anche a livello delle cellule epiteliali gastrointestinali. Inoltre anche alcune proteine del nucleocapside del virus sono state trovate a livello del citoplasma delle cellule epiteliali gastriche, duodenali e della ghiandola del retto.<sup>14</sup>

Altre prove fondamentali sono riportate da uno studio fatto su 42 pazienti affetti da COVID-19 nel quale risulta che il 66,6% di essi è risultato positivo all'RNA del virus a livello fecale, nonostante i soggetti non presentassero sintomi gastrointestinali, né una malattia grave. Inoltre, il 64,29% di questi sono rimasti positivi all'RNA testato sulle feci anche dopo che i tamponi nasofaringei sono diventati negativi, per un periodo di circa 7 giorni.<sup>15</sup>

La carica virale nelle feci di una persona positiva al SARS-CoV-2 è stata

stimata tra  $5 \times 10^3$  e  $5 \times 10^{7.6}$  copie per ml, a seconda dell'infezione in corso. Questa ampia variazione di carica tra soggetto e soggetto riflette, probabilmente, l'ampio *range* di sintomi sperimentati dagli individui e gli organi presi di mira dal virus.<sup>16</sup> Tuttavia, nei pazienti affetti da COVID-19 con sintomi intestinali, vi è la possibilità che la causa di tali sintomi sia da ricercare in altri microorganismi che coinfectano il paziente. Per esempio, quando pazienti gravemente malati vengono trattati con alcuni antibiotici, questi possono turbare l'equilibrio del tratto intestinale creando un ambiente favorevole alla crescita di agenti patogeni opportunisti e resistenti che possono causare sintomi gastroenterici, quali la diarrea.<sup>17</sup>

In conclusione, la presenza del SARS-CoV-2 nelle feci può far pensare ad una possibile diffusione oro-fecale attraverso la contaminazione di mani, superfici, acqua o cibo. Questo può accadere, in particolar modo, nei paesi con un basso livello socio-economico nei quali si può trovare il virus nei servizi igienici a fossa per lo smaltimento delle feci umane o nei luoghi in cui si pratica la defecazione a cielo aperto.<sup>16</sup>

In generale, comunque, si può dire che le particelle virali contenute nelle feci, essendo confinate in ambienti chiusi e limitati, risultano essere meno infettive rispetto alle particelle presenti nelle goccioline respiratorie che riescono ad essere più facilmente trasmesse da soggetto a soggetto.<sup>17</sup>

## 1.8 SARS-COV-2 NELLE ACQUE REFLUE

Sappiamo da diversi studi, che il SARS-CoV-2 può essere rilevato nelle feci di alcuni pazienti infetti. L'interazione con il tratto gastrointestinale di soggetti infetti pone una serie di domande sulla presenza e diffusione del virus nelle acque reflue e negli impianti di trattamento. Le feci, una volta espulse, raggiungono le fognature e qui vengono diluite notevolmente con

il resto dei reflui presenti. La carica virale diminuisce fortemente, tant'è che le acque reflue che entrano in un impianto di trattamento possiedono una carica virale che va da 2 copie genomiche/ 100 ml a  $3 \times 10^3$  copie genomiche / ml, a seconda del livello di epidemia. Questa diluizione può essere dovuta a diversi fattori come la portata giornaliera scaricata nelle fognature da ciascuna persona (cioè circa l'80% della fornitura giornaliera media di acqua potabile pro capite che diluisce di circa  $10^3$  volte il refluo), la presenza di acqua piovana o l'afflusso di parassiti nella rete fognaria. Oltre alla diluizione, vi è anche una riduzione della vitalità del virus a causa della temperatura non ottimale, del pH acido, dell'esposizione alla luce e dell'alto contenuto di particelle solide e inquinanti. Tutte queste caratteristiche dei reflui ci fanno comprendere che l'infettività del virus si attenua passando dalle feci alle acque reflue e poi nell'ambiente. Ciò nonostante è fondamentale comprendere meglio e approfondire il destino del SARS-CoV-2 nelle acque reflue e nelle sue varie emissioni, onde prevenire infezioni oro-fecali dovute ad alcune delle possibili emissioni da un impianto di trattamento:

- Acque reflue che possono essere depurate
- Fanghi in eccesso che possono diventare biosolidi
- Aerosol contenente microrganismi, derivato da aereazione forzata, miscelazione, pompaggio etc.<sup>16</sup>

## 1.9 MONITORAGGIO DELLE ACQUE REFLUE

Il monitoraggio delle acque reflue è impiegato da diversi anni e offre un'ottima strategia per tracciare i marcatori chimici e biologici dell'attività umana, il consumo di droghe illecite, l'uso di farmaci, l'inquinamento

dell'acqua e la presenza di geni di resistenza batterica. Questo monitoraggio permette anche di studiare e tenere sotto controllo il contagio di alcune malattie virali, che possono essere rilevate misurando il materiale genetico presente nelle acque, permettendo di predisporre dei piani di sorveglianza a livello nazionale e sovranazionale. Tali misure riguardano alcuni virus enterici come *Adenovirus*, *Norovirus*, il virus dell'epatite E zoonotica riemergente e i *Poliovirus*.

Attualmente il test delle acque reflue è stato suggerito come strumento di allerta precoce per monitorare e conoscere l'andamento delle infezioni da COVID-19 e mettere quindi in atto una risposta tempestiva e risolutiva.<sup>18</sup>

L'RNA virale ritrovato nei campioni non è necessariamente indice di vitalità e infettività del virus, ma ci permette comunque di avere una panoramica delle infezioni presenti in quel dato periodo.

In Italia, a giugno 2020, è stato avviato il progetto SARI (Sorveglianza Ambientale di SARS-CoV-2 attraverso i Reflui urbani in Italia: indicazioni sull'andamento epidemico e allerta precoce), il cui obiettivo è quello di creare un sistema di tracciamento del virus tramite l'analisi dei reflui urbani, così come avviene per alcuni virus enterici.

Il coordinamento del progetto sul territorio nazionale è a carico dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), il quale si prefigge di definire un protocollo di analisi, specifico per la matrice, e di predisporre una *dashboard* per la raccolta dei dati su tutto il territorio nazionale. A carico delle regioni, attraverso le sue strutture territoriali, è invece la raccolta dei campioni presso i depuratori individuati come significativi, l'analisi dei campioni e l'inserimento dei dati nella *dashboard*.

Quest'anno, poi, è stata pubblicata una raccomandazione UE (2021/472 del 17 marzo 2021) relativa ad un approccio comune per istituire una sorveglianza sistematica del SARS-CoV-2 e delle sue varianti nelle acque reflue nell'UE. L'obiettivo di tale raccomandazione è sostenere gli stati

membri nell'istituzione di sistemi di sorveglianza delle acque reflue in tutta l'UE, quale strumento complementare di raccolta e gestione dei dati, nell'ambito della pandemia COVID-19.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del mio lavoro svolto in ARPA Valle d'Aosta è quello di descrivere il piano di sorveglianza ambientale del SARS-CoV-2 attraverso l'analisi dei reflui urbani, concentrandomi in particolare sugli aspetti analitici. Nel periodo precedente alla pandemia da SARS-CoV-2 l'epidemiologia basata sulle acque reflue (*“Wastewater Based Epidemiology”*) era impiegata prevalentemente per la ricerca di virus enterici attraverso numerosi metodi analitici. Questo nuovo virus, tuttavia, ha reso necessaria un'evoluzione metodologica e quindi una ricerca specifica per poter applicare lo stesso tipo di sorveglianza anche al SARS-CoV-2.

Attualmente esistono diversi metodi di analisi sia per quanto riguarda la concentrazione dei reflui, che per l'estrazione e per la rilevazione del virus, nessuno dei quali però validato a livello internazionale per il SARS-CoV-2. Durante il mio tirocinio in ARPA, seguendo il lavoro dei miei colleghi, ho potuto concentrarmi su alcuni aspetti analitici: concentrazione del campione, estrazione degli acidi nucleici virali e loro rilevazione mediante RT-qPCR.

In particolare per la fase di concentrazione del campione sono state fatte prove utilizzando due protocolli differenti. Il primo protocollo impiegato è stato quello della prima revisione del progetto SARI, basato sull'articolo di riferimento *“SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: evidence from 2 environmental monitoring”*, nel quale viene descritto il lavoro fatto per investigare la possibilità che il SARS-CoV-2 fosse già presente in Italia prima della scoperta del contagiato numero uno italiano nel 21 febbraio 2020.<sup>19</sup>



Tutto questo grazie all'analisi di 40 campioni di acque reflue raccolte da cinque impianti di trattamento delle acque reflue nelle città di Milano, Torino e Bologna.

Il procedimento di concentrazione impiegato in questo studio segue il metodo di separazione in due fasi con PEG-destrano, raccomandato dalla guida per la sorveglianza ambientale del *Poliovirus* del *WHO*, con alcune modifiche.<sup>22</sup>

Il secondo metodo di concentrazione di SARS-CoV-2 da noi impiegato, viene descritto nella seconda revisione del protocollo del progetto SARI e nell' articolo: “*SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases*”<sup>20</sup>, ed è basato sul principio della PEG centrifugazione.

Per quanto riguarda l'estrazione del virus abbiamo utilizzato il kit “*QIAmp Viral RNA mini*” di Qiagen, il kit “*NucliSENS*” di *Biomerieux* e il “*Viral RNA Extraction Spin Kit*” di *Bosphore*.

Per la rilevazione di SARS-CoV-2 è stata impiegata la *Real time* RT-PCR. In particolare abbiamo utilizzato due sistemi: il kit di *Viasure* per la ricerca del gene *N* e del gene *ORF 1ab*; il Kit *AgPath-ID™ One-Step* unitamente a primers e probe sintetizzati da *Eurofins Genomics* per la ricerca di una parte della regione *ORF 1ab*, secondo le indicazioni fornite nel protocollo del progetto SARI e pubblicate nell'articolo di *La Rosa et al. 2020*.

# 3. MATERIALI E METODI

## 3.1 AREE DI LAVORO E MISURE DI SICUREZZA

Per poter procedere con il flusso di lavoro è necessario che all'interno del laboratorio vi siano aree ben distinte per ciascuno dei seguenti passaggi:

- Un'area di lavoro per la fase iniziale dell'analisi: pastorizzazione e concentrazione del campione.
- Un'area di lavoro per l'estrazione degli acidi nucleici virali (sotto cappa biologica a flusso laminare).
- Un'area di lavoro per la preparazione dei reattivi, degli standard e dei controlli necessari alla PCR, e per l'aggiunta dell'acido nucleico preparato in precedenza (sotto cappa biologica a flusso laminare).
- Un'area di lavoro per la rilevazione e la quantificazione dei prodotti di PCR (termociclatore).

Ogni area di lavoro deve avere un set dedicato di pipette e puntali.

La separazione fisica, attraverso l'uso di stanze separate, è il modo più efficiente per assicurare una buona riuscita delle analisi ed evitare le contaminazioni crociate.

È di fondamentale importanza indossare indumenti dedicati e guanti monouso durante tutte le fasi analitiche, che vanno sostituiti ogni volta che si sospetta la possibilità di contaminazione.

Bisogna poi eliminare tutto ciò che è venuto a contatto con il materiale potenzialmente contaminato, come per esempio l'RNA estratto, che deve essere smaltito dopo sterilizzazione in autoclave. Le provette contenente l'RNA amplificato non vanno mai aperte, ma gettate nei rifiuti da autoclavare.

Terminato il lavoro bisogna sanificare i piani di lavoro e le cappe con soluzioni decontaminanti a base di ipoclorito di sodio al 0,1-1% o di alcol etilico al 70% e accendere la lampada UV per circa 30 minuti.

Prima di iniziare con un nuovo lavoro bisogna lasciare gli UV accesi per altri 30 minuti.<sup>21</sup>

## 3.2 CAMPIONAMENTO

I campioni sono stati prelevati presso alcuni impianti di depurazione, dislocati nel territorio regionale, sia nella valle centrale che nelle vallate laterali.

Il campionamento è stato eseguito secondo le indicazioni del protocollo di sorveglianza del progetto SARI, che riprende le indicazioni fornite per la sorveglianza ambientale del *Poliovirus*.<sup>22</sup>

Di seguito viene riportata la corretta procedura di campionamento dei reflui urbani per la ricerca del SARS-CoV-2.

I prelievi di acqua derivante da impianti di depurazione devono essere fatti prima di effettuare qualsiasi trattamento e in corrispondenza dell'ingresso dell'impianto. Se l'impianto è dotato di due o più linee il prelievo va eseguito su ciascuna linea. Secondo la guida per la sorveglianza ambientale del poliovirus le dimensioni ideali degli impianti da cui prelevare i campioni di refluo si riferiscono a 100.000 - 300.000 abitanti equivalenti. Nel caso in cui gli impianti fossero di dimensioni minori, come alcuni di quelli presenti in Valle d'Aosta, si può prelevare un'aliquota da ciascun impianto e produrre un campione composito che rappresenta l'area. Vista la facilità con cui il virus nel refluo tende a degradarsi e la pericolosità del virus stesso, il campionamento va eseguito da personale adeguatamente formato, in genere gli operatori all'interno della struttura che già sono

addetti a fare gli altri campionamenti per le analisi interne di routine.

Procedura e frequenza di prelievo: La raccolta dei reflui è stata eseguita con frequenza dapprima settimanale e poi bi-settimanale, impiegando un campionatore automatico al fine di ottenere un medio composito delle 24 ore. È importante etichettare i flaconi con luogo e data e disinfettarli prima del trasporto. Il campione deve essere conservato a circa 4°C in borse termiche prima e durante il trasporto nel laboratorio.

Conservazione dei campioni: Se non si procede immediatamente con l'analisi, i campioni vanno conservati a -80°C. Prima dell'utilizzo in laboratorio i contenitori vanno disinfettati con ipoclorito di Sodio all' 1% o etanolo al 70%. Nelle più recenti revisioni del protocollo SARI e nella citata Raccomandazione UE, è prescritto che il campione sia processato entro le 48 ore dal prelievo, in modo da poter trasmettere nello stesso tempo i risultati, al fine di poter procedere eventualmente ad un'allerta rapida.<sup>19</sup>

### 3.3 CONCENTRAZIONE 1

Il primo protocollo impiegato dal nostro laboratorio è stato quello della PEG- precipitazione.<sup>19</sup>

Per questa metodica si effettua la concentrazione del campione di refluo partendo da un volume di 250 ml secondo il metodo di riferimento raccomandato da OMS per la sorveglianza ambientale del *Poliovirus*, modificato per adattarsi meglio al *Coronavirus*.

### 3.3.1 Strumentazione e materiali

- Cappa a flusso laminare di classe 2
- Centrifuga refrigerata dotata di rotore in grado di contenere flaconi da 250-500 ml
- Flaconi da centrifuga con tappo di sicurezza da 250 e/o 500 ml
- pHmetro
- Agitatore orbitale con velocità regolabile fino a 500 min<sup>-1</sup>
- Frigorifero +4°C
- Congelatore a -20°C
- Congelatore a -70/-80°C
- Vortex
- Imbuti separatori da 500 ml in vetro
- Bagno termostatico 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

### 3.3.2 Reagenti

- Destrano 22% (p/p): 40 g di Destrano T40 da sciogliere in 142 ml di

H<sub>2</sub>O sterile. Lo scioglimento può essere accelerato mettendo il contenitore su un agitatore magnetico termico a circa 40°C. Questo reagente può essere conservato a +4°C per non oltre 2 settimane.

