

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

Contract nr. 24SOL / 17.07 / 2020

Dezvoltarea în regim de urgență a unor instrumente moleculare pentru evaluarea emergenței și re-emergenței COVID-19

Contractor: INCDMM Cantacuzino

Cod fiscal: 15203810

Coordonatorul proiectului: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară "Cantacuzino"

Partenerii din Consorțiul AcvaCov

Nr. crt.	Denumirea instituției	Rol în proiect	Responsabil proiect
1	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „CANTACUZINO” (IC)	CP	CSI Opreșan Gabriela
2	Institutul de Biochimie al Academiei Romane (IBAR)	P1	CSII Popescu Costin-Ioan
3	Spitalul Clinic Militar de Urgență „Dr. I. Czihaș” Iași (SCM Iași)	P2	Biol. Ichim Daniela Luminița
4	Spitalul Universitar de Urgență Militar Central „Dr Carol Davila” (SUUM)	P3	Dr. Taubner Corina
5	Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale “Dr V Babes” București (SVB)	P4	Conf. Univ. Dr. Florescu Simin Aysel
6	Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca (UMF Cluj)	P5	Dr. Pop Laura
7	Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș Timișoara (UMF Timi)	P6	Conf. Univ. Dr. Popovici Emilian
8	ICA Reserch&Development (ICA)	P7	CSIII Ciric Alexandru Ionuț

Director proiect dr. CSI Gabriela Rodica Opreșan

Termen: 15.12.2020

1. Obiectivul proiectului

Proiectul vizează evaluarea unui model microbiologic și epidemiologic de screening al apelor reziduale care să servească sistemului de sănătate publică pentru documentarea unor proceduri naționale de monitorizare a circulației SARS-CoV-2 în mediu.

2. Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului.

- Elaborarea unui Protocol de evaluare a prezentei SARS-Cov-2 in mediu acvatic și crearea unei baze de date privind probele recoltate și a unei bănci de probe
- Elaborarea protocolului de testare și validare a metodologiei de evaluare a prezentei SARS-Cov-2 in mediu acvatic: evaluarea protocoalelor de concentrare a apelor, evaluarea metodelor de extracție a acizilor nucleici, stabilirea controalelor pozitive (martor de referință, amplicon, ARN, virus surogat, proba pozitivă) și negative pentru testele moleculare, stabilirea unui protocol de amplificare a SARS-Cov-2 prin RT-PCR calitativ și cantitativ și a genelor virale țintă, dezvoltare unui protocol de amplificare izotermală LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) realizată de P1 (IBAR) ca metoda alternativă rapidă de detecție a acizilor nucleici, evaluarea sensibilității și specificității acestor metode și ajustarea protocoalelor, în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare
- Testarea operațională a sistemului la nivel național: recoltarea probelor din zonele geografice reprezentative ale țării și din zone unde se semnalează cazuri pozitive sau focare și distribuția acestora în consorțiu: aplicarea metodelor de concentrare a apelor stabilite, extracția acizilor nucleici

din probele de apa concentrate sau din filtre, testarea si validarea metodelor de amplificare prin RT-PCR și RT-LAMP, calitativ și cantitativ, asamblarea unui kit de detectie rapida ARN SARS CoV2 din ape reziduale

- Transfer tehnologic de metode moleculare catre IMM din consortiu
- Analiza epidemiologica prin coroborarea datelor moleculare obtinute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane
- Dezvoltarea unui Plan national de supraveghere SARS-Cov-2 in ape reziduale
- Elaborarea unui articol stiintific

3. Obiectivul etapei/activitatii.

1/Structurarea unui sistem coerent de detectie a acizilor nucleici virali în ape reziduale printr-o abordare multi-instrumentală de identificare și validare.

2/Definirea unui algoritm epidemiologic de alertă precoce, de anvergură națională, bazat pe supravegherea prezenței SARS-CoV-2 în mediul acvatic din „puncte fierbinți”.

4. Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului etapei

Pentru dezvoltarea și testarea protocolului de evaluare a prezenței SARS-Cov-2 in mediu acvatic au fost preconizate următoarele rezultate:

- **Stabilirea protocolului de recoltare a apelor** - stabilirea zonelor geografice de recoltare (urbane), rurale (fantani) de la stații de epurare și spitale (influent și efluent) – tip probe (volum, număr., recoltare longitudinala, conditii de stocare și distribuire în consortiu) și caracterizarea apelor reziduale (chimic, microbiologic, compoziție materii organice etc.) realizată de P7 – ICA, IMM specializat și acreditat în analiza apelor – Protocol descris la raportarea precedentă
- **Evaluarea protocoalelor de concentrare a apelor (cu PEG, filtre, cu AI etc: CP (IC); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)**
- **Evaluarea metodelor de extracție a acizilor: CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)**
- **Stabilirea controalelor pozitive (martor de referinta, amplicon, ARN, virus surogat, proba pozitiva etc.) și negative pentru testele: CP (IC); P1 (IBAR); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)**
- **Stabilirea unui protocol de amplificare a SARS-Cov-2 prin RT-PCR și a genelor virale țintă: CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)**
- **Dezvoltare unui protocol de amplificarea izotermala LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) și optimizarea detecției ARN viral: P1 (IBAR)** ca metoda alternativa rapidă de detectie a acizilor nucleici, care poate fi efectuata in apropierea locului de recoltare, ieftina și robustași poate fi realizată de catre personal cu calificare medie.
- **Evaluarea sensibilitatii și specificitatii protocolului RT-PCR, folosind diferite gene virale tinta, prin testarea pe probele martor pozitiv (concentrat și în dilutii) și negativ, pe probe de ape recoltate în consortiu: CP (IC); P1 (IBAR); P2 (SCM Iasi); P3 (SUUM); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)**
- **Evaluarea sensibilitatii și specificitatii protocolului de amplificare LAMP, folosind diferite gene virale tinta, în paralel cu tehnica RT-PCR, prin testarea pe probele martor pozitiv (concentrat și în dilutii) și negativ și pe probe de ape recoltate în consortiu: CP (IC); P1 (IBAR); P2 (SCM Iasi); P3 (SUUM); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj)**
- **Crearea unor banci de probe de ape și a unei baze de date privind probele recoltate în cadrul consorțiului: CP (IC); P6 (UMF Tim); P7 (ICA)**
- **Recoltarea, stocare, distribuirea și înregistrarea în bazele de date a probelor de apa, conform protocolului, în functie de zonele în care apar cazuri pozitive dar și în alte: CP (IC); P1 (IBAR); P2 (SCM Iasi); P3 (SUUM); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj); P6 (UMF Tim); P7 (ICA)**
- **Concentrarea probelor de apa prin metodele stabilite zone CP (IC); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)**
- **Extractia acizilor nucleici din probele de apa concentrate sau din filtre: CP (IC); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)**
- **Testarea celor doua metode de amplificare: RT-PCR și LAMP filtre: CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj)**
- **Validarea tehnicii qRT-PCR pentru determinarea numarului de copii de virus în probele analizate: CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj)**
- **Determinarea cantitativa a virusului în probele de apa prin qRT-PCR: CP (IC); P5 (UMF Cluj)**
- **Testarea și validarea metodei de amplificare prin RT-PCR: CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)**
- **Testarea și validarea metodei de amplificare prin metoda LAMP: P1 (IBAR)**

- **Transfer tehnologic de metode moleculare catre IMM din consortiu – P7 (ICA):** CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj)
- **Analiza epidemiologica prin coroborarea datelor moleculare obtinute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane:** CP (IC); P1 (IBAR); P2 (SCM Iasi); P3 (SUUM); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj); P6 (UMF Tim); P7 (ICA)
- **Dezvoltarea unui Plan national de supraveghere SARS-Cov-2 in ape reziduale:** CP (IC); P1 (IBAR); P2 (SCM Iasi); P3 (SUUM); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj); P6 (UMF Tim); P7 (ICA)