- PEG 6000 29% (p/p): 363 g di PEG6000 da sciogliere in 888 ml di H<sub>2</sub>O sterile. Questo reagente può essere conservato a +4°C per non oltre 2 settimane. Inoltre è da autoclavare a 121°C per 15 min.
- NaCl 5N (150 ml)
- NaOH/HCl 1N sterili per eventuali correzioni di pH
- Cloroformio

### 3.3.3 Procedimento di concentrazione:

1. Innanzitutto è necessario procedere con un pretrattamento termico al fine di inattivare le particelle virali infettanti eventualmente presenti, per la sicurezza sia del personale che dell'ambiente lavorativo: si collocano dunque le bottiglie col refluo scongelato in bagnetto termico a 56 °C per 30'.
2. Si procede con la centrifugazione del campione da 250 ml per 30 minuti a 1200 × g, per separare il pellet.
3. Si recupera il surnatante (per rovesciamento o per aspirazione mediante pipette) in una beuta da 500 ml e si recupera l'intera frazione solida in tubi Falcon 50 aiutandosi, se necessario, con 2-3 ml di H<sub>2</sub>O distillata sterile. Il pellet viene mantenuto a 4 °C per poi essere aggiunto al surnatante concentrato in seguito.
4. Si aggiusta il pH del surnatante a un valore compreso tra 7.0 e 7.5 con NaOH o HCl 1N sterili. Per evitare contaminazioni crociate tra i campioni processati nella stessa seduta analitica, il pH viene misurato in un'aliquota di circa 50 ml del campione, posta in un becker, che successivamente viene scartata. Sono state fatte delle

prove preliminari per stabilire quante gocce di base o acido siano necessarie per portare il campione al pH desiderato.

5. Si aggiungono al surnatante 20 ml di destrano al 22%, 143 ml di PEG6000 al 29% e 17 ml di NaCl 5N; si procede mescolando vigorosamente e si mantiene la sospensione in agitazione costante a 300 rpm per 30 minuti a 4-8°C mediante agitatore orbitale.
6. Un imbuto separatore da 500 ml viene impiegato per ciascun campione assicurandolo al supporto. A questo punto il campione viene versato nell'imbuto separatore e rimane a 4°C per tutta la notte, per la separazione bifasica.
7. Il giorno successivo aprire la valvola lentamente e raccogliere goccia per goccia la fase inferiore, inclusa l'interfase, nel tubo Falcon corrispondente, contenente la frazione solida recuperata in precedenza (vedi punto 3): si riunisce così il surnatante col pellet tenuto da parte. Normalmente, a questo punto, si dovrebbe ottenere un volume di circa 8-10 ml.
8. Aggiungere cloroformio in proporzione 1:5 v/v con il campione e vortexare e agitare vigorosamente per 10 minuti a 300 rpm.
9. Centrifugare a 1000 g per 10 minuti, raccogliere la fase acquosa superiore in un tubo Falcon sterile da 15 ml e registrare il volume finale.
10. Dividere il campione in due aliquote: una sarà usata per estrazione degli acidi nucleici e l'altra conservata per eventuali future ripetizioni dell'analisi.
11. Congelare a -20°C, o meglio a -80°C, fino all'esecuzione dell'estrazione degli acidi nucleici.<sup>19</sup>

## 3.4 CONCENTRAZIONE 2

Il secondo metodo di concentrazione che abbiamo utilizzato è quello descritto nella seconda revisione del protocollo del progetto SARI. Si effettua partendo da un volume di 45 ml, utilizzando il metodo pubblicato da *Wu et al.* con le modifiche qui riportate.<sup>20</sup>

### 3.4.1 Strumentazione e materiali

- Pipette graduate da 5 e 25 ml monouso in plastica
- Cappa a flusso laminare di classe 2
- Tubi da centrifuga in policarbonato o polipropilene adatti alla centrifuga ad alta velocità
- Frigoriferi e congelatori (vedi sopra)
- Bagno termostatico in grado di raggiungere almeno i 60°C
- Propipetta elettrica
- Micropipette da 1000 µl con puntali sterili con filtro
- Pipette monouso
- Centrifuga refrigerata con rotore ad angolo fisso (12000x g)
- Bilancia

### 3.4.2 Reagenti

- Polietilenglicole (PEG) 8000
- NaCl

### 3.4.3 Procedimento di concentrazione

1. Effettuare un pretrattamento termico in bagnetto termico a 56 °C per



- 30 minuti per inattivare le particelle virali eventualmente infettanti.
2. Raffreddare il campione a T ambiente per 10 minuti.
  3. Preraffreddare la centrifuga a 4°C ed impostarla a 4500xg.
  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 7.
  5. Scongela una quantità idonea di virus di controllo di processo per l'analisi di tutti i campioni. Conservare un'aliquota di 10 µl di virus di controllo di processo per l'estrazione del suo RNA (controllo di processo).
  6. Aggiungere 10 µl di virus di controllo di processo.
  7. Centrifugare i campioni a 4°C, 4500 x g per 30 minuti.
  8. Durante la centrifugazione, pesare 4 g di PEG 8000 e 0.9 g di NaCl in una provetta Falcon da 50 ml pulita per ogni campione in analisi.
  9. Al termine del ciclo di centrifugazione prelevare il rotore, trasportarlo sotto la cappa a flusso laminare ed estrarre i campioni avendo cura di non muoverli per evitare di risospingere il pellet.
  10. Aspirare delicatamente con la pipetta graduata 40 ml di supernatante e trasferirlo nel tubo contenente PEG8000 e NaCl pesati in precedenza. Il pellet andrà poi smaltito come rifiuto speciale infetto.
  11. Disciogliere il PEG e il NaCl nel campione a temperatura ambiente, invertendo delicatamente i tubi. Quest'operazione può durare circa 15-30 minuti.
  12. Posizionare le provette nel rotore bilanciandole a due a due, avendo cura di marcare con un pennarello il lato esterno in alto, cioè quello in cui viene applicata la maggior forza centrifuga, e quindi dove si raccoglierà il pellet. È importante marcare le provette perché il pellet non è sempre visibile, perciò è necessario sapere dove è collocato per i passi successivi.
  13. Centrifugare i campioni a 4°, 12000xg per 2 ore.

14. Al termine della 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. In molti casi il pellet non sarà visibile.
15. 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 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 e centrifugare a 12000 x g per altri 5 minuti.

### 3.5 ESTRAZIONE 1 QIAGEN

Il primo sistema per l'estrazione dell'RNA virale dal refluo concentrato che descrivo è il kit della *Qiagen* "*QIAmp Virale RNA Mini*", che combina le proprietà di legame selettive della membrana a base di silice e la velocità della micro centrifuga. Questo consente, inoltre, l'estrazione di molti campioni contemporaneamente. Il kit è validato per estrarre e purificare RNA dal plasma, il siero e altri liquidi biologici, ma è stato adattato anche alle acque di scarico.

Innanzitutto il campione viene lisato in condizioni denaturanti così da inattivare le RNasi e quindi da assicurare l'isolamento dell'RNA intatto. L'RNA *carrier*, aggiunto al *buffer* di lisi, aumenta la possibilità di legame

delle molecole alle membrane di silice, in particolare nei campioni a bassa carica virale, e limita la loro possibile degradazione da parte di RNAasi residue, che hanno resistito alle condizioni di denaturazione del tampone di lisi.

Per ottenere un legame ottimale alla membrana di silice di *QIAamp* è necessario aggiustare le condizioni di “*buffering*” e procedere con due brevi centrifugazioni. Una volta che l’acido nucleico virale è legato alla membrana si procede con la fase di lavaggio in 2 *steps*. L’RNA estratto è a questo punto privo di proteine, nucleasi e altri contaminanti e inibitori e viene eluito in un buffer privo di RNasi. Questo kit permette un recupero estremamente alto di RNA intatto in soli 20 minuti.

Il volume di campione normalmente estratto è di 140 µl ma, per aumentare l’efficienza e la sensibilità dell’estrazione, si può partire da un volume doppio di campione, quindi 280 µl. Si divide la reazione iniziale di lisi in due *ependorf DNasi RNasi free* da 1,5 ml per ogni campione, si centrifuga per poi unire le due aliquote nei successivi passaggi, a partire dalla fase di legame alle membrane in silice.

Il contenuto delle due eppendorf verrà centrifugato nella stessa colonnina.

Riassumendo, per ogni campione si preparano due eppendorf iniziali, una colonnina, 6 *collection tube* per la fase di *binding* e i lavaggi, e l’ultima colonnina per l’eluizione finale.<sup>23</sup> (Figura 6)

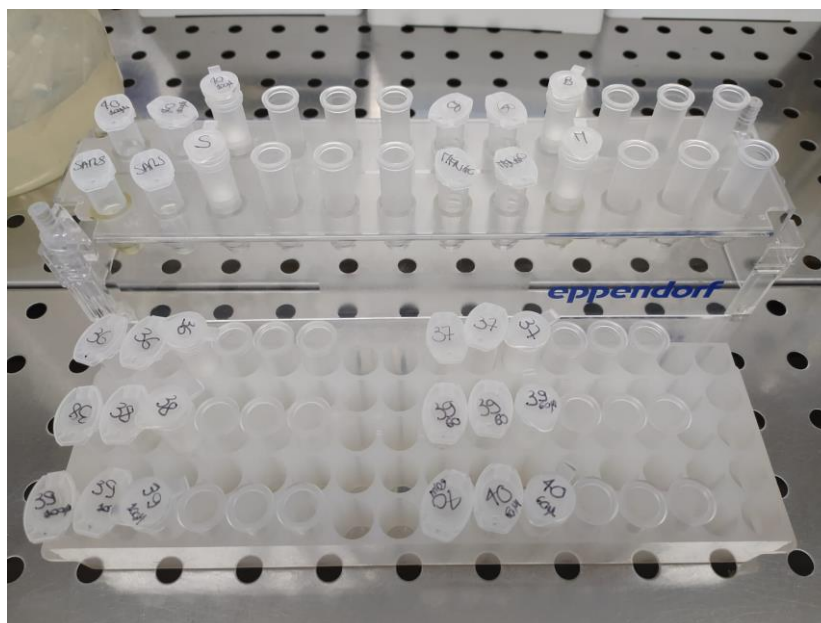


FIGURA 6: Preparazione del materiale per l'estrazione Qiagen.

### 3.5.1 Procedimento estrazione

#### FASE DI LISI:

- Aggiungere 5,6  $\mu\text{l}$  di *carrier RNA ave* in entrambe le eppendorf
- Aggiungere 560  $\mu\text{l}$  di *buffer AVL* in entrambe le eppendorf
- Aggiungere 5  $\mu\text{l}$  di controllo interno del kit di amplificazione che si utilizza in una sola eppendorf
- Vortexare il tampone e aggiungere 280  $\mu\text{l}$  di campione
- Vortexare 15 secondi, incubare a T ambiente per 10 minuti e centrifugare brevemente
- Aggiungere 560  $\mu\text{l}$  di etanolo (96-100%) e centrifugare brevemente

#### FASE DI LEGAME:

- Prendere il primo tubo collettore (tubo 1) con la colonnina inserita
- Aggiungere alla colonnina 630  $\mu\text{l}$  della miscela ottenuta in precedenza
- Centrifugare a 6.000 g per 1 minuto
- Mettere la colonnina in un nuovo tubo collettore (tubo 2)

- Prelevare la miscela rimanente e aggiungerla alla colonnina
- Centrifugare a 6.000 g per 1 minuto

#### FASE DI LAVAGGIO 1:

- Mettere la colonnina in un nuovo tubo collettore (tubo 3)
- Aggiungere 500 µl di *buffer AW1* alla colonnina
- Centrifugare a 6.000 g per 1 minuto

#### FASE DI LAVAGGIO 2:

- Mettere la colonnina in un nuovo tubo collettore (tubo 4 e ultimo)
- Aggiungere 500 µl di *buffer AW2* alla colonnina
- Centrifugare a 20000 g per 3 minuti
- Scartare il liquido e rimettere la colonnina nello stesso tubo collettore (tubo 4)
- Centrifugare a 20.000 g per 1 minuto
- Mettere la colonnina in tubo da centrifuga pulita da 1,5 ml.

#### FASE DI ELUIZIONE:

- Aggiungere 100 µl di *buffer AVE* alla colonnina
- Chiudere la provetta e aspettare 1 minuto
- Centrifugare a 6.000 g per 1 minuto e buttare la colonnina

Nell'eluato è contenuto l'RNA pronto per essere analizzato in Real Time-PCR.

Si aliquota una porzione di RNA da analizzare e il restante RNA *stock* va congelato a -80°C.

### 3.6 ESTRAZIONE 2 BIOMÉRIEUX

Il secondo che abbiamo utilizzato, il kit *NucliSENS* di *Biomérieux*, è progettato per l'estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici.

Questo metodo si basa sulla presenza di particelle di silice magnetica, che sono in grado di trattenere l'RNA virale. In ambiente con forte concentrazione di sali, gli acidi nucleici si legano alle particelle di silice. Le particelle con l'RNA legato costituiscono la fase solida, mentre le altre componenti come le proteine, nucleasi, etc. vengono eliminate con le fasi di lavaggio. Al termine dei lavaggi l'acido nucleico viene eluito dalla fase solida.<sup>24</sup>

Il processo di estrazione può avvenire in maniera automatica/semiautomatica, con apparecchiature dedicate, o tramite un processo manuale. In ARPA Valle d'Aosta abbiamo utilizzato la seconda modalità.

### 3.6.1 Procedimento estrazione

#### FASE DI LISI:

- Aggiungere 5 µl di controllo interno (del kit di PCR in utilizzo, nel nostro caso Viasure) e 1 ml di campione concentrato (oppure tutto il campione) in 2 ml di *NucliSENS Lysis Buffer*, mescolare per pipettamento e inversione.
- Lasciare la provetta per 20 minuti a temperatura ambiente.
- Vortexare la provetta contenente la silice magnetica e aggiungerne 50 µl per ciascun campione. (Figura 7)

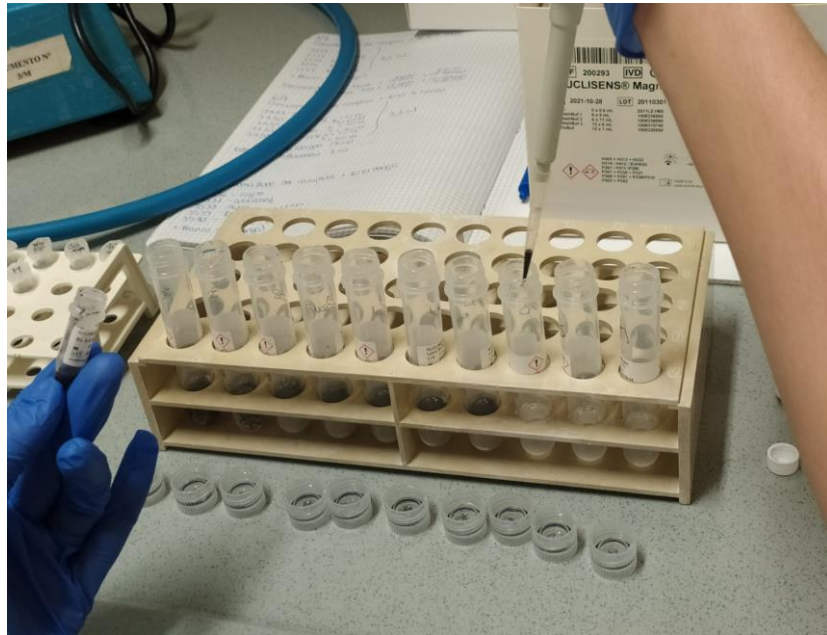


FIGURA 7: si aggiunge la silice magnetica ai campioni.

- Mescolare per inversione.
- Lasciare la provetta per 10 minuti a temperatura ambiente e mescolare per inversione ogni 5 minuti.
- Centrifugare a 1500 g per 2 minuti così da raccogliere le particelle di silice sul fondo delle provette. (Figura 8)



FIGURA 8: le particelle di silice si sono depositate sul fondo delle provette

- Eliminare il surnatante mediante aspirazione.

#### FASE DI LAVAGGIO:

1. Risospendere il pellet in 400  $\mu$ l di *buffer wash* 1 (pipettare delicatamente almeno 4 volte).
2. Trasferire 500  $\mu$ l del campione in una provetta da 1,5 ml posizionata nel rack fuori del campo magnetico (campo magnetico non attivo).
3. Mettere il rack sul campo magnetico e agitare per inversione per 30 secondi (campo magnetico attivo).
4. Attendere 1 minuto che le particelle si raccolgano lungo le pareti della provetta (campo magnetico attivo).
5. Rimuovere il surnatante per aspirazione (campo magnetico attivo).
6. Togliere il rack dal campo magnetico.
7. Ripetere dal punto 1 al punto 6.
8. Aggiungere 500  $\mu$ l di *buffer wash* 2 (pipettare direttamente sull'aggregato di silice almeno 4 volte).
9. Mettere il rack sul campo magnetico e agitare per inversione per 30 secondi (campo magnetico attivo).
10. Attendere 1 minuto che le particelle si raccolgano lungo le pareti della provetta (campo magnetico attivo).
11. Rimuovere il surnatante per aspirazione (campo magnetico attivo).
12. Togliere il rack dal campo magnetico.
13. Ripetere dal punto 8 al punto 12.
14. Aggiungere 500  $\mu$ l di *buffer wash* 3 (pipettare direttamente sull'aggregato di silice).



15. Mettere il rack sul campo magnetico e agitare per inversione per 15 secondi (campo magnetico attivo).
16. Attendere 1 minuto che le particelle si raccolgano lungo le pareti della provetta (campo magnetico attivo).
17. Rimuovere bene tutto il surnatante per aspirazione senza toccare il pellet di silice (campo magnetico attivo).

#### FASE DI ELUIZIONE:

- Togliere il rack dal campo magnetico.
- Aggiungere 100 µl di buffer di eluizione.
- Chiudere la provetta.
- Raccogliere sul fondo della provetta la silice battendo con il dito la provetta stessa.
- Incubare la provetta a 60°C a 1400 giri/min per 5 minuti.
- Mettere il rack sul campo magnetico e aspettare 1 minuto.
- Raccogliere il surnatante in una nuova provetta. (fare attenzione a non raccogliere la silice).

Infine l'RNA che è stato estratto deve essere sottoposto ad un ulteriore *step* di rimozione di inibitori che potrebbero essere ancora presenti nel campione, usando il kit “*OneStep PCR Inhibitor Removal*” della *ZYMO RESEARCH*.

I passaggi da eseguire sono i seguenti:

#### Preparazione della colonnina:

- Inserire una colonnina in un *Collection Tube*.
- Aggiungere 600 µl di *Prep Solution* e centrifugare a 8000 x g per 3 minuti

### Rimozione degli inibitori:

- Trasferire la colonna in una nuova eppendorf, aggiungere 100 µl di RNA nella colonnina e centrifugare a 16000 x g per 3 minuti

L'RNA filtrato è ora pronto per la PCR. Si aliquota una porzione di RNA da analizzare e il restante RNA *stock* va congelato a -80°C.<sup>25</sup>

## 3.7 ESTRAZIONE 3 BOSPHORE

Il *Viral RNA Extraction Spin Kit* di *Bosphore* è stato studiato per l'estrazione di RNA virale da diversi liquidi biologici e supernatanti di colture cellulari. Il kit contiene i reagenti e le soluzioni per l'estrazione e le colonnine da centrifuga del metodo. Il volume necessario di partenza è di 400 µl e il volume di recupero finale di 60-100 µl.

Il metodo di estrazione si basa sulla membrana di silice posta nelle colonnine di separazione, la quale permette di rimuovere e purificare il campione dalle componenti cellulari e di ottenere RNA puro.<sup>26</sup>

### 3.7.1 Procedimento estrazione

#### Prima dell'estrazione

- 1,1 ml di *pk storage buffer* è aggiunto ad una provetta di proteinasi K. Miscelare con vortex.
- 1,0 ml di *RNasi free water* è aggiunto alla provetta di *carrier RNA*. Miscelare con vortex.

Otteniamo così due soluzioni pronte all'uso: Proteinasi K (10 mg/ml) e Carrier RNA (2 mg/ml). La prima dev'essere conservata a +4°C mentre la seconda a -20°C.

Ripetuti scongelamenti e congelamenti del carrier RNA potrebbero ridurre

la sensibilità di estrazione.

#### Al momento dell'estrazione

- Se si osserva una precipitazione dei *buffer LBI* e *buffer IR2* riscaldare le soluzioni.
- Preparare una mix di estrazione con 40 µl di proteinasi K, 10 µl di *carrier RNA* e 5 µl di controllo interno per ogni campione e dividere il mix di estrazione nelle provette etichettate.
- Aggiungere 400 µl di campione nella provetta in cui precedentemente è stato aggiunto il mix di estrazione. Pipettare per miscelare.
- Aggiungere 400 µl di *buffer LBI* in ogni campione e miscelare con vortex. Incubare la miscela per 10 minuti a 56°C (FASE DI LISI).
- Aggiungere 500 µl di *buffer IR2* in ogni campione, pipettare per miscelare. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (RIMOZIONE DI INIBITORI).
- Prendere la colonnina con membrana ed inserirla in una provetta. Prelevare 650 µl della miscela ottenuta in precedenza e aggiungerla alla colonnina facendo attenzione a non toccare la membrana. Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto (FASE DI LEGAME).
- Scartare il liquido con la provetta e mettere la colonnina in una nuova provetta.
- Prelevare la miscela rimanente e aggiungerla alla colonnina facendo attenzione a non toccare la membrana. Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto (FASE DI LEGAME).
- Scartare il liquido con la provetta e mettere la colonnina in una nuova provetta.
- Aggiungere 450 µl di *buffer W3* alla colonnina. Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto (FASE DI LAVAGGIO 1).

- Scartare il liquido con la provetta e mettere la colonnina in una nuova provetta.
- Aggiungere nuovamente 450 µl di *buffer W3* alla colonnina. Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto (FASE DI LAVAGGIO 2).
- Scartare il liquido con la provetta e rimettere la colonnina nella stessa provetta. Centrifugare a 12500 rpm per 2 minuti.
- Scartare il liquido con la provetta. Mettere la colonnina in una nuova provetta pulita da 1,5 ml, e lasciare la provetta aperta per 1 minuto per far evaporare EtOH.
- Aggiungere 60-100 µl di *buffer EL4* alla colonnina e aspettare 5 minuti (FASE DI ELUIZIONE).
- Centrifugare a 12500 rpm per 1 minuto.

Il liquido così ottenuto (60-100 µl) è un campione di RNA purificato pronto da utilizzare per l'analisi in Real time RT-PCR.

Si aliquota una porzione di RNA da analizzare e il restante RNA *stock* va congelato a -80°C.

## 3.8 RILEVAZIONE MEDIANTE REAL TIME RT-PCR:

### 3.8.1 Caratteristiche generali di una Real time RT-PCR

Per la rilevazione del SARS-CoV-2 nel campione estratto dai reflui abbiamo impiegato la *Real time* RT PCR. Questa tecnica combina la *reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), la quale permette la retrotrascrizione di sequenze specifiche di RNA, alla tecnica di *Real-time* PCR che consente un'accurata quantificazione del livello di espressione del gene di interesse.

La tecnica della RT-PCR è una variante della tecnica PCR classica. Questa tecnica ci permette di sintetizzare una molecola di DNA partendo da un filamento stampo di RNA. La molecola di DNA sintetizzata mediante il processo di retrotrascrizione è definita cDNA.

Le tappe fondamentali di questa tecnica sono la retrotrascrizione e l'amplificazione.

Per retrotrascrivere l'RNA ed ottenere il cDNA utilizzeremo la “trascrittasi inversa”, un enzima estratto dai *Retrovirus*. Questo enzima ha bisogno di un iniziatore, cioè di un “*primer*” composto da oligonucleotidi e può essere di tre tipologie diverse:

- “*primers* oligo-dT”: sequenze oligonucleotidiche pensate per legarsi a tutti gli RNA messaggeri che hanno la poliadenilazione.
- “*primers* oligo random”: sequenze di nucleotidi sintetizzate in modo casuale cosicché possano andare a ibridarsi su porzioni diverse dell'RNA messaggero e retrotrascrivere in punti diversi.
- “*primers* specifici”: nel caso in cui si volesse retrotrascrivere solo il gene di interesse.

La tecnica Real time PCR o PCR quantitativa o RTq PCR, è una tecnica di laboratorio attraverso la quale si può amplificare e allo stesso tempo quantificare un segmento di DNA specifico.

L'amplificazione in una Real time PCR si effettua in modo molto simile alla tradizionale PCR “*end point*”, per cui vi sarà una fase di denaturazione, una di appaiamento e una di estensione. Per queste tre fasi è necessario aggiungere al kit di reazione:

- Nucleotidi da polimerizzare, sotto forma di desossiribonucleosidi trifosfati (dNTP).
- *Primers*, che sono degli “inneschi” di reazione costituiti da brevi sequenze di DNA complementari alle estremità 5' e 3' dei due filamenti del segmento target.

- La DNA polimerasi rappresentata da un enzima chiamato *taq polimerasi*. Il termine “*taq*” viene preso da un particolare batterio, il *Thermus aquaticus*, il quale vive nelle acque termali e dunque è in grado di sopravvivere a temperature elevate. Questa caratteristica è infatti fondamentale per la polimerasi che andremo ad utilizzare nella nostra PCR poiché dovrà resistere alle temperature elevate dei processi di appaiamento e estensione che avvengono a circa 60 e 70 gradi.

Tuttavia la Real time PCR avrà un’efficienza maggiore rispetto alla PCR *end point* e, ad ogni ciclo di amplificazione, si potrà osservare l’aumento di DNA nel nostro campione grazie all’aggiunta di composti fluorescenti, che emettono un segnale luminoso ad ogni ciclo di amplificazione, la cui intensità è proporzionale alla quantità di acido nucleico amplificato.

Alcune delle molecole chimiche utilizzate in Real-time PCR per la rilevazione della fluorescenza sono i coloranti intercalanti dei quali il principale è il “*SYBR green*”, che è una molecola in grado di intercalarsi nel DNA a doppio filamento: il complesso DNA-colorante emette fluorescenza. Il suo legame con il DNA è aspecifico.

Successivamente all’aggiunta di questa molecola si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all’aumento del numero di copie dell’amplicone. (Figura 6)

Un’altra metodica molto impiegata è quella che fa uso delle sonde “*Dual Labeled*” che appartengono alla categoria delle sonde oligonucleotidiche a idrolisi:

Queste sonde chiamate “*TaqMan*” contengono due estremità e cioè:

- Estremità reporter: è presente all’estremità 5’ sottoforma di un fluorocromo chiamato appunto “*reporter*”;
- Estremità *quencher*: è presente all’estremità 3’ sottoforma di un fluorocromo. In inglese “*quencher*” significa “abbassare”/“reprimere”.

La sonda *TaqMan* andrà a ibridarsi sul nostro frammento di interesse in quanto il suo legame con il DNA è specifico e, durante la fase di allungamento in cui la DNA polimerasi scorrerà sul filamento per sintetizzare i nuovi nucleotidi, la sonda verrà degradata. Questo farà sì che le due estremità della sonda si separino. A questo punto l'estremità *quencher* non potrà più reprimere la fluorescenza dell'estremità *reporter*. Di conseguenza quest'ultima emetterà fluorescenza in modo direttamente proporzionale al DNA amplificato. (Figura 9)

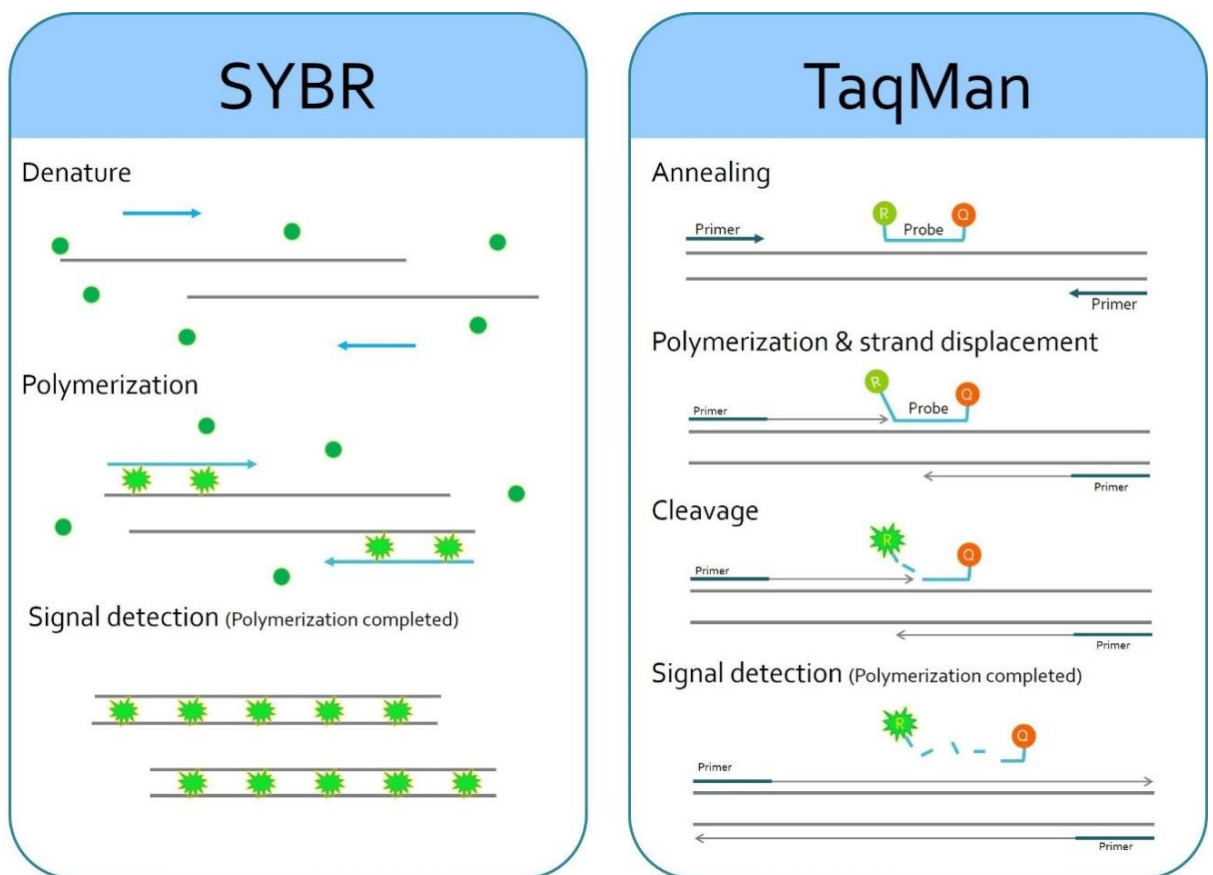


FIGURA 9 (SMOBIO Technology, Real-time PCR Related Questions, ExcelTaq™ 2X Q-PCR Master Mix, TaqMan® vs. SYBR® Green Chemistry, <https://test.truebio.co/faq-real-time-pcr>).

Per poter comprendere meglio come funziona una Real-time PCR è necessario osservare un grafico di amplificazione (Figura 10). In questo grafico il numero di cicli di PCR è indicato sull'asse delle X, mentre la fluorescenza emessa durante la reazione di amplificazione è proporzionale

alla quantità iniziale di campione, è indicata sull'asse delle Y.