Documente deliverabile: Raport stiintific final. SOPuri privind: privind metode de concentrare a apelor; extractia acizilor nucleici din probe de apa; privind metoda RT-PCR in probe de ape; privind dezvoltarea metodei LAMP in probe de ape. Comunicarea rezultatelor cercetarii catre forurile decidente din sanatatea publica (intalnire de lucru, simpozion). Elaborarea unui articol stiintific pt publicare intr-o revista BDI sau ISI

5, Rezumatul etapei

În vederea dezvoltării unor metode de detecție rapidă a virusului SARS-COV-2 în apele reziduale, a fost stabilit un protocol de recoltare a apelor. Au fost recoltate probe din influentul (netratat) și efluentul stației de tratare a apei uzate sau din sistemul de canalizare din spitale din Transilvania, Moldova și București și distribuite în consorțiu. Probele de apă au fost analizate din punct de vedere chimic, microbiologic, compoziție materii organice și prezența virusului SARS-COV-2. S-a constituit o baza de date și una de probe la institutia Co (INCDMM Cantacuzino). Probele au fost concentrate prin metoda bazată pe două faze de separare (metoda PEG-dextran, protocol WHO). Din motive de siguranță, înainte de concentrarea virală, probele au fost inactivate 60 min, la 60 °C. Pentru definirea sistemelor moleculare de detecție, s-a procedat la extracția ARN din probele concentrate, s-au stabilit protocoale de RT-PCR și de detecție cantitativă precum și o tehnică nouă, rapida de amplificare izotermă, RT-LAMP, care nu a mai fost utilizată pentru identificarea coronavirusurilor în apele reziduale. Au fost evaluate metode de extracție a acizilor nucleici cu două kituri comerciale și a fost stabilită o metodă de extracție rapidă a ARN viral. Pentru validarea acestor tehnici au fost stabilite controale negative (de extracție, amplificare și pentru definirea controalelor pozitive - martor de referință, amplicon, ARN, virus surrogat). Pentru stabilirea protocoalelor RT-PCR (sensibilitate, specificitate, evaluare cantitativă), au fost testați mai mulți parametri de reacție și diferite ținte virale (genele orf1ab, E, RdRP, S și N). Spre deosebire de RT-PCR, amplificarea prin RT-LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) necesită 6 primeri și o temperatură constantă. Pozitivarea reacției produce o scădere de pH care este detectată colorimetric.

Au fost realizate SOP-uri privind metodele RT-PCR calitativă și cantitativă de detecție a ARN Sars-Cov-2 in probe de ape și metoda RT-LAMP. Această metodă necesită optimizare. În urma aplicării metodelor moleculare asupra concentratelor de apă reziduală și a coroborării acestor date cu cele privind incidența cazurilor de COVID-19, a fost elaborat un **Plan national de supraveghere SARS-Cov-2 in ape reziduale**. Comunicarea rezultatelor cercetarii s-a făcut prin două publicații (P5), un poster (Co) și cu ocazia evenimentului on-line, organizat de către UEFISCDI pe 10 decembrie.

S-a realizat transfer de metode moleculare către P7 (ICA).

Este în curs de elaborare articol științific privind metodele dezvoltate.

Activitățile desfășurate în cadrul proiectului au fost următoarele:

Stabilirea protocolului de recoltare a apelor care presupune (toți partenerii) - stabilirea zonelor geografice de recoltare (urbane), rurale (fantani) de la stații de epurare și spitale (influent și efluent) – tip probe (volum, număr., recoltare longitudinală, condiții de stocare și distribuție în consorțiu) și caracterizarea apelor reziduale (chimic, microbiologic, compoziție materii organice etc.) realizată de P7 – ICA, IMM specializat și acreditat în analiza apelor.

Demersuri pentru aprobarea studiului conform legislatiei aflate in vigoare: Consortiul.

Înainte de a fi prelevate probe din zonele de vest (Timisoara, Arad), nord (Iasi, Suceava), centru (Cluj) si sud (Bucuresti), stabilite in cadrul consortiului, pe baza recomandarilor partenerilor din aceste zone, au fost trimise solicitari catre administratorii si managerii spitalelor, redactate de catre CP (IC) impreuna cu P7 ICA. Aceste documente solicitau permiterea accesului personalului ICA in situurile de recoltare a apei uzate (spitale COVID si non-COVID si statii de epurare apelor, atat din influent cat si din efluent). S-a procedat la recoltarea probelor numai din zonele unde a fost permis accesul.

Studiul a fost aprobat de comisiile de etica din Institutia Co (CE nr. 43 din 13.08.2020) si P6 (aprobarea Comisiei de Etică a Cercetării Științifice a UMFVBT cu Nr.31/28.08.2020).

În plus, conform cerintelor UEFISCDI, a fost creat site-ul proiectului <https://cantacuzino.mapn.ro/pages/view/268>

iar la UMF Victor Babes Timisoara, s-a realizat o pagina web a proiectului, Partener 6 : http://www.umft.ro/acvacov_908.

În urma evaluării în consorțiu a Protocolului elaborat de P7 ICA, s-a definitivat **Protocolul de recoltare a apelor reziduale (anexă depusa în platforma proiectului în etapa precedentă).**

Testarea operationala a sistemului la nivel national

Recoltarea, stocare, distribuirea si inregistrarea in bazele de date a probelor de apa, conform protocolului, in functie de zonele in care apar cazuri pozitive dar și în alte zone – toti partenerii. Concentrarea probelor de apa prin metodele stabilite CP (IC); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)

În cadrul consortiului, au fost stabilite 34 de puncte de recoltare de catre P7, impreuna cu P2 (Iasi), P3 si P4 (Bucuresti), P5 (Cluj) si P6 (Timisoara). Operatorii instruiți P7 ICA au recoltat probele manual, cu ajutorul sondelor de prelevare, avand echipamente de protecție personală adecvate pentru a minimaliza expunerea la agenții infecțioși (inclusiv SARS-CoV-2 prezenți în apele uzate menajere). Deși se avea în vedere recoltarea longitudinala din punctele selectate, acest lucru nu a fost posibil deoarece, atât avizarea din partea administratorilor locali cât și recepționarea materialelor și reactivilor din partea furnizorilor au întârziat foarte mult. În consecință, a fost realizată o singură recoltare din zonele alese, între 5 și 15 octombrie. Criteriul de selecție a punctelor de recoltare a fost incidența crescută a Covid-19 în lunile septembrie/octombrie 2020.

Au fost folosite recipiente din sticlă (1000 ml sau 2000 ml), cu capac și au fost etichetate cu sursa și data prelevării. Probele au fost transportate la laborator în ziua recoltării, în condiții de refrigerare, ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) și ferite de lumina. Dacă durata transportului a fost mai mare de 8h s-a monitorizat temperatura.

Inactivarea virală. Aceste recipiente au fost supuse în laborator P7 procesului de inactivare virală (30 min. la 56°C) pentru a se evita transmiterea virală prin aerosoli.

Probele au fost aduse în institutia CO unde au fost înregistrate și stocate la 4°C până la procesarea prin metodele de concentrare și apoi analiza moleculară. S-a realizat stocarea probelor neprelucrate prin refrigerarea sau congelare.