L'amplificazione mostra, inoltre, due fasi: una fase esponenziale seguita da una fase non esponenziale o di *plateau*. Durante la fase esponenziale il prodotto di PCR raddoppia approssimativamente in ogni ciclo. Man mano che la reazione continua, però, le componenti della reazione vengono consumate e quindi le risorse cominciano a essere imitate. A questo punto, infatti, la reazione rallenta e entra in una fase di *plateau*.<sup>27</sup>

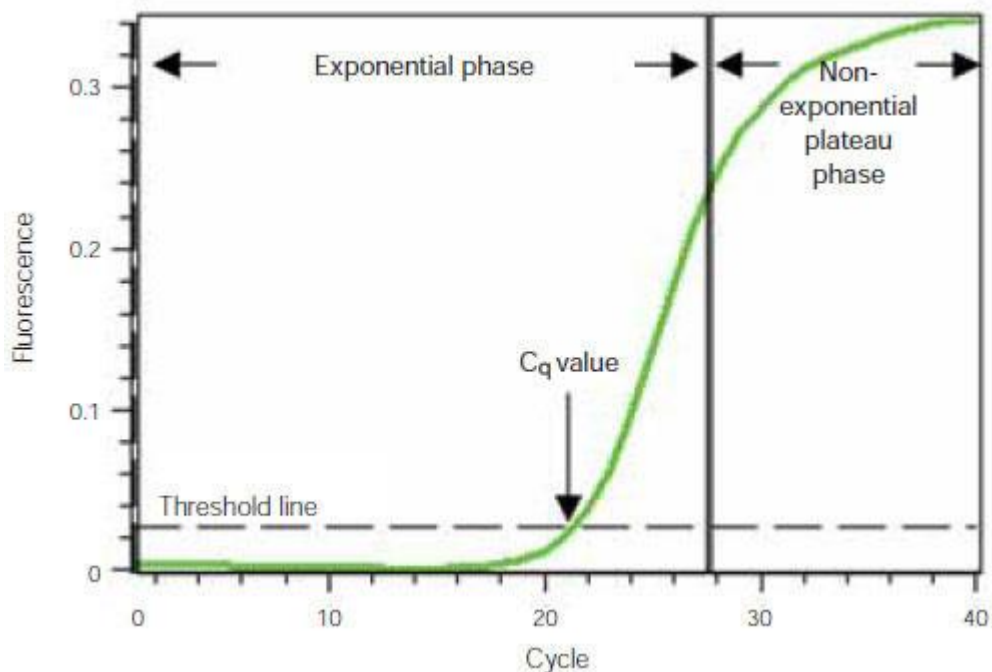


FIGURA 10: (Real Time applications Guide- Bio-rad).

### 3.8.2 Alcune definizioni riguardanti la real-time rt-PCR

*Baseline*: La *baseline* della real-time PCR si riferisce al livello di segnale durante i primi cicli della PCR, di solito tra 3 e 5, nei quali c'è un piccolo cambiamento di fluorescenza. Il segnale della *baseline*, che di solito è piuttosto basso, può essere definito come rumore di fondo della reazione. Questa linea viene determinata per ogni reazione di PCR in modo automatico oppure da parte dell'operatore, in modo da eliminare il rumore di fondo nei cicli iniziali di amplificazione così da permettere la



determinazione accurata del Ct.

*Threshold*: La *threshold* è il livello di segnale che riflette un aumento significativo di segnale rispetto alla *baseline* calcolata. Viene quindi impiegata per distinguere le amplificazioni rilevanti dal rumore di fondo. Di solito la *threshold* viene posizionata a 10 deviazioni standard di fluorescenza dalla *baseline*, anche se può essere posizionata in qualsiasi punto della fase esponenziale di PCR.

Ct (*threshold cycle*) o Cq (*cycle quantification*): Il Ct corrisponde al numero di cicli nel quale il segnale fluorescente incrocia la *threshold*. Il Ct è utilizzato per calcolare la quantità di RNA iniziale, in quanto il Ct è inversamente proporzionale al valore iniziale dell'RNA *target*.

Coefficiente di correlazione ( $R^2$ ): è la misura di quanto i dati si adattano bene alla curva standard. Questo valore riflette la linearità della curva standard: Idealmente dovrebbe essere di 1, anche se generalmente il valore massimo che si può ottenere è di 0,999.

*Slope*: Lo *slope* della fase log-lineare dell'amplificazione è una misura dell'efficienza di reazione. Infatti, per ottenere risultati accurati e riproducibili la reazione dovrebbe avere un'efficienza del 100%, la quale equivale ad uno *slope* di  $-3.32$ .

Curva standard: Per costruire una curva standard è necessario avere una serie di diluizioni di un campione noto. Questa curva può essere impiegata per determinare la quantità del campione target o può essere utilizzata per il calcolo dell'efficienza. Sull'asse delle x troviamo il log di ciascuna concentrazione delle diluizioni in serie e sull'asse delle Y troviamo i valori di Ct.<sup>28</sup> (Figura 11)

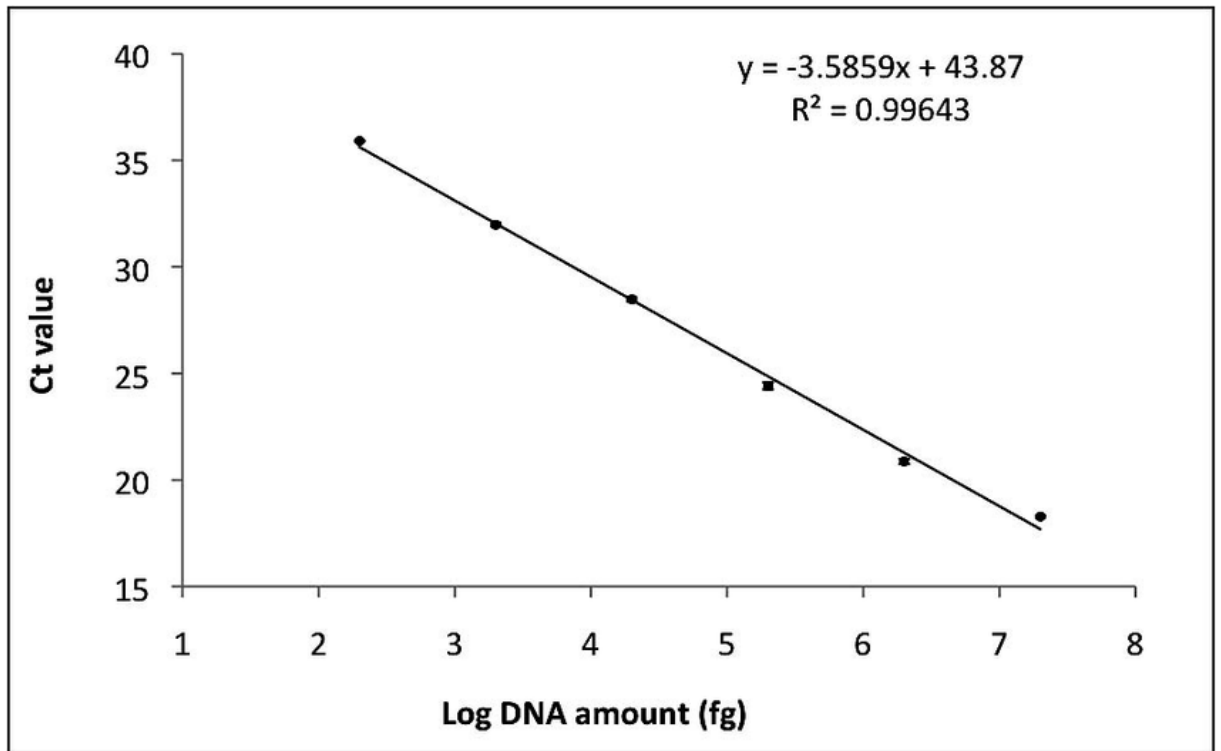


FIGURA 11: esempio di curva standard.

Basandoci quindi sull'equazione di regressione lineare ( $Y=mx + b$ ) possiamo determinare la quantità di un campione sconosciuto tramite la seguente equazione:

$$\text{Quantità} = 10^{(Ct-b)/m}$$

### 3.9 Controlli di PCR

Oltre alle sostanze e ai reagenti che abbiamo messo all'interno della mix di PCR, dobbiamo aggiungere anche i controlli di PCR, quello positivo e quello negativo.

Questi ultimi sono di fondamentale importanza in una PCR, infatti, non si può essere sicuri del risultato se prima non si sono analizzati i controlli. Il controllo positivo è costituito da un campione che contiene con certezza la sequenza ricercata. Ci si aspetta, quindi, che dia un risultato positivo e si

ottenga perciò l'amplificazione del segmento target. Nel momento in cui non otteniamo un amplificato dal controllo positivo sappiamo con certezza che qualcosa non ha funzionato nella PCR. Alcune cause possono essere per esempio l'utilizzo di reagenti scaduti o mal conservati o l'impiego di un enzima non funzionante.

Il controllo negativo, invece, non presenta quella sequenza bersaglio e quindi, una volta amplificato, ci si aspetta un risultato negativo. Di solito come controllo negativo si può impiegare della semplice acqua *RNA free*.<sup>29</sup> Inoltre, è molto importante l'impiego di un controllo interno, ovvero una sequenza sintetica diversa dal *target*, ma che viene amplificata nella stessa reazione. Questo controllo serve a verificare che la PCR non sia inibita. Per esempio nel caso di un campione negativo, questo controllo deve poter essere rilevato ad un determinato ciclo, altrimenti significa che la PCR è inibita e quindi bisogna ripeterla. Il controllo in questione può essere aggiunto prima del processo di estrazione se si vuole verificare l'assenza di inibizioni della fase di estrazione e della fase di analisi in PCR, oppure si può aggiungere prima dell'analisi in PCR per verificare l'inibizione solo di quest'ultima.<sup>30</sup>

In alternativa, l'inibizione può essere valutata, oltre che tramite il controllo interno, analizzando i campioni di RNA estratti puri e diluiti.

Durante i vari processi di concentrazione ed estrazione del virus può accadere che vi sia una perdita del virus target dovuta ai numerosi passaggi del processo analitico e ai possibili errori operativi. Per controllare questa perdita e quindi per valutare l'efficienza del processo, ogni campione viene addizionato con una quantità specifica di virus di controllo che ci permette, a fine processo, di calcolare il livello di recupero del virus.

A questo scopo abbiamo impiegato un kit che contiene un virus di controllo e i reattivi specifici per la sua rilevazione. Aggiungendo quindi una quantità identica di virus in ogni campione, processandolo e amplificandolo

poi con la *Real time* RT-PCR è possibile definire l'efficienza del processo grazie al confronto con il risultato di PCR di un campione con un'estrazione a caldo del virus di controllo.

All'inizio del processo di concentrazione abbiamo dunque aggiunto 10 µl di virus ad ogni campione da processare (controllo della resa dell'intero processo). Nella fase di estrazione abbiamo poi aggiunto 10 µl del virus di controllo, per verificare la resa della fase di estrazione. Infine si estraggono a caldo 10 µl dello stesso virus e portati al volume finale di eluizione dei campioni, utilizzato come controllo positivo per il calcolo della resa. Entrambi questi campioni verranno analizzati in Real time RT-PCR e potranno essere paragonati per osservare la quantità di recupero del virus. In linea teorica in tutti i campioni in analisi si dovrebbe rilevare la stessa quantità di virus del campione di controllo estratto a caldo.

## 4. CALCOLO DELLA RESA DI CONCENTRAZIONE/ ESTRAZIONE

L'utilizzo dei controlli di processo è fondamentale per il calcolo della resa e dell'efficienza del processo. Di seguito sono riportati 3 metodi di calcolo differenti.

### 4.1.1 Metodo numero 1

Si procede facendo una proporzione tra la concentrazione di virus di controllo messa nel campione e quella ritrovata alla fine di tutto il processo, quantificata tramite la retta standard.

La retta standard viene calcolata così:

Il primo punto della retta è rappresentato da ST1 =10 µl di virus di

controllo estratto a caldo + 90 µl H<sub>2</sub>O RNAasi *free* se il volume di eluizione dell'estrazione è 100 µl. Gli altri punti sono diluizioni 1:10 del ST1. Il primo punto della retta rappresenta una resa del 100% perché tutto il virus inoculato nel campione (10 µl) si ritrova in 100 µl alla fine del processo di estrazione.

La quantità di virus recuperato va però modulata secondo il rapporto tra volume concentrato e volume estratto, in quanto l'inoculo viene effettuato sull'intero campione che poi viene concentrato in un certo volume e, di questo volume concentrato, solo una parte viene sottoposta all'estrazione dell'RNA virale.

Se invece si estrae tutto il campione questo passaggio non serve.

Il calcolo della percentuale di recupero è fatto con la seguente formula:

$$\text{SQ inoculata: SQ rilevata sul campione} \times R = 100: X$$

$$\mathbf{X = (SQ rilevata sul campione \times R \times 100) / SQ inoculata)}$$

Dove:

SQ = starting quantity

R = rapporto di concentrazione (Volume concentrato/ Volume estratto)

X = percentuale di recupero

#### 4.1.2 Metodo numero 2

Si basa sulla differenza tra Ct del campione e il Ct del primo punto della retta standard di cui abbiamo parlato nel metodo numero 1.

Per questo metodo si parla di una stima della percentuale di recupero, che però non tiene conto del rapporto di estrazione.

Se i Ct sono identici, questo significa che la resa è del 100% perché tutto il virus inoculato nel campione (10 µl) si ritrova in 100 µl alla fine del processo di estrazione. (Tabella 2). Per differenze di Ct maggiori si può dire che vi siano state delle inibizioni o perdita di acidi nucleici nei vari passaggi, più o meno importanti.

Per un'efficienza di estrazione < 1% si consiglia di ripetere l'estrazione.

Fluorescenza target	$\Delta Ct$	Efficienza di estrazione (percentuale di recupero)
	Ct identici	Resa del 100%
	tra 0 e 3,3	10-100%
	3,3	10%
	tra 3,3 e 6,6	1-10%
	>6,6	< 1%
	Nessun segnale	

TABELLA 2

#### 4.1.3 Metodo numero 3

Il terzo metodo per calcolare l'efficienza dell'estrazione mette a confronto il Ct ottenuto dal campione e il Ct del controllo di processo.

La formula utilizzata è:

$$E = 2^{-\Delta Ct} \times (R)$$

In cui  $\Delta Ct = Ct \text{ campione} - Ct \text{ standard alla diluizione } 10^{-1}$

Il fattore R (rapporto di concentrazione) tiene conto della frazione di campione sottoposta ad estrazione degli acidi nucleici.

## 5. CALCOLO DELL'EFFICIENZA DI PCR

Per il calcolo dell'efficienza si può utilizzare la pendenza della curva standard di PCR attraverso l'equazione seguente:

$$\text{Efficienza} = [10^{(-1/\text{pendenza})}] - 1$$

Un'efficienza vicina al 100 % è il miglior indicatore di una PCR riproducibile e robusta. In pratica si deve cercare di ottenere un'efficienza del 90-110 %. Efficienze di reazione minori possono indicare condizioni di reazione non ottimali, presenza di inibitori etc.

## 6. RILEVAZIONE DI SARS-COV-2 MEDIANTE REAL-TIME RT-PCR CON METODO ISS

La nuova procedura impiegata dal progetto SARI per rilevare il SARS-CoV-2 prevede una reazione *one-step* di retrotrascrizione dell'RNA virale seguita da PCR. Il gene target della reazione è l'ORF-1ab (nsp14) e la reazione è monitorata in Real time mediante una sonda a idrolisi marcata FAM.


Di seguito vengono riportate le sequenze oligonucleotidiche che costituiscono i primers e le sonde impiegati nella reazione.<sup>31</sup>

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

La miscela impiegata per l'analisi con RT-qPCR viene preparata utilizzando il kit *Ag-Path-ID One-Step RT-PCR (Life Technologies)*. Il volume totale deve essere di 25 µl di cui 20 µl di mix e 5 µl di RNA del campione da analizzare.

La miscela di reazione viene definita nella seguente tabella:

STEP	PROCEDURA	DETTAGLI	
1	 Preparazione della miscela di reazione	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
	1. Secondo questa tabella Preparare la MasterMix RT-PCR per il numero di reazioni richieste  2. Aggiungere 5 µL di template		



I campioni sono analizzati in duplicato per rilevare eventuali falsi negativi nei campioni con bassa quantità di RNA virale.

Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

STEP	PROCEDURA	DETTAGLI			
2	Profilo Termico		N cicli	temperatura	tempo
		Trascrizione inversa	1	50 °C	30'
		Inattivazione RT	1	95°C	10'
		amplificazione	45	95°C  60°C	15"  45"

## 6.1 Interpretazione dei risultati con metodo ISS

Affinchè i risultati siano validabili, le *threshold* di PCR devono essere poste nell'area dove le curve di amplificazione sono parallele tra loro, ovvero nella fase esponenziale di amplificazione. Per l'interpretazione dei dati è inoltre necessario controllare visivamente che le curve di fluorescenza mostrino un andamento esponenziale, perché le matrici ambientali possono, in qualche occasione, mostrare un'elevata fluorescenza basale e quindi determinare la deriva della stessa.

Inoltre, per la quantificazione del virus e per il calcolo di efficienza, le curve standard ottimali dovrebbero avere degli *slope* compresi tra -3,1 e -3,6 e il coefficiente di correlazione di Pearson ( $R^2$ )  $\geq 0,98$ .

- I campioni sono da considerare positivi con un valore di  $CQ \leq 40$ .<sup>309</sup>

## 7. RILEVAZIONE DI SARS-COV-2 MEDIANTE REAL-TIME RT-PCR CON METODO VIASURE

Il secondo kit che abbiamo impiegato per la rilevazione di SARS-CoV-2 è il “*Viasure SARS-CoV-2 Real Time PCR detection Kit*”. Questo permette la rilevazione del virus grazie ad un “*one step*” Real time RT PCR che ha come target una regione conservata del genere *ORF1ab* e il gene *N*.

Questa PCR è basata sull’attività 5’ esonucleasica della DNA polimerasi, la qual nella fase di allungamento, taglia l’enzima *dual-labeled* separando il *quencher* dal *reporter*. La reazione che si genera è un aumento della fluorescenza direttamente proporzionale alla quantità di template ricercato.

Questo kit contiene tutte le componenti e i reattivi necessari per la Real Time PCR (*primers e probes* specifici, dNTPS, buffer di eluizione, polimerasi e trascrittasi, controllo positivo e negativo di PCR) aliquotati in un formato stabilizzato in strips da 8 pozzetti o in piastre da 96 pozzetti. Nel saggio si può impiegare un controllo di estrazione che può essere aggiunto in ciascun campione durante la fase di lisi del processo di estrazione. Questo controllo può essere impiegato per monitorare il processo di estrazione e per verificare che non vi siano inibizioni della polimerasi. Il gene *ORF1ab* è amplificato e può essere rilevato con il canale FAM, il gene *N* è amplificato e rilevato nel canale ROX e il controllo di estrazione con il canale HEX. Per effettuare la PCR si procede nel reidratare il numero dei pozzetti di cui si necessita aggiungendo 15 µl di *buffer* in ciascun pozzetto. In seguito si aggiungono 5 µl di RNA del campione nei vari pozzetti, 5 µl di controllo di PCR negativo e 5 µl di controllo positivo di SARS-CoV-2 nei pozzetti dedicati. A questo punto si possono tappare le strips dei pozzetti con gli appositi tappini. Per assicurarsi che tutto il liquido sia sceso sul fondo della provetta può essere utile battere delicatamente le *strips* sul piano di lavoro.

Infine si inseriscono le *strips* nella piastra del termociclatore, e si avvia lo strumento, impostato con le seguenti condizioni di amplificazione:

CICLI	STEP	TEMPO	TEMPERATURA
1	Trascrizione inversa	15 minuti	45°C
1	Denaturazione iniziale	2 minuti	95°C
45	Denaturazione	10 secondi	95°C
45	Annealing/allungamento	50 secondi	60°C

### 7.1 Interpretazione dei risultati con metodo Viasure

L'uso dei controlli positivo e negativo durante la PCR permette di validare la reazione: l'assenza di segnale nel controllo negativo e la presenza di segnale nel controllo positivo indicano che la reazione di PCR è avvenuta correttamente. Il controllo di estrazione (controllo interno) mi permette di verificare la corretta procedura di estrazione e il funzionamento della mix di amplificazione, oltre a verificare l'eventuale presenza di inibizioni.

- Il campione è da considerare positivo se il Ct ottenuto è inferiore a 40, indipendentemente se il controllo di estrazione mostra o no il segnale di amplificazione.
- Il campione è da considerare negativo se non vi è amplificazione per il target e se il controllo di estrazione mostra segnale positivo.
- Nel caso in cui ci sia l'amplificazione di un solo gene è possibile che il *target* sia presente in bassa quantità, sotto il LOD (limite di determinazione). I campioni con bassa carica virale normalmente risultano positivi solo per il gene N.
- I risultati sono, invece, da considerare invalidi se:
  - C'è un segnale di amplificazione nel controllo di PCR negativo o se vi è assenza di segnale nel controllo positivo di PCR.
  - Il segnale del Controllo interno è assente o  $\geq 35$ . (Tabella 3)

<b>Gene ORF1ab</b>	<b>Gene N</b>	<b>Controllo di estrazione</b>	<b>Interpretazione</b>
$\leq 40$	$\leq 40$	$\leq 40$ o assenza segnale	Valido
$\leq 40$	$\geq 40$ o assenza segnale	$\leq 40$ o assenza segnale	Inconclusivo
$\geq 40$ o assenza segnale	$\leq 40$	$\leq 40$ o assenza segnale	Inconclusivo
$\geq 40$ o assenza segnale	$\geq 40$ o assenza segnale	$\leq 35$	Valido
$\geq 40$ o assenza segnale	$\geq 40$ o assenza segnale	$\geq 35$ o assenza segnale	Invalido

TABELLA 3

# 8. RISULTATI E DISCUSSIONE

## 8.1 ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

Per valutare i risultati ottenuti dalle prove sperimentali di confronto tra le diverse tecniche analitiche abbiamo utilizzato i seguenti criteri:

1. Precisione
2. Variabilità
3. Accordo

La precisione dei risultati ottenuti è espressa con i seguenti parametri:

- Ripetibilità: esprime la concordanza tra i valori ottenuti da prove indipendenti effettuate in condizioni di ripetibilità, ovvero prove condotte da un singolo analista, in un breve intervallo di tempo, sugli stessi campioni, con gli stessi metodi e lotti di reattivi/apparecchiature.
- Riproducibilità: esprime la concordanza tra i valori ottenuti da prove indipendenti ottenute in condizioni di riproducibilità ovvero utilizzando lo stesso metodo, su campioni diversi, con apparecchiature, lotti di reattivi, operatori diversi ed eventualmente in laboratori diversi.
- Recupero (o resa): è un parametro che indica la quantità di analita determinata da un metodo di analisi rispetto alla quantità totale nota, aggiunta in un campione come standard. Permette di determinare la perdita di analita durante l'analisi e quindi di esprimerne in qualche modo l'accuratezza.

La variabilità dei risultati ottenuti con le diverse tecniche è espressa tramite

i seguenti parametri:

- **Media:** è il valore intermedio compreso tra l'estremo superiore e quello inferiore nell'insieme di più valori considerati.
- **Range:** (valore minimo e valore massimo).
- **Deviazione Standard:** è un concetto statistico, più precisamente, una misura della variabilità dei dati appartenenti a un determinato insieme; esprime quindi, un valore del loro grado di diversità. Più è alta tale misura, maggiori sono le differenze numeriche fra i valori che compongono l'insieme considerato. Quando è nulla tutti i dati dell'insieme hanno identico valore.

La formula per la deviazione standard di un campione è:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

dove  $n$  rappresenta la dimensione del campione e  $\bar{x}$  la media aritmetica del campione.

- **Coefficiente di variazione percentuale (CV%):** è una misura della variabilità relativa e dunque della precisione della misura stessa. È il rapporto tra la deviazione standard e la media. Il CV è particolarmente utile quando è necessario confrontare misure di fenomeni relativi a unità di misura e grandezze differenti, poiché il coefficiente di variazione è una grandezza adimensionale.

L'accordo tra i risultati ottenuti con le diverse tecniche è calcolato come la percentuale dei risultati che sono coincidenti (accordo positivo o negativo) oppure che non sono coincidenti (deviazione positiva o negativa).

## 8.2 CONCENTRAZIONE CAMPIONI

Nel primo periodo di monitoraggio i campioni sono stati concentrati utilizzando la tecnica di PEG-precipitazione, descritta nella prima revisione del protocollo del progetto SARI (La Rosa et al., 2020). Nel secondo periodo di monitoraggio si è utilizzata la PEG-centrifugazione (WU et al, 2020), descritta anche nella seconda revisione del protocollo.

<b>Metodo Concentrazione</b>	<b>Reagenti</b>	<b>Volume di campione</b>	<b>Tempistica</b>
PEG-precipitazione (La Rosa et al., 2020)	<i>Destrano 22% (p/p)</i> <i>PEG 6000 29% (p/p)</i> <i>NaCl 5N</i> <i>NaOH/HCl 1N (per eventuali correzioni di pH)</i> <i>Cloroformio 1:4 (v/v)</i>	250 ml	24 ore
PEG-centrifugazione (Wu et al.,2020)	<i>PEG 8000 8% (p/v)</i> <i>NaCl 0.3M</i>	45 ml	3 ore

TABELLA 4: confronto tra i metodi di concentrazione dei campioni.

Il metodo PEG-centrifugazione risulta essere molto più veloce e meno impegnativo dal punto di vista manuale, cosa che permette di poter processare un maggior numero di campioni in meno tempo.

Il volume di partenza del campione è inferiore: 45 ml contro i 250 ml del primo metodo.

Tale metodo risulta, inoltre, molto più performante se si considerano i risultati ottenuti confrontando le due tecniche di concentrazione sui campioni naturali (vedi Tabelle 5,6 e 7).

Non è possibile valutare la performance della fase di concentrazione del campione separatamente alle fasi successive, in quanto si deve giungere fino alla rilevazione del *target*, di conseguenza ciò che andiamo a confrontare sono i Ct delle varie PCR.

Campione	Concentrazione	Estrazione	Target	Ct	RISULTATO
1176	PEG precipitazione	Bosphore	Orf lab	37,53	POS
			N	34,62	
	PEG centrifugazione		Orf lab	36,76	POS
			N	32,26	
1177	PEG precipitazione		Orf lab	NA	NEG
			N	NA	
	PEG centrifugazione		Orf lab	32,85	POS
			N	32,3	
773	PEG precipitazione		Orf lab	NA	NEG
			N	NA	
	PEG centrifugazione		Orf lab	NA	Deb POS
			N	38,96	
895	PEG precipitazione	Orf lab	NA	Deb POS	
		N	35,42		
	PEG centrifugazione	Orf lab	37,53	POS	
		N	36,31		
1253	PEG precipitazione	Orf lab	36,17	Deb POS	
		N	NA		
	PEG centrifugazione	Orf lab	34,2	POS	
		N	34,31		
1254	PEG precipitazione	Orf lab	NA	NEG	
		N	NA		
	PEG centrifugazione	Orf lab	34,05	POS	
		N	35,14		

TABELLA 5: confronto tra le due tecniche di concentrazione sui campioni naturali (metodo di estrazione Bosphore).



Campione	Concentrazione	Estrazione	Target	Ct	RISULTATO
1176	PEG precipitazione	Qiagen	Orf 1ab	37,07	POS
			N	34,39	
	PEG centrifugazione		Orf 1ab	35	POS
			N	34,25	
1177	PEG precipitazione		Orf 1ab	N/A	Deb POS
			N	37,18	
	PEG centrifugazione		Orf 1ab	34,2	POS
			N	33,28	
773	PEG precipitazione		Orf 1ab	N/A	NEG
			N	N/A	
	PEG centrifugazione		Orf 1ab	N/A	NEG
			N	N/A	
895	PEG precipitazione	Orf 1ab	N/A	NEG	
		N	N/A		
	PEG centrifugazione	Orf 1ab	36,38	POS	
		N	37,3		
1253	PEG precipitazione	Orf 1ab	N/A	Deb POS	
		N	36,34		
	PEG centrifugazione	Orf 1ab	INIBITO	INIBITO	
		N	INIBITO		
1254	PEG precipitazione	Orf 1ab	NA	NEG	
		N	NA		
	PEG Ccentrifugazione	Orf 1ab	35,41	POS	
		N	34,14		

TABELLA 6: confronto tra le due tecniche di concentrazione sui campioni naturali (metodo di estrazione Qiagen).

Campione	Concentrazione	Estrazione	Target	Ct	RISULTATO
1176	PEG precipitazione	Biomérieux	Orf 1ab	37,33	POS
			N	33,31	
	PEG centrifugazione		Orf 1ab	33,79	POS
			N	32,2	
1177	PEG precipitazione		Orf 1ab	NA	NEG
			N	NA	
	PEG centrifugazione		Orf 1ab	38,48	POS
			N	36,77	
773	PEG precipitazione		Orf 1ab	NA	NEG
			N	NA	
	PEG centrifugazione		Orf 1ab	38,91	POS
			N	36,2	
895	PEG precipitazione	Orf 1ab	NA	NEG	
		N	NA		
	PEG centrifugazione	Orf 1ab	37,3	POS	
		N	38,15		
1253	PEG precipitazione	Orf 1ab	37,25	POS	
		N	39,37		
	PEG centrifugazione	Orf 1ab	32,31	POS	
		N	36,93		
1254	PEG precipitazione	Orf 1ab	INIBITO	INIBITO	
		N	33,05		
	PEG centrifugazione	Orf 1ab	33,05	POS	
		N	34,05		

TABELLA 7: confronto tra le due tecniche di concentrazione sui campioni naturali (metodo di estrazione Biomérieux).

La PEG centrifugazione rileva un maggior numero di risultati positivi e i Ct relativi a ciascun gene target sono generalmente più bassi, cosa che indica una maggior quantità di RNA virale rilevato. Si fa presente che un Ct indicato come N/A (*Not Applicable*) è un risultato negativo.

### **Resa con virus di controllo (fase di concentrazione, estrazione e rilevazione RNA virale)**

Anche considerando i risultati ottenuti con il virus di controllo per valutare la percentuale di recupero, o resa di concentrazione, si evidenzia una miglior *performance* del metodo di concentrazione per PEG-

centrifugazione (vedi Tabelle 8 e 9).

PEG- precipitazione Virus di controllo	Estrazione con colonnine di silice (Bosphore)	Estrazione Biomérieux (protocollo SARI)
Resa media %	2.6%	0.8 %
Min-Max	0.35%-11.9%	0.03%-4.8%
Resa <1 %	15.9%	59.1%
Resa >1%	56.8%	27.3%
Negativi (Resa = 0)	27.3%	13.6%

TABELLA 8: confronto resa dell'intero processo analitico calcolata con il virus di controllo.

Nella tabella 8 si può osservare che il metodo di concentrazione con PEG-precipitazione risulta avere una resa media abbastanza bassa. In particolare con l'estrazione *Biomérieux*, la resa media è inferiore al criterio di accettabilità indicato nel protocollo SARI, nel quale si stabilisce che la resa del processo di estrazione deve essere almeno  $> 1\%$ . Con l'estrazione *Biomérieux* solo il 27,3% dei campioni ha avuto un valore di resa accettabile. Con il metodo di estrazione *Bosphore* si sono ottenuti risultati migliori (56,8% dei campioni accettabili), anche se si rileva un maggior numero di campioni negativi, in cui non è stato rilevato per nulla il virus di controllo (resa pari a 0).

PEG- centrifugazione Virus di controllo	Estrazione con colonnine di silice (Qiagen)	Estrazione Biomérieux (protocollo SARI)
Resa media %	4.48%	4.42 %
Min-Max	0.35%-18.36%	0.09%-14.44%
Resa <1 %	0.96% (1 su 104)	12.61% (15 su 119)
Resa >1%	99.04%	87.39%
Negativi (Resa = 0)	0%	0%

TABELLA 9: confronto resa dell'intero processo analitico calcolata con virus di controllo.

Nella Tabella 9 possiamo osservare che, utilizzando il metodo PEG-centrifugazione, le rese medie sono molto simili tra le due estrazioni (*Qiagen* e *Biomérieux*). Il numero di campioni con resa accettabile (>1%) è decisamente alto per quanto riguarda *Qiagen* (99,04%) e leggermente più basso per *Biomérieux* (87,39%). Con entrambe le estrazioni non si sono rilevati valori negativi (resa pari a 0).

**Ripetibilità del processo analitico (fase di concentrazione, estrazione e rilevazione RNA virale) calcolata sui campioni naturali.**

Nella tabella seguente si valuta la ripetibilità dell'intero processo analitico, dalla fase di concentrazione del campione alla fase di rilevazione dell'RNA virale, calcolata su 8 campioni processati ognuno due volte da uno stesso operatore. Dal momento che la fase di concentrazione è una sola, la PEG-centrifugazione, che si è stabilito essere la più performante, ciò che influirà maggiormente sulla ripetitività dei risultati saranno l'estrazione e la rilevazione dell'RNA virale.

Campioni	Gene target	Estrazione Qiagen - PCR Viasure			Estrazione Biomérieux - PCR Viasure			Estrazione Biomérieux - PCR ISS		
		Ct medio	Dev st	CV %	Ct medio	Dev st	CV %	Ct medio	Dev st	CV
2322 FB	Orf 1ab	35,73	0,28	0,79	N/A	N/A	N/A	37,37	0,19	0,51
	N	34,81	2,83	8,13	35,81	0,63	1,77			
2322 EG	Orf 1ab	34,36	1,21	3,53	N/A	N/A	N/A	37,73	0,59	1,57
	N	35,76	0,74	2,06	35,15	0,91	2,57			
2322 FD	Orf 1ab	34,53	1,22	3,55	N/A	N/A	N/A	37,58	0,87	2,32
	N	34,27	0,84	2,46	34,91	0,70	1,99			
3843	Orf 1ab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	N	36,39	0,87	2,39	N/A	N/A	N/A			
4296	Orf 1ab	34,55	0,10	0,29	39,69	2,38	5,99	N/A	N/A	N/A
	N	34,26	0,15	0,43	35,39	0,18	0,52			
4297	Orf 1ab	N/A	N/A	N/A	37,09	4,26	11,48	N/A	N/A	N/A
	N	35,94	0,71	1,99	35,77	1,79	5,00			
4464	Orf 1ab	35,22	0,25	0,72	35,77	1,94	5,42	36,90	0,80	2,15
	N	35,72	0,55	1,54	34,95	0,35	1,01			
4460	Orf 1ab	35,92	1,29	3,58	40,01	4,56	11,38	37,82	0,01	0,02
	N	35,68	2,04	5,71	N/A	N/A	N/A			

TABELLA 10: ripetibilità calcolata sui campioni naturali.

La ripetibilità migliore si ha con l'estrazione *Biomérieux* e la PCR ISS: i CV% risultano essere meno variabili (min 0.02 e max 2.32). Per quanto riguarda l'estrazione *Qiagen* e la PCR *Viasure* il range di variazione del CV% è compreso tra 0.29 e 8.13. Per l'estrazione *Biomérieux* e la PCR *Viasure* il CV % minimo è di 0.52 e il massimo di 11.48: è quindi il metodo che risulta essere più variabile.

Bisogna sottolineare che il processo analitico che comprende l'estrazione *Biomérieux* e la PCR ISS, pur risultando più ripetibile, rileva come positivi solo 5 campioni su 8, facendo pensare ad una sua minor sensibilità.

Con l'estrazione *Biomérieux*-PCR *Viasure* un solo campione risulta negativo, mentre negli altri almeno uno dei due geni target è stato rilevato, e con l'estrazione *Qiagen*-PCR *Viasure* in tutti i campioni si rileva almeno uno dei due geni target, facendo pensare quindi che sia più sensibile.

**Riproducibilità del processo analitico (fase di concentrazione, estrazione e rilevazione RNA virale) calcolata sui campioni naturali.**

Nella tabella 13 si valuta la riproducibilità dell'intero processo analitico eseguito con la PEG-centrifugazione, calcolata su 5 campioni analizzati due volte da operatori diversi.

Campioni	Gene target	Estrazione Qiagen - PCR Viasure			Estrazione Biomérieux - PCR Viasure			Estrazione Biomérieux - PCR ISS		
		Ct medio	Dev st	CV %	Ct medio	Dev st	CV %	Ct medio	Dev st	CV%
2322	Orf lab	34,70	1,14	3,28	N/A	N/A	N/A	37,56	0,63	1,69
	N	34,89	1,37	3,94	35,34	0,82	2,33			
1392	Orf lab	35,28	2,88	8,18	33,17	1,20	3,62			
	N	33,19	2,05	6,18	32,06	1,25	3,90			
1404	Orf lab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A			
	N	N/A	N/A	N/A	35,18	0,04	0,10			
1391	Orf lab	35,74	1,17	3,28	30,67	0,30	0,98			
	N	33,89	2,47	7,28	29,97	0,47	1,56			
3997	Orf lab	N/A	N/A	N/A	35,78	1,62	4,53			
	N	33,44	1,97	5,88	35,62	0,33	0,93			

TABELLA 11: Riproducibilità calcolata sui campioni naturali.

Per quanto riguarda l'estrazione *Qiagen-PCR Viasure* il CV% minimo è di 3.28 e il massimo di 8.18. Per l'estrazione *Biomérieux-PCR Viasure* il

minimo è di 0.10 e il massimo di 4.53. La riproducibilità sembra essere migliore quindi con l'estrazione *Biomérieux*, al contrario di quanto è stato rilevato per la ripetibilità. Per la *Qiagen*, invece, questi valori sono molto simili. Bisogna sottolineare che il numero di campioni utilizzati per il calcolo del CV% di riproducibilità è più basso rispetto a quelli analizzati per la ripetibilità. In ogni caso i valori di variabilità, espressi tramite il coefficiente di variazione percentuale, sono tutti piuttosto bassi, cosa che può indicare che il metodo non risente della manualità di diversi operatori, e quindi risulta essere piuttosto robusto.

Per l'estrazione *Biomérieux*-PCR ISS la riproducibilità è stata calcolata per un solo campione in quanto gli altri sono risultati negativi.

### 8.3 ESTRAZIONE RNA CAMPIONI

Metodo di estrazione	Sistema di binding	RNA Carrier	Fase di lisi	Fase di legame	Numero lavaggi	Rimozione inibitori	Tempo medio di estrazione
Qiagen (QIAamp Viral RNA Mini Kit)	Colonnin e con membrana di silice	Si	Buffer di lisi più incubazione a temperatura ambiente per 10'	2 centrifugazioni – 6000 x g per 1'	2	Incluso nel kit	20'
Bosphore (BOSPHORE Viral RNA Extraction Spin Kit)	Colonnin e con membrana di silice	Si	Buffer di lisi più incubazione a 56 °C per 10'	2 centrifugazioni -8000 rpm per 1'	2	Incluso nel kit	30'
Biomerieux (NucliSENS Magnetic Extract Kit)	Particelle di silice paramagnetica	No	Buffer di lisi (NucliSENS Lysis Buffer) a temperatura ambiente per 20'	Incubazione a temperatura ambiente per 10'	5	Non incluso nel kit di estrazione (OneStep PCR Inhibitor Removal Kit – Zymo research)	60'

TABELLA 12: confronto tra i metodi di estrazione.

Confrontando i tre metodi di estrazione si può dire che il kit di *Qiagen* è il più facile da impiegare e il suo protocollo risulta essere il più rapido (20 minuti contro i 60 minuti di *Biomérieux*). Il tempo medio di estrazione più lungo del kit di *Biomérieux* può essere spiegato dal fatto che il kit per la rimozione degli inibitori non è compreso e, dunque, tale procedura va eseguita a parte alla fine dell'estrazione. Inoltre i tempi di incubazione per la fase di lisi e quelli dei lavaggi sono maggiori. Si deve sottolineare anche che l'estrazione con *Biomérieux* comprende più passaggi manuali rispetto a *Qiagen* e, quindi, è più soggetta ad eventuali errori dell'operatore.

Le estrazioni con *Bosphore* e con *Qiagen* sono abbastanza simili, anche per quanto riguarda il sistema di *binding*, anche se l'estrazione con *Bosphore* è leggermente più lunga. Nel primo periodo di monitoraggio abbiamo utilizzato il kit di *Bosphore*, che è stato poi sostituito dal kit di *Qiagen* in quanto risultato più performante.

### **Resa estrazioni (fase di estrazione e rilevazione RNA virale)**

Sono state eseguite numerose prove sulla resa delle estrazioni per capire le caratteristiche e le differenze tra i tre metodi e quale fosse meglio utilizzare.

10 µl del virus di controllo a quantità nota sono stati aggiunti ad una aliquota di acqua sterile, oppure ad un refluo già concentrato, al quale non era stato aggiunto il virus di controllo prima della concentrazione stessa.



Prova	Virus di controllo	Matrice	Estrazione con colonnine di silice (Bosphore)		Estrazione con colonnine di silice (Qiagen)		Estrazione Biomérieux (Protocollo SARI)	
			Resa		Resa		Resa	
1	Virus di controllo (10 µl = 1,6 X 10 <sup>3</sup> U.G)	Acqua	22,5 %		Non eseguito		29,8 %	
2	Virus di controllo (10 µl = 2,11 X 10 <sup>6</sup> U.G.)	Acqua	9,7 %		Non eseguito		27,1%	
3	Virus di controllo (10 µl = 1,6 X 10 <sup>6</sup> U.G.)	Acqua	34,2 %		Non eseguito		86,8 %	
4	Virus di controllo (10 µl = 2,11 X 10 <sup>6</sup> U.G.)	Refluo concentrato 1	6,4 %	Media 5,9%	12,4 %	12,3 %	18,3 %	Media 11.52%
5	Virus di controllo (10 µl = 2,11 X 10 <sup>6</sup> U.G.)	Refluo concentrato 2	3,6 %		10,9%		6,5 %	
6	Virus di controllo (10 µl = 2,11 X 10 <sup>6</sup> U.G.)	Refluo concentrato 3	7,2 %		13,6 %		9,7 %	

TABELLA 13: confronto resa metodi di estrazione con virus di controllo.

La resa di estrazione sembra dipendere dal tipo di matrice da cui si parte e anche dal virus di controllo utilizzato, infatti con il virus utilizzato nella prima prova si sono ottenute delle rese simili con i due sistemi, anche se leggermente migliore con il sistema *Biomérieux*.

Con il virus utilizzato nella prova 2 si è avuta una resa nettamente migliore con il sistema *Biomérieux*, ma comunque intorno al 18-27%.

Con il virus utilizzato nella terza prova si è avuta una resa ottima (quasi 87%) con il sistema *Biomérieux*, e una buona resa (34.2%) anche se più bassa con il sistema delle colonnine.

In generale si può osservare come l'estrazione con *Bosphore* abbia una resa inferiore rispetto alle altre due testate, ed è per questo motivo che abbiamo deciso di non utilizzarla più e di sostituirla con l'estrazione *Qiagen*.

In questa prova si osserva anche che il metodo *Qiagen* risulta meno variabile rispetto al metodo *Biomérieux*, che abbiamo già sottolineato essere maggiormente operatore dipendente.

### **Ripetibilità dell'estrazione con target SARS-CoV-2 (fase di estrazione e rilevazione RNA virale)**

La ripetibilità della fase di estrazione è stata calcolata su 4 estrazioni di un campione di *standard* a concentrazione nota, eseguito da un unico operatore.

Standard UG/rx	Gene target	Estrazione Qiagen - PCR Viasure			Estrazione Biomérieux - PCR Viasure			Estrazione Biomérieux - PCR ISS		
		Ct medio	Dev st	CV %	Ct medio	Dev st	CV %	Ct medio	Dev st	CV
1000	Orf 1ab	28,92	1,39	4,82	29,08	0,75	2,58	32,31	0,21	0,65
	N	28,87	1,58	5,48	28,29	0,51	1,79			

TABELLA 14: ripetibilità calcolata con standard SARS-CoV-2.

I valori di CV% così calcolati sono molto bassi (<5,48%). L'estrazione *Biomérieux*-PCR ISS risulta la meno variabile, come già rilevato per la ripetibilità comprensiva anche della fase di concentrazione, al contrario di quanto avviene per l'estrazione *Qiagen*, che sembra più variabile per entrambi i geni. Tuttavia è necessario sottolineare che in questa prova è stato estratto uno standard a RNA sintetico di SARS-CoV-2, che potrebbe comportarsi diversamente rispetto ai campioni naturali, in cui è presente il

virus vero e proprio. L'estrazione *Biomérieux* con PCR *Viasure* è più variabile con il gene Orf 1ab che con il gene N.

I Ct medi non si discostano molto per le due PCR *Viasure*, ciò vuol dire che l'RNA dello *standard* è stato rilevato dalla PCR in maniera simile, mentre con la PCR ISS il valore medio di Ct è di quasi 3 cicli più alto. Questa differenza non è però rilevante, in quanto si tratta di sistemi completamente diversi.

### **Riproducibilità dell'estrazione (fase estrazione e rilevazione RNA virale)**

La riproducibilità è stata calcolata su diverse estrazioni di *standard* a RNA sintetico di SARS-CoV-2 alle concentrazioni sotto indicate, eseguite da diversi operatori nell'arco di 5 mesi.

Standard UG/rx	Gene target	Estrazione Qiagen - PCR <i>Viasure</i>			Estrazione <i>Biomérieux</i> - PCR <i>Viasure</i>			Estrazione <i>Biomérieux</i> - PCR ISS		
		Ct medio	Dev st	CV %	Ct medio	Dev st	CV %	Ct medio	Dev st	CV
167	Orf 1ab	30,80	0,72	2,33	32,25	0,69	2,15	34,08	0,88	2,58
	N	31,86	1,69	5,32	32,85	0,30	0,91			
500	Orf 1ab	28,56	1,13	3,94	31,00	0,93	2,99	32,98	0,61	1,84
	N	29,03	1,11	3,83	30,48	0,45	1,47			
1000	Orf 1ab	27,09	0,80	2,94	28,88	1,58	5,46	31,71	1,02	3,22
	N	27,68	0,93	3,37	28,33	2,02	7,14			
1667	Orf 1ab	27,00	0,64	2,37	28,69	0,58	2,02	31,33	0,06	0,19
	N	26,83	0,83	3,08	28,06	0,49	1,75			

TABELLA 15: riproducibilità del processo di estrazione calcolata con standard SARS-CoV-2.

Per quanto riguarda la PCR *Viasure*: se si estrae con Qiagen i CV% vanno da 2.33 a 5.32, con *Biomérieux* da 0.91 a 7.1. Tali dati indicano una più grande variabilità del processo per *Biomérieux*, probabilmente perchè richiede una maggior manualità, come già sottolineato e quindi i risultati

possono essere maggiormente variabili tra un operatore e l'altro.

Per la PCR ISS i CV% vanno da 0.19 a 3.22, valori più bassi rispetto alla PCR *Viasure*, come per quelli relativi alle altre fasi.

Abbiamo anche valutato la riproducibilità del processo di estrazione considerando il controllo interno di inibizione (CI), fornito con il kit per valutare il processo di estrazione ed eventuali inibizione della PCR.

Estrazione Qiagen PCR Viasure				Estrazione Biomérieux PCR Viasure			
CI	Ct medio	Dev ST	CV%	CI	Ct medio	Dev ST	CV%
26.98	26.43	1.44	5.43	25.6	26.70	2.13	7.99
26.98				26.03			

TABELLA 16: confronto riproducibilità dei metodi di estrazione calcolata su tutti i campioni con il Controllo Interno.