Crearea unor banci de probe de ape si a unei baze de date privind probele recoltate in cadrul consortiului. CO (IC); P7 (ICA)

Institutia CO (IC) a creat o baza de date care include: codul probei primite in laboratorul Epidemiologie Moleculara, data intrarii in laborator, data recoltarii, nr flacoanelor, informatii privind tipul probei (filtrata sau nefiltrata), data intrarii in lab. Enterovirusuri din IC – pt concentrare dupa metoda OMS, nr flacoanelor si data livrarii concentratului, data intrarii in lab proteomica pentru concentrare prin metoda filtrare/centrifugare, nr flacoanelor si data livrarii concentratului, data distribuirii concentrat metoda OMS la P1 (IBAR), la P5 (UMF Cluj) si la P7 (ICA).

P7 – ICA, IMM specializat și acreditat în analiza apelor, a caracterizat apelor reziduale din punct de vedere chimic, microbiologic, compoziție materii organice etc. Au fost analizati urmasorii parametri fizico-chimici:

- temperatura
- pH
- CCOCr mg/l; cunoasterea valorii consumului chimic de oxigen (CCO-Cr) este extrem de importantă in evaluarea gradului de poluare a apei uzate exprimand cantitatea de substante organice chimice continute in apa respectiva (max. admis pt ape reziduale 500 mg/)
- CBO5 – cantitatea de oxigen care se consumă pentru degradarea oxidativă de către microorganisme a substanțelor organice conținute, la temperatura standard (20°C) și timpul standard (5 zile) potrivit STAS 6560-82 și SR ISO 6060/96
- Azot amoniacal (NH₄⁺) – conținutul de azot sub formă de ioni de NH₄⁺ din apa uzată (STAS 8683-70) Azotul continut de apele menajere de la case provin in principal din dejectii umane (urina). duce la un consum nedorit al oxigenului din ape
- Nitriti mg/l
- Detergenți sintetici biodegradabili – conținutul de detergenți sintetici anion activi prezenți în apa uzată sub formă de alchilsulfonați de sodiu, alchisulfați de sodiu, alchilarilsulfonați de sodiu, precum și alți detergenți anionactivi
- Materii totale in suspensie mg/l
- Substanțe extractibile cu solvenți organici – conținutul de substanțe ca: grăsimi animale și vegetale, hidrocarburi (uleiuri minerale, hidrocarburi grele), compuși cu azot, insecticide, săpunuri, ceruri, rășini și gudroane care se extrag cu solvenți

Probele pozitive cu cele 3 metode de amplificare moleculara sunt mai ales cele din spitalele care tratează pacienții Covid-19 și din stațiile de epurare, numai din influent, nu și din efluent. De mentionat este faptul ca, in ziua prelevării probelor de apa uzata din Timisoara (6 oct.), au fost precipitatii abundente ceea ce explica, probabil, lipsa semnalului pozitiv in toate locatiile din Timisoara, desi fusesera detectate 493 de noi cazuri in ultimile 14 zile (incidenta 1.51). In zonele cu cazuri pozitive, incidenta cazurilor Covid-19 a fost de 1.76 in Suceava, 3.66 in Iasi, 3 in Arad, 4.3 in Cluj si 3 la Bucuresti.

In literatura de specialitate au fost analizati parametrii care pot sa afecteze stabilitatea virala din apele uzate (Hamouda M et. Al. Wastewater surveillance for SARS-CoV-2: Lessons learnt from recent studies to define future applications, Science of The Total Environment, 2020, 143493, ISSN 0048-9697). Dintre acestia, temperatura pare a fi un factor foarte important. Cu cat creste temperatura, cu atat rata de inactivare a virusului creste. Cu toate acestea, s-a dovedit ca Sars-Cov-2 este mai stabil in apele reziduale decat alte virusuri envelopate. Incarcarea apei cu materii organice si particule suspendate din apele reziduale ar putea influența, de asemenea, supraviețuirea coronavirusurilor prin creșterea șanselor ca virusurile să se adsorbe pe aceste particule și astfel să devină mai protejate.

Evaluarea protocoalelor de concentrare a apelor (cu PEG, filtre): CP (IC); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)

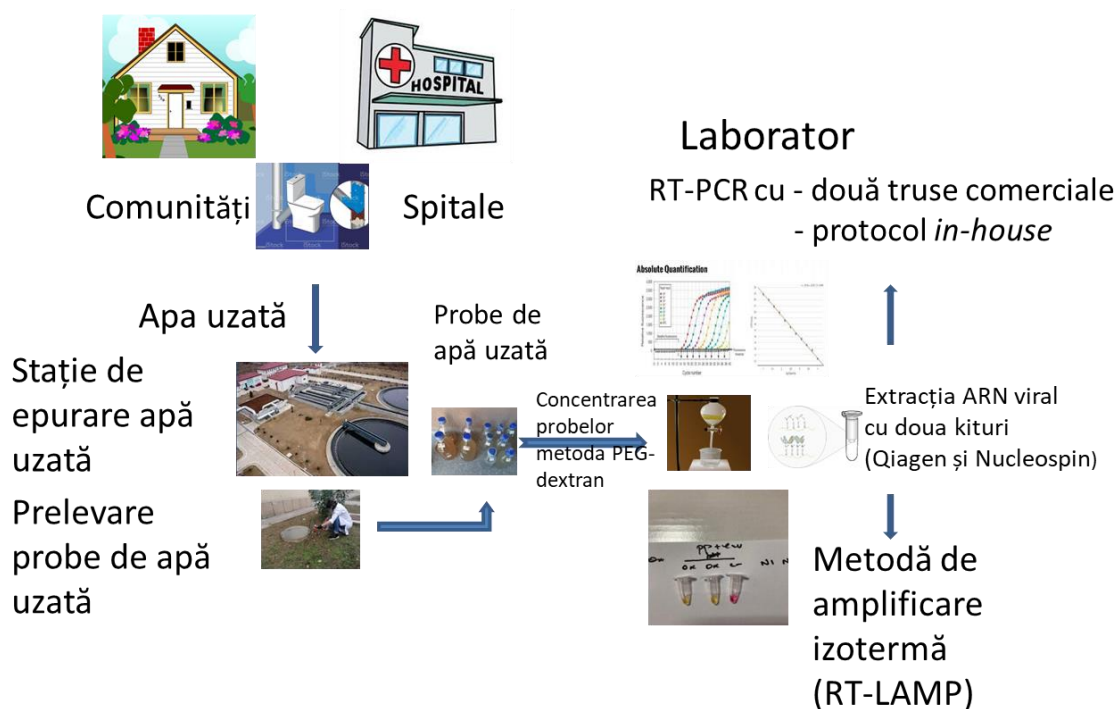
În Institutul Cantacuzino (CO) au fost testate două metode de concentrare:

1. **Metoda bi-fazică, adaptată după protocolul OMS pentru supravegherea circulației poliovirusurilor în mediu**, în laboratorul Infecției enterice virale (dr. Anda Baicuș)
2. **Concentrare prin filtrare (Centricon Plus-70 Centrifugal Filter – Sigma Aldrich)**, în laboratorul Proteomică (dr. Adrian Onu)

Partenerul P7 a asigurat transport refrigerat al probelor de apă concentrate prin metoda OMS de la CO spre partenerii din consorțiu care realizează testarea moleculară, P1, P5 (Cluj) și P7. Probele concentrate au fost stocate la 4°C pentru prelucrare rapidă sau la -70°C, pentru analiza ulterioară.

Fluxul de lucru urmează schema din imagine – Fig. 1

Circuitul apei uzate, prelevarea și analiza moleculară a probelor



Evaluarea metodelor de extracție a acizilor nucleici: CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)

Pentru extracție și purificare ARN din cele 34 de probe de apă uzată concentrate, **CO** a folosit două truse manuale pentru probe biologice umane, pentru lichide biologice fără celule: NucleoSpin

RNA Virus – Macherey Nagel si QIAamp Viral RNA Mini Kit – Qiagen. In procedura de extractie a acizilor nucleici fost inclus și un control intern, pentru a evalua existenta unor potențiali inhibitori ai reacției de amplificare. A fost inclus si un concentrat (metoda OMS) din proba de apa reziduala negativa pentru Sars-Cov-2, proba de apa furnizata de P7 pentru stabilirea controalelor negative si pozitive. Cele doua kituri de extractie utilizate au prezentat performante similare.