Il valore di Ct medio del controllo interno di estrazione calcolato su tutti i campioni (sia i naturali che i controlli di processo) è leggermente più basso per l'estrazione *Qiagen* (26.43 contro 26.70). L'estrazione *Qiagen* risulta anche più riproducibile (CV% 5.43 contro i 7.99 di *Biomérieux*).

Estrazione Qiagen PCR Viasure				Estrazione Biomérieux PCR Viasure			
CI	Ct medio	Dev ST	CV%	CI	Ct medio	Dev ST	CV%
26.98	25.51	0.65	2.55	25.6	26.45	1.73	6.6
25.61				26.31			

TABELLA 17: confronto riproducibilità dei metodi di estrazione calcolata sui bianchi di processo con il Controllo Interno.

Il valore del Ct medio calcolato solo sui bianchi di processo è più basso per l'estrazione *Qiagen* di circa 1 Ct rispetto a *Biomérieux* (25.51 contro 26.45). Questa differenza di Ct può essere dovuta a inibizioni oppure alla

perdita di RNA durante il processo di estrazione (il kit Qiagen utilizza l'RNA Carrier che il kit Biomerieux invece non ha). C'è, inoltre, una maggior variabilità tra le diverse estrazioni in *Biomerieux* (CV% 6.56 contro 2.55 di *Qiagen*). Anche considerando il controllo interno, l'estrazione di *Qiagen* sembra, quindi, più riproducibile.

Per quanto riguarda la PCR ISS, il kit non comprende il controllo interno. Per questo motivo non compare nelle tabelle 16 e 17. Se si vogliono calcolare le varie inibizioni, è necessario fare una PCR aggiuntiva.

## 8.4 RILEVAZIONE RNA VIRALE CON RT REAL TIME-PCR

Metodo PCR	Geni target	Presenza controllo interno	Efficienza	LOD	LOQ	Durata PCR
Viasure (VIASURE SARS-CoV-2 RT-PCR Detection Kit)	<i>ORF1ab</i> <i>N</i>	Si	$90\% \leq ORF\ 1ab \leq 110\%$ $90\% \leq N \leq 110\%$	$\geq 2$ c.g/ $\mu$ l (10c.g./rx)	Non indicata	1:42
ISS (AgPath-ID One-Step RT-PCR Detection Kit)	<i>ORF 1ab</i>	No	$90\% \leq ORF\ 1ab \leq 110\%$	1.46 c.g / $\mu$ l (7.3 c.g./rx)	7.35 c.g./ $\mu$ l (36,75 c.g./rx)	2:05

TABELLA 18: confronto tra i metodi di rilevazione dell'RNA virale.

Confrontando le due PCR si evidenzia che il metodo più rapido è quello di *Viasure*, con un tempo totale di PCR di 1 e 42 minuti contro le 2 ore e 5 minuti di ISS. A questo va aggiunto il fatto che *Viasure*, contenendo in ogni pozzetto tutti i componenti necessari per la reazione di PCR in forma stabilizzata, che devono solo essere idratati con il buffer, è molto più veloce come tempi di preparazione: 20- 30 minuti contro i circa 60-70 di ISS.

Inoltre la presenza del controllo interno nel kit di *Viasure* rende possibile

controllare il processo analitico e la presenza di eventuali inibizioni in un'unica reazione.

È importante sottolineare che il gene Orflab si può rilevare con entrambe le PCR, anche se il target è costituito da sequenze diverse, mentre il gene N può essere rilevato soltanto con il kit di *Viasure*.

### **Ripetibilità della fase di PCR**

La ripetibilità della PCR è stata calcolata su 3 campioni costituiti da *standard* a concentrazione nota, analizzati da un unico operatore con tre ripetizioni ciascuno. Sono stati saggiati diversi livelli di concentrazione che comprendono anche il LOD (*limit of detection*) delle PCR.

Campione	Estrazione	PCR	Media	dev St	CV%
SARS (1000 UG/rx)	Qiagen	Viasure	28,77	0,7	2,43
SARS (100 UG/rx)			31,36	0,33	1,04
SARS (10 UG/rx)			34,64	0,17	0,48
Campione	Estrazione	PCR	Media	dev St	CV%
SARS (1000 UG/rx)	Biomérieux	Viasure	28,53	0,75	2,63
SARS (100 UG/rx)			31,9	0,18	0,58
SARS (10 UG/rx)			35,71	0,44	1,24

TABELLA 19: ripetibilità PCR Viasure.

Campione	Estrazione	PCR	Media	dev St	CV%
SARS (1000 UG/rx)	Biomérieux	ISS	32,38	0,18	0,56
SARS (100 UG/rx)			36,02	0,90	2,50
SARS (10 UG/rx)			N/A	N/A	N/A

TABELLA 20: ripetibilità PCR ISS.

I coefficienti di variazione dei Ct di tutte le PCR sono molto bassi ( $0,48 \leq \text{Viasure} \leq 2,63$  e  $0,56 \leq \text{ISS} \leq 2,50$ ), dimostrando una buona ripetibilità delle PCR in entrambi i sistemi.

È da sottolineare che la PCR ISS non ha rilevato il *target* di 10 UG/rx, pur essendo entro il LOD dichiarato nel metodo, cosa che può indicare una sua minor sensibilità.

### **Riproducibilità PCR Viasure**

La riproducibilità della PCR *Viasure* è stata calcolata sui Ct di rilevazione del controllo positivo fornito dal kit, di 16 PCR eseguite nell'arco di 3 mesi da operatori diversi e utilizzando lotti diversi di reattivi diversi.

Gene Orflab		
Ct medio	Dev ST	CV%
21.87	0.45	2.08
Gene N		
Ct medio	Dev ST	CV%
23.74	0.61	2.58

TABELLA 21: riproducibilità PCR Viasure

Il CV% è più alto per il gene N che per il gene Orflab, ma in ogni caso sono paragonabili a quelli ottenuti dai calcoli per la ripetibilità della PCR, confermando che il sistema *Viasure* di rilevazione dell'RNA virale è ripetibile e riproducibile nel tempo, quindi robusto.

I Ct medi in questo caso sono molto più bassi che nella tabella della ripetibilità della PCR con *target* SARS-CoV-2, in quanto il controllo positivo (CP) di PCR fornito dal kit ha una quantità di RNA target sintetico molto più elevata rispetto allo standard utilizzato per i controlli sulle ripetibilità.

La riproducibilità della PCR ISS non è stata calcolata perché non avevamo un CP di PCR, ma verrà testata nei prossimi mesi.

### Efficienza PCR

Le prove effettuate hanno rilevato che l'efficienza delle PCR si attesta sempre sui valori indicati nella tabella 18.

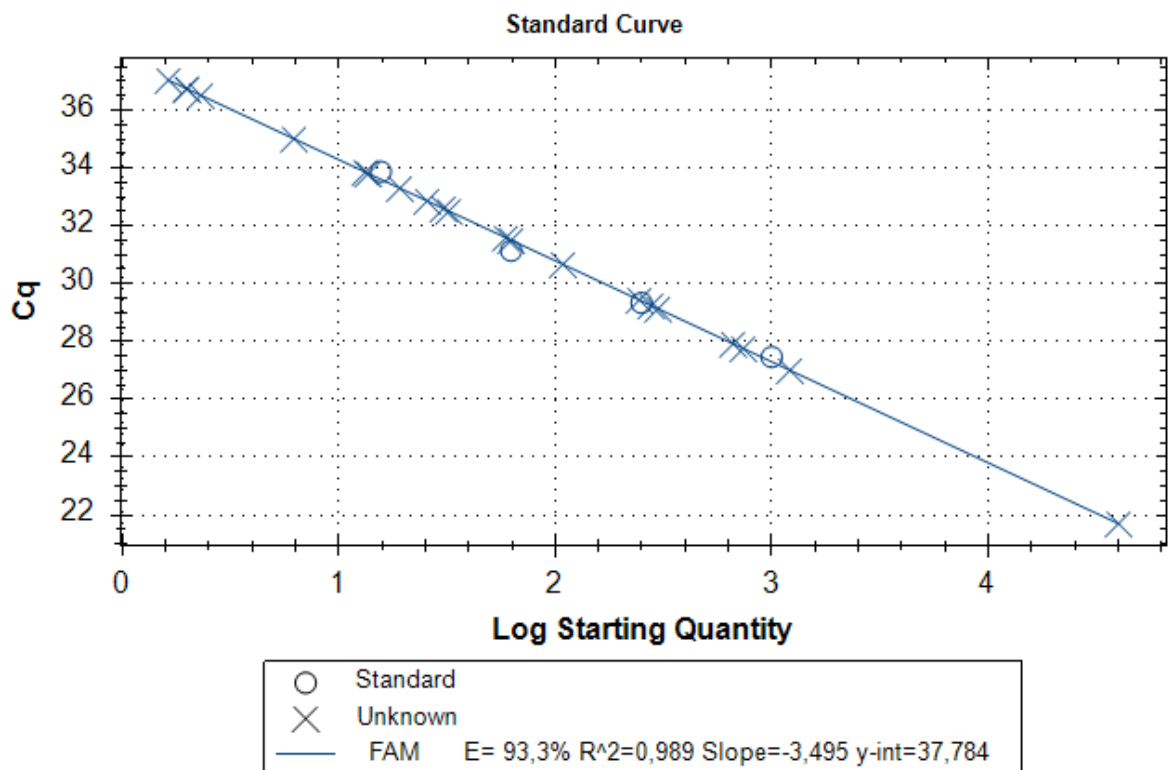


FIGURA 12: PCR Viasure



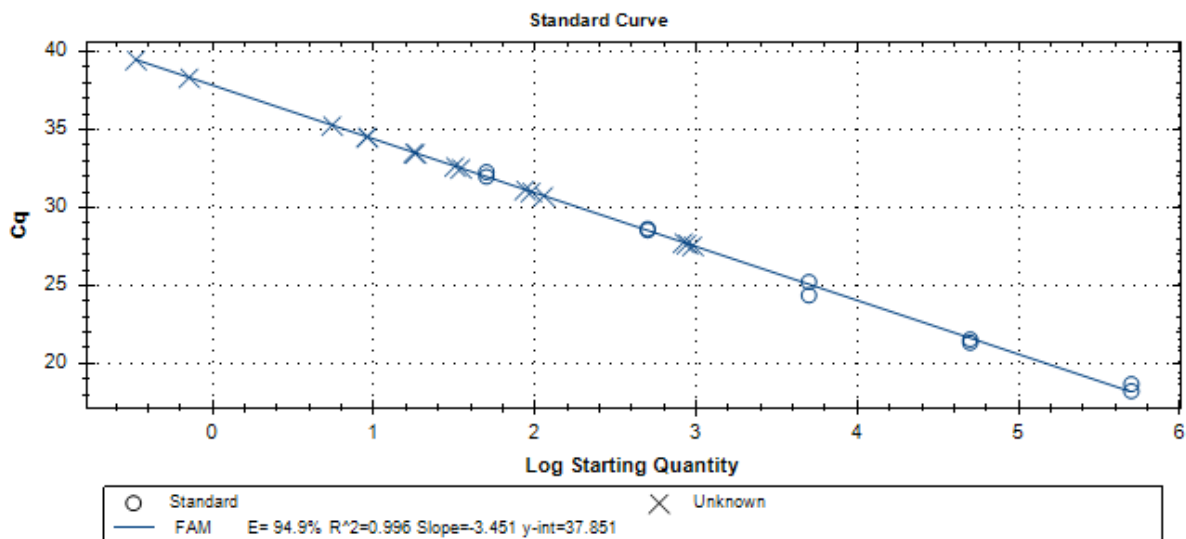


FIGURA 13: PCR ISS

## 8.5 ANALISI DEI RISULTATI OTTENUTI SUI CAMPIONI NATURALI

Nelle tabelle seguenti sono riportati i dati del confronto tra i vari sistemi testati, in termini di accordo tra i risultati ottenuti: accordo positivo e negativo, deviazione positiva e negativa.

Nella Tabella 22 è riportato il grado di concordanza dei risultati utilizzando lo stesso sistema di concentrazione (PEG-centrifugazione), due sistemi di estrazione differenti (*Qiagen* e *Biomérieux*) e la stessa PCR (*Viasure*).

Totale campioni 226		Estrazione Biomérieux	
		N° campioni +	N° campioni -
Estrazione Qiagen	N° campioni +	81 (AP)	17 (DP)
	N° campioni -	36 (DN)	92 (AN)

TABELLA 22: concordanza risultati estrazione Qiagen Vs Biomerieux e PCR Viasure.

Il numero di campioni che hanno riportato lo stesso risultato con entrambi i sistemi di estrazione è di 173 su 226, pari al 76.50 % del totale.

I risultati in termini di accordo sono così suddivisi:

Accordo positivo (AP)= 35.80%

Accordo negativo (AN)= 40.70%

Deviazione positiva *Qiagen* (DP = Qia+ / Bio -) = 7.60%

Deviazione negativa *Qiagen* – (DN = Bio+ / Qia -) = 15.90 %

L'estrazione *Biomérieux* rileva un maggior numero di campioni positivi, in particolare tra quelli a bassa contaminazione, probabilmente perchè la quantità di campione estratto è di 1000 µl di concentrato contro i 280 µl dell'estrazione *Qiagen*, che però è risultata migliore nella fase di quantificazione dei campioni positivi, in quanto probabilmente produce un RNA più concentrato e purificato (questi dati non sono presentati nella mia tesi, ma saranno oggetto prossimamente di una pubblicazione da parte di ARPA VdA)

Nella tabella 23 è riportato il grado di concordanza dei risultati utilizzando lo stesso sistema di concentrazione (PEG-centrifugazione) lo stesso sistema di estrazione (*Biomérieux*) e due PCR differenti (*Viasure* e ISS).

Totale campioni 189		Estrazione Biomérieux	
		PCR ISS N° campioni +	PCR ISS N° campioni -
Estrazione Biomérieux	PCR Viasure N° campioni +	75 (AP)	38 (DP)
	PCR Viasure N° campioni -	16 (DN)	60 (AN)

TABELLA 23: concordanza risultati estrazione Biomérieux e PCR Viasure Vs PCR ISS.

Il numero di campioni che hanno riportato lo stesso risultato con entrambi i sistemi di estrazione è di 135 su 189, pari al 71.40 % del totale.

I risultati in termini di accordo sono così suddivisi:

Accordo positivo (AP)= 39.70%

Accordo negativo (AN)= 31.70%

Deviazione positiva *Viasure* (DP = *Viasure* + / ISS -) = 20.10 %

Deviazione negativa *Viasure* (DN = ISS +/- *Viasure* -) = 8.50 %.

Il grado di accordo tra i risultati ottenuti è leggermente più alto nel confronto tra i due diversi sistemi di estrazione e la stessa PCR (*Viasure*): 76.50 % contro 71.40 %. Questo risultato può indicare che la fase di PCR influenza maggiormente la variabilità dei risultati.

Inoltre la PCR *Viasure*, confrontando i campioni estratti con lo stesso sistema Biomériuex, rileva un maggior numero di positivi rispetto alla PCR ISS:

Anche in questo caso è necessario sottolineare che i dati non concordi riguardano per lo più risultati in cui la PCR rileva RNA virale in bassa quantità, al limite della sensibilità dei vari sistemi di rilevazione (vedi LOD).

## 9. CONCLUSIONI

La concentrazione di sostanze stabili nelle acque reflue, escrete dall'uomo o associate alle loro attività, può essere utilizzata per retrostimare la loro presenza iniziale nella popolazione in questione. Questo è alla base del concetto di epidemiologia basata sulle acque reflue (WBE). WBE è stato utilizzato come strumento per ottenere informazioni sul consumo di droghe della popolazione, o per determinare il grado di esposizione della popolazione ad agenti chimici, biologici o inquinanti. L'analisi delle acque reflue è stata poi impiegata anche per monitorare la circolazione dei patogeni nel pubblico, sia per quanto riguarda i batteri che per i virus, come il SARS-CoV-2.

Di solito l'acqua viene trattenuta nella rete fognaria per un breve periodo. Per questo, l'RNA e le proteine del SARS-CoV-2 nelle acque reflue che arrivano ad un impianto di trattamento forniscono un'istantanea del numero di persone infette nella popolazione, in quanto il virus non è grado di replicarsi autonomamente all'interno di queste.<sup>32</sup>

Durante la pandemia da SARS-CoV-2, l'ARPA Valle d'Aosta si è impegnata in un nuovo progetto, denominato SARI. Lo scopo della tesi è quello di informare sul fine di tale iniziativa e di dimostrare il suo potenziale, paragonando poi i vari metodi impiegati nelle fasi analitiche.

Si è reso evidente che le analisi dei reflui urbani risultano positive al SARS-CoV-2 laddove sul territorio vi siano persone affette da COVID-19, a volte anticipando anche di due settimane la ripresa dei contagi rilevati tramite tamponi umani.<sup>33</sup> Nel grafico che segue si può osservare, infatti, come la curva dei casi positivi al SARS-CoV-2, rilevati mediante tampone, sia quasi sovrapponibile alla curva dell'RNA virale trovato nelle acque reflue del comune di Brissogne. (Figura 14)

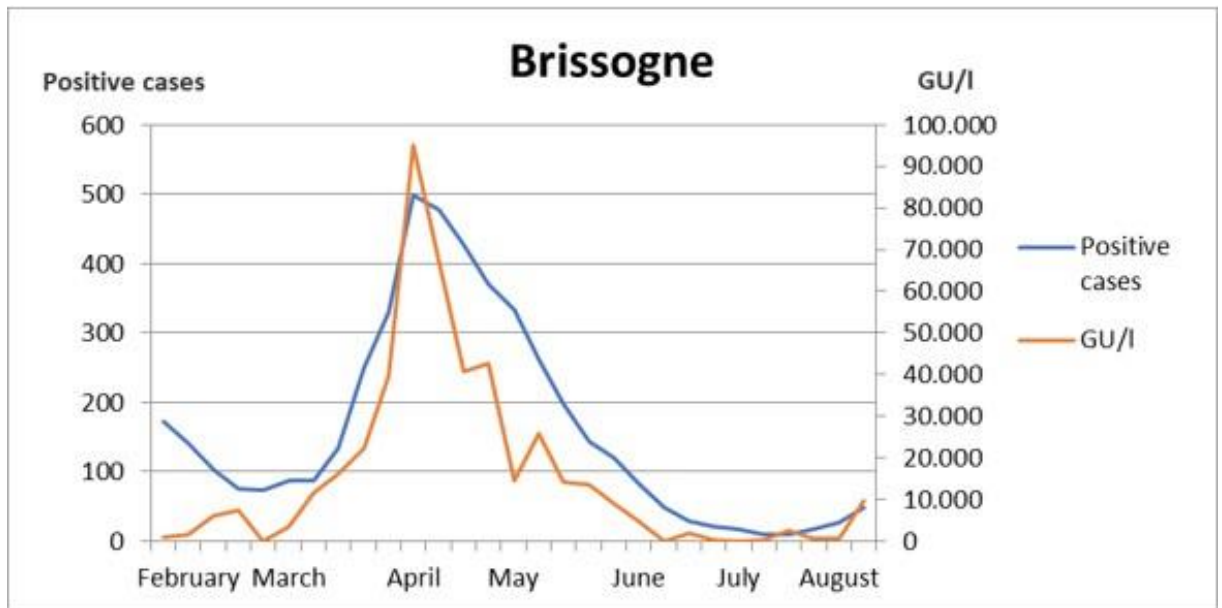


FIGURA 14: Detection of SARS-CoV-2 in sewage in the Aosta Valley: results of one year of monitoring, *Borney, M.F., Damasco, F.D., Gibellino, M.C., Grange, E.* 2021, *Academia Letters*.

Questo ci permette, attraverso l'analisi dei dati di settimana in settimana, di monitorare l'aumento dei casi o la loro riduzione e, eventualmente di implementare le misure preventive.

Durante la prima fase del processo analitico, i campioni di acqua reflua che pervengono in laboratorio possono essere pretrattati e concentrati utilizzando vari processi, come, per esempio, la centrifugazione/ultracentrifugazione, eluizione-adsorbimento del virus, filtrazione a membrana (elettropositiva o elettronegativa), ultrafiltrazione a centrifuga o precipitazione con agenti coagulanti adatti. Nonostante i numerosi studi dedicati allo sviluppo di metodologie per la concentrazione del virus, attualmente non ci sono indicazioni sull'applicazione affidabile di queste tecniche di arricchimento per i campioni di acqua. Infatti, quando si applicano questi pretrattamenti si può perdere un numero variabile di particelle virali, a seconda della natura del campione e del metodo di concentrazione adottato.<sup>32</sup>

Per quanto riguarda il nostro studio, abbiamo osservato che delle due metodiche prese in considerazione, la PEG-centrifugazione è quella che

risulta più facilmente applicabile nel nostro laboratorio. Quest'ultima, rispetto alla PEG- precipitazione, vanta tempi di processo inferiori e, essendo meno impegnativa da un punto di vista manuale, permette di analizzare un numero di campioni maggiore in un minor tempo. Inoltre risulta essere più performante. Per questo motivo, dopo una prima fase di prova con la metodica di PEG-precipitazione, questa è stata abbandonata e sostituita con la PEG-centrifugazione.

Per la fase di estrazione, in un primo momento, si è impiegato il kit di *Bosphore* che, però, è stato accantonato in quanto risulta meno performante dei kit di *Biomérieux* e *Qiagen*. In particolare questi ultimi sono abbastanza simili e permettono di ottenere risultati paragonabili. Per tale ragione, al momento, le analisi vengono portate avanti con entrambi i kit di estrazione. Attualmente, i metodi analitici per la ricerca di SARS-CoV-2 in campioni di origine umana includono le seguenti tecniche molecolari per l'amplificazione degli acidi nucleici:

- Reazione a catena della polimerasi a trascrizione inversa (RT-PCR)
- RT-PCR in tempo reale (rRT-PCR)
- Amplificazione isoterma mediata da loop di trascrizione inversa (RT-LAMP)
- RT-LAMP in tempo reale (rRT-LAMP).

Un altro approccio emergente nella quantificazione dell'RNA di SARS-CoV-2 è la PCR digitale (dPCR), che spicca per essere meno influenzata dagli inibitori della PCR, ampiamente presenti in una matrice come l'acqua reflua.<sup>34</sup>

Un'altro studio ha suggerito che la rilevazione di biomolecole, che sono già state utilizzate nella diagnostica clinica, può essere utilizzata per studiare la presenza di SARS-CoV-2 nelle acque reflue oltre alla rilevazione dell'RNA virale. Tra queste biomolecole vi sono, per esempio, le proteine del virus,

che possono fornire ulteriori informazioni a quelle ottenute dal rilevamento dell'RNA virale.<sup>35</sup>

Nel nostro caso, per l'ultima fase del processo, ovvero la rilevazione dell'RNA virale, abbiamo utilizzato la RT Real-Time PCR e abbiamo potuto concludere che per questioni di durata del processo (1 ora e 42 minuti di *Viasure* contro le circa 2 ore di ISS), per la presenza del controllo interno e per la possibilità di rilevazione di entrambi i geni, ORF *1ab* e *N*, il kit da preferire è quello di *Viasure*. Ciò nonostante, anche la PCR ISS ha dimostrato di ottenere buoni risultati, pur essendo, in qualche caso, meno sensibile dell'altro metodo.

Riassumendo, il processo analitico da noi testato è risultato estremamente robusto: tutti i metodi analizzati sono ripetibili e riproducibili in quanto i CV% risultano molto bassi. Anche le rese di processo sono più che soddisfacenti.

In conclusione, i risultati che si ottengono quotidianamente nel laboratorio dell'ARPA sono da considerare affidabili e veritieri e se inseriti nella *dashboard* predisposta dall'Istituto Superiore della Sanità, sono uno strumento estremamente efficace per la sorveglianza sistematica dei casi nella pandemia da COVID-19.

Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per migliorare ulteriormente la sensibilità e la rapidità nella rilevazione di SARS-CoV-2, per migliorare l'efficienza della preparazione del campione, la concentrazione del virus e le tecniche molecolari di amplificazione del materiale genomico del virus. Inoltre, abbiamo osservato che numerosi metodi di concentrazione e rilevamento dei virus sono stati applicati in tutto il mondo, ma è di fondamentale importanza lo sviluppo di un unico protocollo coerente, ben documentato e testato per la quantificazione di SARS-CoV-2 nelle acque reflue.

## 10. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

---

1. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. *Lake, Mary A.* 2020, *Clinical Medicine*, vol 20 n 2: 124-127.
2. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Tyrrell, D A, and M L Bynoe.* London s.n., 1996, *Lancet*, vol. 1,7428: 76-7
3. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. - *V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. et al.,* 2021, *Nat Rev Microbiol* , vol. 19,3: 155-170.
4. Genome evolution of SARS-CoV-2 and its virological characteristics. *Nakagawa, S., & Miyazawa.,* August 2020, *Inflammation and regeneration*, vol.40, 17.
5. COVID-19, molto probabile un ruolo per i pipistrelli, ma si cerca ancora l'ospite intermedio. Istituto Superiore della Sanità. 12 febbraio 2020. [https://www.iss.it/covid-19-primopiano/-/asset\\_publisher/yX1afjCDBkWH/content/covid-19-molto-probabile-un-ruolo-per-i-pipistrelli-ma-si-cerca-ancora-l-ospite-intermedio#:~:text=I%20pipistrelli%20hanno%20una%20risposta,morte%20in%20altre%20specie%20animal.](https://www.iss.it/covid-19-primopiano/-/asset_publisher/yX1afjCDBkWH/content/covid-19-molto-probabile-un-ruolo-per-i-pipistrelli-ma-si-cerca-ancora-l-ospite-intermedio#:~:text=I%20pipistrelli%20hanno%20una%20risposta,morte%20in%20altre%20specie%20animal.)
6. Da SARS-CoV-2 alle sue varianti: struttura e trasmissibilità di un virus che si evolve. *Nicolini, Ylenia,* Mondadori Education. [https://www.mondadorieducation.it/covid19escienze/da-sars-cov-2-alle-sue-varianti-struttura-e-trasmissibilita-di-un-virus-che-si-evolve/.](https://www.mondadorieducation.it/covid19escienze/da-sars-cov-2-alle-sue-varianti-struttura-e-trasmissibilita-di-un-virus-che-si-evolve/)



---

7. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, Tan KS, Wang DY, Yan Y.* 13 marzo 2020, *Military Medical Research* vol. 7,1 11.

8. Viaggio al centro del virus: com'è fatto SARS-CoV-2. Università Vita-Salute San Raffaele. 3 marzo 2020.

<https://www.unisr.it/news/2020/3/viaggio-al-centro-del-virus-come-e-fatto-sars-cov-2>.

9. La biologia strutturale per SARS-CoV-2: la proteina Spike Università Vita-Salute San Raffaele, 12 giugno 2020,

<https://www.unisr.it/news/2020/6/la-biologia-strutturale-per-sars-cov-2-la-proteina-spike>.

10. Nature Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *David Cyranoski,* 4 maggio 2020,

<https://www.nature.com/articles/d41586-020-01315-7/>.

11. Il mondo sorprendente del genoma di SARS-CoV-2: Frontiere della ricerca. *Illi Barbara,* 23 agosto 2020. Zanichelli,

<https://sibbm.zanichelli.it/italiano/2020/08/23/genoma-covid-19/>

12. COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't. *Mackenzie, J. S., & Smith, D. W.* 17 Marzo 2020, *Microbiology Australia*.

---

13. Coronavirus disease (COVID-19) Q&A. World Health Organisation. 10 novembre 2020.

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19#:~:text=symptoms>.

14. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H.* maggio 2020, *Gastroenterology*, vol. 158,6: 1831-1833.e3.

15. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *Chen Y, Chen L, Deng Q, Zhang G, Wu K, Ni L, Yang Y, Liu B, Wang W, Wei C, Yang J, Ye G, Cheng Z.* giugno 2020, *J Med Virol.*, vol. 92,7: 833-840.

16. SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Foladori, P., Cutrupi, F., Segata, N., Manara, S., Pinto, F., Malpei, F., Bruni, L., & La Rosa, G.,* 2020, *The Science of the total environment*, vol 743: 140444.

17. Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. *Jones DL, Baluja MQ, Graham DW, Corbishley A, McDonald JE, Malham SK, Hillary LS, Connor TR, Gaze WH, Moura IB, Wilcox MH, Farkas K.* 20 dicembre 2020, *Sci Total Environ*, vol. 749: 141364.

---

18. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Randazzo, Walter et al.* 2020, *Water research*, vol. 181: 115942.

19. Sorveglianza di SARS-CoV-2 in reflui urbani, Protocollo progetto SARI rev 1. *Giuseppina La Rosa, Marcello Iaconelli, Lucia Bonadonna, Elisabetta Suffredini* Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità e Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità pubblica, Istituto Superiore di Sanità.

20. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *FQ Wu, A Xiao, JB Zhang, XQ Gu, WL Lee, K Kauffman, WP Hanage, M Matus, N Ghaeli, N Endo, C Duvallet, K Moniz, TB Erickson, PR Chai, J Thompson, EJ Alm.*, 21 Luglio 2020, *mSystems* vol. 5,4 e00614-20.

21. ISO 22174 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens- General requirements and definitions.

22. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. The Department of Vaccines and Biologicals, World Health Organization. 2003. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67854/WHO\\_V-B\\_03.03\\_eng.pdf;sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67854/WHO_V-B_03.03_eng.pdf;sequence=1)

23. Qiagen. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. 2020.

24. Biomérieux. NucliSENS Magnetic Extraction Reagents.

- 
25. OneStep PCR Inhibitor Removal Kit ZYMO RESEARCH Protocol version 2.0.2
  26. Bosphore, Anatolia Geneworks. Viral RNA Extraction Spin Kit User Manual. Maggio 2019.
  27. Real Time Application guide BIORAD.
  28. Real Time PCR Handbook, Applied Biosystems.
  29. PCR: reazione a catena della polimerasi – Upbiotech, 24 agosto 2017, <https://upbiotech.wordpress.com/2017/08/24/pcr-reazione-a-catena-della-polimerasi/>.
  30. Viasure CerTest Biotec, Real Time PCR Detection Kits, SARS-CoV-2.
  31. SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: evidence from 2 environmental monitoring, *Giuseppina La Rosa, Pamela Mancini , Giusy Bonanno Ferraro , Carolina Veneri, Marcello Iaconelli, Lucia Bonadonna , Luca Lucentini, Elisabetta Suffredini.*, 2020, The Science of the total environment vol. 750: 141711.

---

32. Coronavirus in water media: Analysis, fate, disinfection and epidemiological applications. Antonio Buonerba, Mary Vermi Aizza Corpuz, Florencio Ballesteros, Kwang-Ho Choo, Shadi W. Hasan, Gregory V. Korshin, Vincenzo Belgiorno, Damià Barceló, Vincenzo Naddeo, 2021, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 415.

33. Detection of SARS-CoV-2 in sewage in the Aosta Valley: results of one year of monitoring, *Borney, M.F., Damasco, F.D., Gibellino, M.C., Grange, E.* 2021, *Academia Letters*, Article 3272.

34. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *M.Sidstedt, P.Rådström, J.Hedman,* 2020, *Anal. Bioanal. Chem.*, pp.2009-2023.

35. Wastewater-based epidemiology to monitor COVID-19 outbreak: present and future diagnostic methods to be in your radar, *D. Barceló,* 2020, *Case Stud. Chem. Environ. Eng*, volume 2.