P1 (IBAR). ARN viral a fost extras si purificat din probele concentrate (34) prin trei metode: o metoda care utilizeaza coloane de concentrare a acidului nucleic viral (kitul NucleoSpin® Dx Virus - MACHEREY-NAGEL) si doua metode de extractie rapida: kiturile Bosphore Ex-tract dry swab RNA solution (Anatolia) si Swab: Direct lysis kit (Genesystem). ARNul viral a fost purificat urmand instructiunile producatorilor.

P5 (UMF Cluj) ARN viral dintr-un număr de 34 concentrate de probe de apă uzată, colectate în cursul lunii octombrie 2020 din influentul (netratat) și efluentul stației de tratare a apei sau din sistemul de canalizare din spitale din Transilvania (Arad, Timișoara, Cluj), Moldova (Iași, Suceava, Siret) și București si un concentrat al unei probe de apa negativa (folosita si ca martor negativ) a fost extras cu doua kituri diferite: Nucleospin DX Viral extraction kit (Macharey-Nagel) si EliGene® Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon). Pentru extractia de ARN viral s-au folosit protocoalele recomandate de fiecare producator in parte si in timpul extractiei, dupa adaugarea tamponului de liza, peste proba s-a adaugat Controlul Intern de Extractie specific (IC) pentru kitul de RT-PCR folosit.

Stabilirea controalelor pozitive (martor de referinta, amplicon, ARN, virus surogat, proba pozitiva etc.) si negative pentru testele moleculare: CP (IC); P1 (IBAR); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA)

Pentru stabilirea unor probe negative pentru SARS-CoV-2, P7 (ICA) a utilizat probe “istorice” arhivate, anterioare pandemiei si care, dupa concentrare prin metoda OMS, au fost utilizate pentru controlul negativ și pentru obținerea unor probe pozitive tip “spiked sample”. Probele negative au fost distribuite de catre CO, dupa concentrare, catre partenerii care lucreaza biologie moleculara (P1, P5 si P7).

Stabilirea unui protocol de amplificare a SARS-Cov-2 prin RT-PCR si a genelor virale țintă: CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA) , Evaluarea sensibilitatii si specificitatii protocolului RT-PCR, folosind diferite gene virale tinta, prin testarea pe probele martor pozitiv (concentrat si in dilutii) si negativ, pe probe de ape recoltate in consortiu: CP (IC); P1 (IBAR); P2 (SCM Iasi); P3 (SUUM); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj); P7 (ICA) si Validarea tehnicii qRT-PCR pentru determinarea numarului de copii de virus in probele analizate: CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj)

Institutia coordonatoare (IC) a utilizat 3 sisteme de amplificare prin RT-PCR: două truse comerciale (genesig® COVID-19 2G Real-Time PCR assay, Primerdesign™ Ltd; Allplex™ 2019-nCoV Assay, Seegene) si un protocol in-house (Corman et al, 2020; Charité/Berlin (WHO) protocol) Kitul genesig tinteste doua gene din genomul virusului Sars-Cov-2: ORF1ab si S (spike). Kitul Allplex are ca gene tinta: E (envelope), RdRP (polimeraza virala) si N (nucleocapsida)/ Protocolul in-house are ca gena tinata gena E si pt confirmare gena RdRP.

S-a determinat sensibilitatea a doua sisteme Real-Time PCR de detecție a ARN SARS-CoV-2 bazate pe amplificarea unor fragmente din genele E și RdRp (protocol Charité, Corman et al., 2020). Pentru cuantificare a fost utilizat un control pozitiv (EURM-019, European Commission Joint Research Centre), reprezentând un fragment ARN sintetic monocatenar de 880 nucleotide, ce conține țintele N1, N2 și N3 (recomandate în protocolul CDC), E și RdRp (recomandate în protocolul Charité), N (protocol al Ministerului Sănătății din Tailanda) și S (protocol al European Commission Joint Research Centre). Controlul pozitiv este furnizat de către producător la concentrația de 108 copii/μL.

Testarea sensibilității s-a realizat în duplicat pentru ambele ținte testate, E și RdRp, folosindu-se 2x100, 2x101, 2x102, 2x103, 2x104, respectiv 2x105 copii matriță/reacție. Pentru a simula condițiile caracteristice tipului de probe analizate – extracte ARN din ape uzate –, în fiecare tub de reacție au fost introduși 5 μL extract ARN probă negativă pentru SARS-CoV-2, obținut cu trusa QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen).

Rezultatele testării sensibilității arată că reacția de detecție a genei RdRp este mai sensibilă, limita de detecție fiind 20 copii/reacție, pentru seria de concentrații testate. Reacția bazată pe gena E a prezentat o sensibilitate mai scăzută, de 200 copii/reacție, pentru seria de concentrații testate (figurile 1 și 2). Coeficienții de corelație (R2) calculați pentru cele două curbe standard s-au încadrat în limita recomandată (0,9996 pentru ambele ecuații). Eficiențele calculate pentru cele două reacții analizate au fost 2 (103,31%) pentru reacția bazată pe gena E, respectiv 1,98 (98,23%) pentru reacția bazată pe gena RdRp. Eficiența crescută pentru reacția bazată pe gena E (103,31%) indică o ușoară inhibiție a reacției, tradusă prin sensibilitatea mai scăzută.

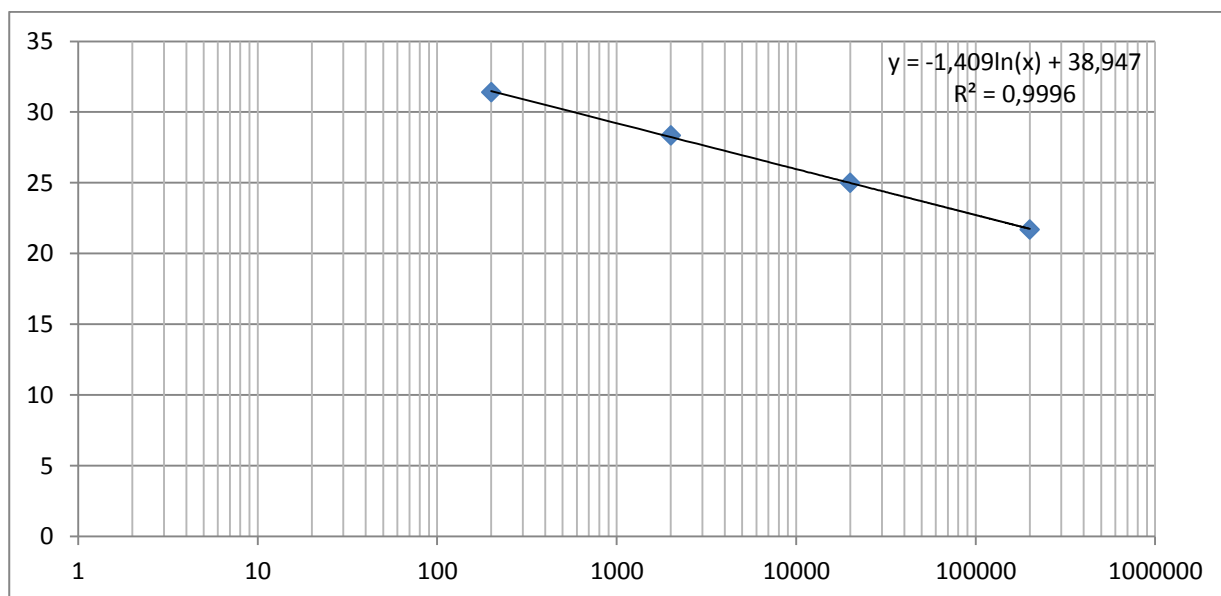


Figura 1. Curba standard utilizată pentru determinarea sensibilității reacției Real-Time PCR bazată pe gena E. Valorile de pe axa X reprezintă numărul de copii/reacție, iar valorile de pe axa Y reprezintă valorile Ct (cycle threshold). Ultima cantitate de analit detectată de reacția Real-Time PCR este 200 copii matriță ARN.

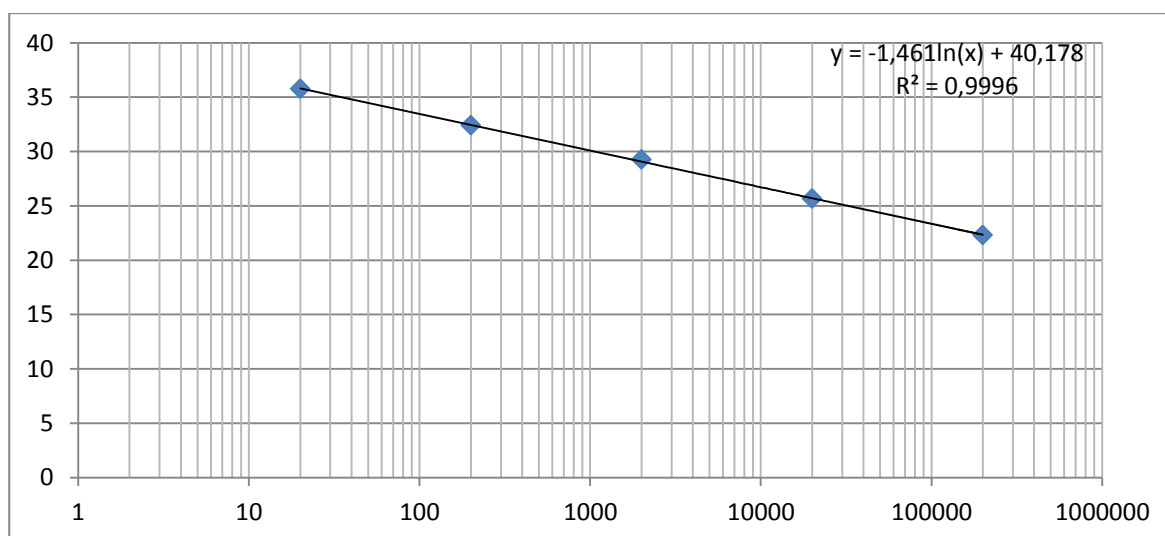


Figura 2. Curba standard utilizată pentru determinarea sensibilității reacției Real-Time PCR bazată pe gena RdRp. Valorile de pe axa X reprezintă numărul de copii/reacție, iar valorile de pe axa Y

reprezintă valorile Ct (cycle threshold). Ultima cantitate de analit detectată de reacția Real-Time PCR este 20 copii matriță ARN.

P5 (UMF Cluj) ARN viral extras din probele concentrate a fost folosit într-o reacție de RT-PCR pentru identificarea prezentei virusului SARS-COV-2 folosind kitul genesig® COVID-19 2G Real-Time PCR assay (Primer Design). Pentru experimentul de RT-PCR s-a urmat protocolul recomandat de producătorul kitului de RT-PCR.

Pentru efectuare cuantificării probelor de apă a fost folosit controlul pozitiv din kitul genesig® COVID-19 2G Real-Time PCR assay (Primer Design) și s-au făcut diluții seriata. Astfel, controlul pozitiv din kit are o concentrație de $1.7 \cdot 10^5$ copii/μl, pentru curba de calibrare am folosit următoarele concentrații: $1.7 \cdot 10^5$ copii/μl, $1.7 \cdot 10^4$ copii/μl, $1.7 \cdot 10^3$ copii/μl, $1.7 \cdot 10^2$ copii/μl, 17 copii/μl, 1.7 copii/μl, 0.17 copii/μl, 0.017 copii/μl și 0 copii/μl.

Rezultate

17 din cele 34 probe au fost pozitive pentru SARS-COV-2 la testarea prin RT-PCR, evaluând calitativ probele de apă. Prin compararea celor două metode de extracție kitul Nucleospin DX Viral extraction kit (Macharey-Nagel) a fost cel mai sensibil. (Tabelul 1)

Pentru evaluare cantitativă a probelor de apă a fost nevoie să efectuăm o curbă de calibrare pentru a putea identifica concentrația de ARN viral din probele de apă testate. Astfel în Fig.1a și Fig.2b se pot observa curbele de calibrare pentru gena ORF1ab și S testate la diferite concentrații virale ($1.7 \cdot 10^5$ copii/μl, $1.7 \cdot 10^4$ copii/μl, $1.7 \cdot 10^3$ copii/μl, $1.7 \cdot 10^2$ copii/μl, 17 copii/μl, 1.7 copii/μl, 0.17 copii/μl și 0 copii/μl). Valorile C_T a fiecărei probe a fost încadrate în curbă de calibrare folosind programul GraphPad Prism datele se pot observa în Tabelul 2 și în Graficul din Figura 1b și 2b. Figura 1c și 2c prezintă intercalarea curbelor de amplificare pentru probele identificate ca și pozitive la cuantificarea calitativă între curbele de amplificare a probelor de concentrații cunoscute.

Proba	cuantificare cantitativa		IC
	ORF1ab	S gene	
5AN	39.17	37.96	22.26
5AE			27.01
6AN	38.92		21.8
6AE			23.91
7AN	39.47		20.89
7AE	36.91		23.04
9AN	32.85	33	20.7
9AE	33.69	33.62	22.46
15BN	30.56	29.62	19.99
15BE	32.83	31.87	23.44
19CN	35.53	35.14	19.73
19CE	38.91	37.88	21.69
22CN			20.73
22CE		38.01	23.28
23CN	37.75	37.82	20.53
23CE	36.85	37.5	23.85
10AN			21.47
10AE	36.53		24.35

10+AN	34.8	34.74	21.2
10+AE	35.98	36.7	23.66
16CN	37.16		19.9
16CE			24.01
18CN	36.29	35.44	19.75
18CE			23.8
20CN	39.67		21.82
20CE	39.02	37.88	25.48
21CN	38.45	37.35	20.75
21CE			22.47
26BN	32.84	32.93	21.98
26BE	32.14	31.93	23.84
27IN		27.2	21.62
27IE			23.12
29IN		37.64	22.05
29IE			23.77
32SN	38.24		22.22
32SE	35.71	35.92	22.63

N- extractii cu kitul Nucleospin DX Viral extraction kit

E- extractii cu kitul EliGene® Viral RNA/DNA FAST IsolationKit

A – Arad; B- Bucuresti; C- Cluj; I – Iasi; S – Suceava

Tabel 2. Valorile C_T, C_T mean si concentratiei (copii/μl) pentru probele de apa pozitive

Proba	ORFlab				S gene			
	CT1	CT2	CT mean	Conc (copii/μl)	CT1	CT2	CT mean	Conc (copii/μl)
5A	39.17		39.17	0.145925	37.96		37.96	0.2615469
6A	38.92		38.92	0.164416		37.71	37.71	0.2956316
7A	39.47	37.9	38.685	0.184038		37.49	37.49	0.3294668
9A	32.85	34.7	33.775	2.235205	33	36.43	34.715	1.355324
15B	30.56	32.17	31.365	8.50896	29.62	31.13	30.375	15.09742
19C	35.53	37.44	36.485	0.544208	35.14	35.87	35.505	0.8977512
22C					38.01		38.01	0.2552379
23C	37.75		37.75	0.289881	37.82	38.31	38.065	0.2484806
10A	36.53		36.53	0.531987				-
10+A	34.8	36.62	35.71	0.807744	34.74	36.07	35.405	0.9454049
16C	37.16		37.16	0.388004				-

18C	36.29	37.09	36.69	0.490801	35.44	36.88	36.16	0.641677
20C	39.67	40	39.835	0.106571	37.88		37.88	0.2719828
21C	38.45	39.21	38.83	0.171659	37.35	37.19	37.27	0.3673693
26B	32.84	34.12	33.48	2.621382	32.93	32.89	32.91	3.578375
27I					27.2		27.2	105.6974
29I		38.42	38.42	0.209133	37.64	37.65	37.645	0.3052322
32S	35.71		35.71	0.807744	35.92	37.85	36.885	0.4450688

Dezvoltare unui protocol de amplificarea izotermala LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) și optimizarea detecției ARN viral: P1 (IBAR) ca metoda alternativa rapidă de detectie a acizilor nucleici, care poate fi efectuata in apropierea locului de recoltare, ieftina si robustași poate fi realizată de catre personal cu calificare medie si **Evaluarea sensibilitatii si specificitatii protocolului de amplificare LAMP, folosind diferite gene virale tinta, in paralel cu tehnica RT-PCR, prin testarea pe probele martor pozitiv (concentrat si in dilutii) si negativ si pe probe de ape recoltate in consortiu: CP (IC); P1 (IBAR); P2 (SCM Iasi); P3 (SUUM); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj)**

P1 (IBAR) Testarea celor doua metode de amplificare: RT-PCR si LAMP

Amplificarea si detectia ARN SARS CoV-2

Testul Allplex 2019-nCoV (Seegene, Seoul, Coreea de Sud) a fost utilizat pentru amplificarea a trei ținte virale si o gena control: a) Gena RdRP (Cal Red 610); b) Gena N (Quasar 670); c) Gena E (FAM); d) Control intern (HEX). Probele au fost analizate cu ajutorul thermocyclerului Rotor-Gene™ 6000 (Qiagen). Probele au fost considerate pozitive atunci când a fost detectat un semnal la Ct <40 pentru toate tintele. Probele au fost considerate negative cand controlul intern a fost amplificat inasa nu și genele virale.

Clonare si plasmide

S-a sintetizat de catre Twist Biosciences (US) un fragment de ADN care contine secventa genei N a izolatului SARS CoV-2 Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2) precum si doua regiuni tinta din Orflab a aceluiasi izolat. Fragmentul a fost clonat cu enzimele de restrictie XbaI si RsrII in plasmidul lentiviral pBOB-CAG-SARS CoV2-spike-HA (Addgene) compatibil cu un sistem de impachetare lentivirala de generatie III.

Productia de pseudoparticule virale

Plasmidele continand glicoproteina de anvelopa VSVG impreuna cu plasmidele de impachetare pMDLg/pRRE si pRSV-Rev si plasmidul pBOB-RNAmozaic au fost utilizate in producerea de pseudoparticule lentivirale prin transfectia liniei celulare HEK 293T. Celulele au fost transfectate cu Lipofectamina 3000 (Thermo Scientific). Supernatantele culturii de celule HEK 293T transfectate au fost recoltate dupa 48 h, centrifugate la 1000 x g /10 min, trecute prin filtru de 0.45 μm.

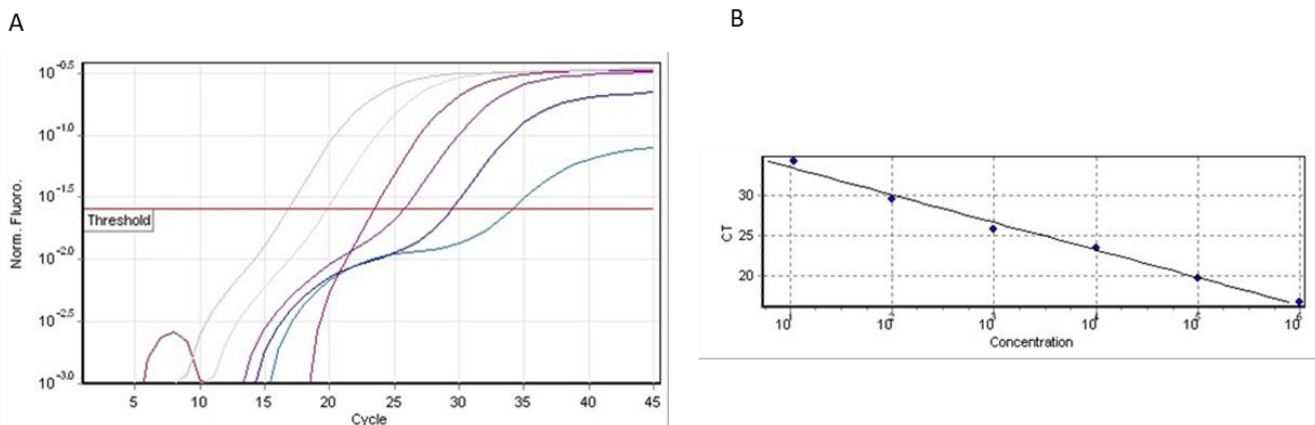
Amplificarea ARN viral prin RT-LAMP

Pentru amplificarea ARN viral prin RT-LAMP s-a utilizat kitul WarmStart colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB) urmand instructiunile producatorului. Primerii pentru reactia RT-LAMP amplifica o regiune din Orflab a SARS CoV-2 (Rabe and Cepko, 2020) si s-au folosit in urmatoarele concentratii: FIP, BIP 16 μM; F3,B3 4 μM; LF, LB 2 μM. Reactia s-a realizat la 65 °C timp de 30 min.

Rezultate

Obtinerea curbei standard pentru cunoscarea ARN viral

Pentru a optimiza metoda de detectie a ARN SARS CoV-2 in ape reziduale, s-a folosit standardul ARN EURM-019 (Joint Research Center of the European Comission) care este un ARN obtinut prin transcriptie “in vitro” si contine regiuni tinta din genele N, RdRp, E si S ale genomului viral. Pentru inceput s-au realizat amestecuri de reactie care contin $10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2$ si 10 copii de ARN monocatenar pentru a obtine curba standard de cuantificare folosita in fiecare experiment de amplificare RT-PCR ulterior (Figura 1). 6 concentratii de ARN monocatenar ($24 \times 10^3, 12 \times 10^3, 6 \times 10^3, 3 \times 10^3, 1.5 \times 10^3$ si 0.75×10^3 copii/ml) au fost realizate in cate 300 ml apa reziduala concentrata. ARNul viral a fost purificat dupa cum s-a descris in sectiunea Materiale si Metode. Cea mai mica concentratie detectata (cel putin 2 gene) a fost de 1.5×10^3 copii/ml in proba de apa reziduala concentrata. Considerand ca limita de detectie a kitului RT-PCR este de sub 10 copii RNA/reactie, se observa o pierdere substantiala (aproximativ 75%) a ARNului viral in timpul procedurii de purificare. O explicatie posibila ar fi aparitia unui precipitat abundent observant in timpul procedurii de extractie care ar putea genera diminuarea cantitatii de ARN recuperate in timpul purificarii.



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/reaction)	Calc Conc (copies/reaction)	% Var
24	■	10-1	Standard	34.12	1.10E+01	6.06E+00	44.9%
25	■	10-2	Standard	29.48	1.00E+02	1.43E+02	43.0%
26	■	10-3	Standard	25.75	1.00E+03	1.82E+03	81.7%
27	■	10-4	Standard	23.45	1.00E+04	8.68E+03	13.2%
28	■	10-5	Standard	19.84	1.00E+05	1.02E+05	2.1%
29	■	10-6	Standard	16.83	1.00E+06	7.89E+05	21.1%

Figura 1 Obtinerea curbei standard pentru cuantificarea ARN SARS CoV-2. $10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2$ si 10 copii de ARN monocatenar au fost amplificate in reactii diferite pentru a obtine curba standard de cuantificare folosind tinta E. A. Determinarea Ct pentru fiecare curba de amplificare si listarea in tabelul de mai sus. B. Verificarea linearitatii curbei standard ($CT = -3.380 \cdot \log(\text{conc}) + 36.768, R^2=0.99$)

Optimizarea reactiei RT-LAMP

O alternativa la amplificarea ADN prin reactia de PCR o constituie metodele de amplificare izoterma care nu necesita variatia temperaturii in timpul reactiei. LAMP (Loop mediated isothermal amplification) a devenit o tehnica de amplificare izoterma folosita frecvent pentru detectie rapida a acizilor nucleici (Nagamine et al, 2002). In cazul apelor reziduale LAMP a fost utilizat pentru detectia microorganismelor, dar nu si a virusurilor (Farkas et al., 2020). Astfel acest proiect, isi propune sa evalueze in premiera detectia ARN viral in ape reziduale prin RT-LAMP

Spre deosebire de PCR, LAMP presupune 2 sau 3 perechi de primeri in care prima pereche (F3, B3) hibridizeaza in faza initiala a reactiei urmate de perechile FIP/FIB si LF/LB in etapa de amplificare (Figura 2A). Detectia ampificarii se poate face in timp real sau la sfarsitul reactiei. O metoda rapida si

ieftina de detectie a reactiei de amplificare LAMP se bazeaza pe faptul ca adaugarea unei nucleotide in lantul ADN in formare este insotita de eliberarea unui proton in mediu. Astfel mediul de reactie se acidifica pe masura ce reactia de amplificare se dezvolta. Scaderea pHului se poate detecta colorimetric cu ajutorul indicatorilor de pH (de ex rosu clorofenol). In acest proiect s-a utilizat un amestec de reactie care contine un indicator de pH rosu in mediu bazic care devine galben in mediu acid (Figura 2B). Pentru a stabili limita de detectie a metodei s-au determinat prin titrarea numarului de copii ARN/reactie de la 6×10^3 la 6×10^{-1} (Figura 2B). Pragul de detectie a fost determinat la cel mult 6 copii ARN/reactie.

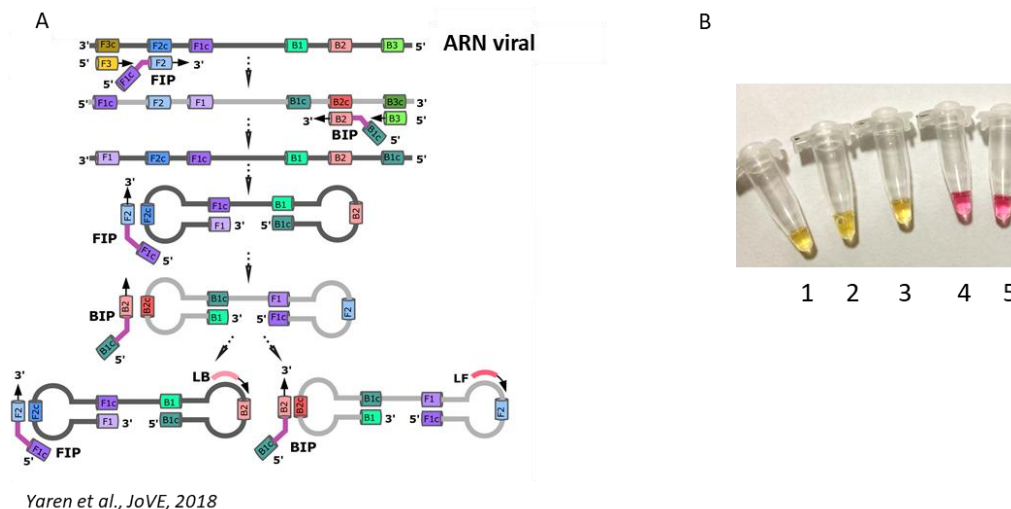


Figura 2 Amplificarea ARN SARS CoV-2 prin RT-LAMP. A. Reprezentarea schematica a reactiei de amplificare LAMP (Adaptare dupa Yaren et al., JoVe, 2018) B. S-au realizat 5 reactii RT-LAMP cu patru cantitati (1-4) de ARN viral SARS CoV-2 (6×10^3 , 6×10 , 6 , 6×10^{-1} numar copii/reactie) si control negativ (5).

Constructia virusului surogat

Pentru a optimiza protocoalele de extractie ARN SARS CoV-2 in conditii de biosecuritate de nivel 2, s-a obtinut un virus lentiviral pseudotipat care contine o nucleocapsida virala si o anelopa bilipidica cu proteine exogene (proteina G a virusului stomatitei veziculare (VSV-G) sau endogene de anelopa. Aceste pseudotipuri au fost obtinute prin transfectia celulelor HEK293T cu plasmide de expresie mamaliana a proteinelor VIH gaggol si rev, VSV-G si un plasmid prin a carui transcriptie se genereaza un ARN monocatenar care are introduse gena N si regiuni tinta din gena Orf1ab a genomul SARS CoV-2. ARNul din pseudotipurile virale a fost extras dupa cum s-a descris in sectiunea Materiale si Metode. In figura 3 se prezinta detectia ARN extras manual (Figura 3A) sau rapid (Figura 3B) amplificat prin RT-PCR (dreapta) si RT-LAMP (stanga). Pseudotipurile virale reprezinta un sistem surogat care poate fi utilizat in laboratoare BSL2.

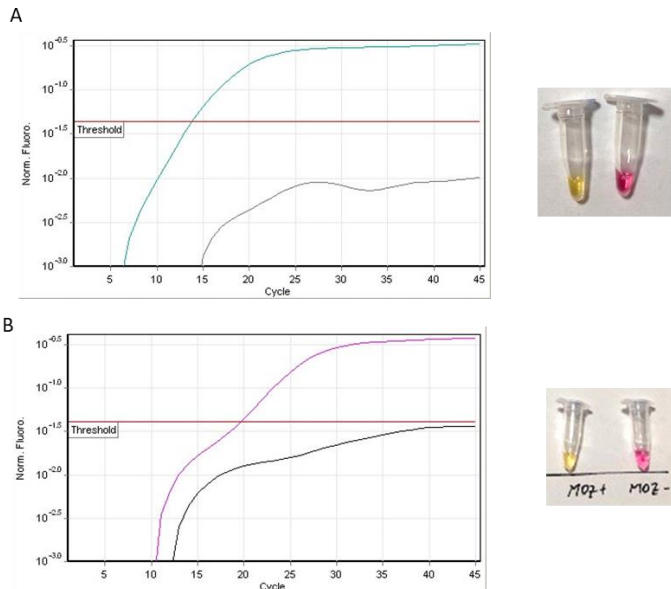


Figura 3 Construcția și validarea virusului surrogat SARS-CoV2. O producție de pseudotipuri lentivirale cu regiuni tinta SARS CoV-2 (Moz+) sau control (Moz-) au fost supuse extractiei manuale (A) sau rapide (B) și amplificării prin RT-PCR (stanga) sau RT-LAMP (dreapta).

Analiza probelor de apa reziduala prin RT-PCR

33 de probe de apa reziduala au fost supuse extractiei de ARN viral urmand amplificarea prin RT-PCR. Pentru probele 1-6 amplificarea controlului intern a esuat. S-au considerat pozitive probele in care s-au amplificat cel puțin doua tinte in ambele alicoturi ale probei. Am scos in evidenta cu galben probe in care sunt diferite de diagnostic intre cele doua alicoturi.

Proba	Orflab		E		N		IC	Sursa
	CT	nr.copii/ml	CT	nr.copii/ml	CT	nr.copii/ml		
7	0.00	0.00	35.16	55.32	32.29	29185.2	27.18	O
7'	0.00	0.00	34.41	92.35	39.1	186494.88	25.96	O
9	38.46	86.10	27.77	8,087.64	26.05	10193040	27.18	SC
9'	37.99	118.19	28.42	5,227.20	30.72	127485.6	25.96	SC
10	39.80	9.10	35.36	1,392.47	30.69	8813.64	24.13	SI
10'	0.00	1.45	37.31	423.98	31.6	5474.04	24.26	SI
10+	37.72	33.69	36.01	936.54	30.05	12312.96	23.26	SI
10+'	39.44	1,132.56	34.02	2,628.12	29.82	13910.16	22.50	SI
15	35.50	410.92	27.02	56,918.40	28.72	344124	24.68	SC
15'	33.58	1,286.47	27.14	52,852.80	28.63	373164	23.81	SC
16	0.00	0.00	33.54	863.94	36.49	246.84	23.07	O
16'	0.00	0.00	39.43	19.60	0	0	25.83	O
18	0.00	0.00	30.67	5,474.04	30.01	103092	22.51	O
18'	0.00	0.00	32.37	1,829.52	33.25	5082	23.46	O
19	39.66	34.85	31.70	2,831.40	32.33	11949.96	24.08	SI
19'	36.36	246.84	29.21	13,953.72	30.15	90895.2	23.84	SI
20	0.00	0.00	33.30	1,007.69	34.14	2221.56	28.54	S
20'	0.00	0.00	32.39	1,815.00	35.07	946.704	27.66	S
21	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0	28.13	S
21'	0.00	0.00	32.96	1,258.88	32.62	9205.68	25.99	S
23	0.00	2.47	33.10	1,148.53	33.19	5415.96	23.93	O

23'	37.25	145.20	31.85	2,555.52	32.39	11296.56	23.96	O
26	35.58	129.81	28.97	67,808.40	24.85	185856	27.00	SC
26'	0.00	3.78	28.52	89,588.40	23.47	383328	24.54	SC
28	0.00	0.00	38.85	165.53	34.28	1353.264	29.66	S
28'	0.00	0.00	38.12	258.46	34.48	1219.68	28.27	S
29	0.00	2.32	34.85	1,887.60	31.29	6432.36	24.45	SI
29'	39.37	11.91	35.14	1,582.68	30.61	9205.68	27.44	SI
32	34.64	235.22	32.13	9,902.64	29.02	21054	23.01	SC
32'	39.76	9.29	32.45	8,174.76	28.88	22651.2	26.35	SC

Tabel 1. Rezultatele amplificării probelor de apă reziduală din diverse surse (O-oras; S-spital cu specialități variate; SI-spital de infecțioase; SC – spital cu număr mare de pacienți - de campanie)

Pentru cuantificare s-a ales tinta SARS CoV-2 E deoarece încărcăturile virale determinate folosind curba standard corespunzătoare confirmă cel mai bine plaja de valori raportate în apele reziduale brute de 2×10^2 - 3×10^3 copii ARN/ml (Foladori et al., 2020). Considerând factorul de concentrare a apelor de 100, s-au detectat încărcături între 5×10^1 – 8.9×10^2 număr copii/ml. Pentru evaluarea extracției rapide s-au considerat probele în care s-a detectat semnal pozitiv pe cele trei canale și în ambele alioturi (9,10,15,19,26,32). Pentru ambele kituri s-au obținut sensibilități semnificativ reduse comparativ cu extracția manuală pentru tinte E și N. Tinte nedetectate au fost considerate CT=40.

Rezultate RT-LAMP

În paralel cu detectia prin RT-PCR s-a realizat și amplificarea RT-LAMP a ARN-ului extras manual sau rapid. Au fost identificate 4 din 15 probe pozitive folosindu-se o singură tinta pentru detectie (Orflab). Limita de detectie a metodei care a fost determinată anterior la cel puțin 6 copii ARN/reactie se corelează cu o valoare CT între 35 și 36 pentru tinta RdRp. În continuare, s-au proiectat două seturi de primeri pentru tinta N, dar nu au funcționat. Este de așteptat ca sensibilitatea metodei să crească prin introducerea tinte N care pare să aibă o eficiență de amplificare mai mare comparativ cu RdRp.

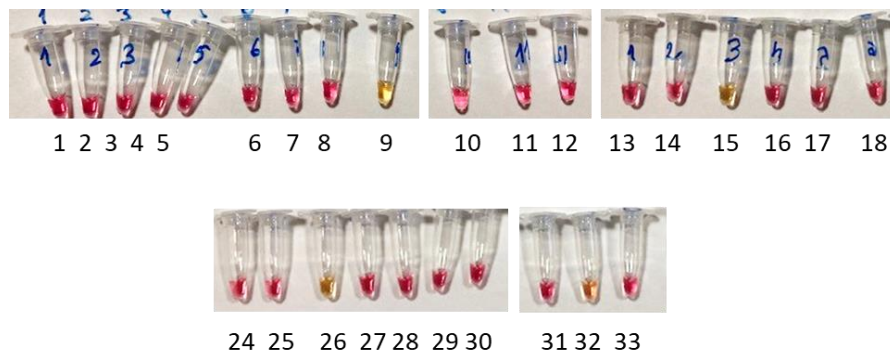


Figura 4 Rezultatele amplificării probelor de apă reziduală din diverse surse prin RT-LAMP.

Bibliografie

- Farkas K, Mannion F, Hillary LS, Malham SK, Walker DI Current Opinion in Environmental Science & Health, <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.007>.
 Foladori P, Cutrupi F, Segata N, Manara S, Pinto F, Malpei F, Bruni L, La Rosa G. Sci Total Environ. 2020;743:140444.
 Nagamine K, Hase T, Notomi T. Mol Cell Probes. 2002;16:223-9
 Rabe BA and Cepko C PNAS. 2020 ;117: 24450-24458

Transfer tehnologic de metode moleculare catre IMM din consortiu – P7 (ICA): CP (IC); P1 (IBAR); P5 (UMF Cluj)

Atat metodele de extractie a acizilor nucleici cat si cele de amplificare prin RT-PCR, inclusiv metoda izoterma RT-LAMP, au fost transferate de catre laboratoarele implicate in analiza moleculara catre IMM, P7 – ICA care a si achizitionat reactivi pentru aceste analize. De altfel, personalul P7 ICA are deja experienta in tehnica Real-Time PCR pentru analiza produselor alimentare astfel incat transferul tehnologic a putu fi efectuat fara probleme. In ipoteza continuarii acestor studii, consideram ca va putea fi transferata si tehnica de concentrare a apelor reziduale prin centrifugare/filtrare. Aceasta tehnica este in curs de aplicare pe probele de apa recoltate de P7, in laboratorul proteomica din IC si concentratele nu au fost inca testate prin biologie moleculara din motivele deja mentionate.

Analiza epidemiologica prin coroborarea datelor moleculare obtinute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane: CP (IC); P1 (IBAR); P2 (SCM Iasi); P3 (SUUM); P4 (SVB); P5 (UMF Cluj); P6 (UMF Tim); P7 (ICA)

Pe baza datelor obtinute în cadrul consorțiului, **P6 (UMF Tim)** a realizat analiza epidemiologică.

– Recoltarea probelor din zonele geografice reprezentative ale țării și din zone unde se semnalează cazuri pozitive sau focare și distribuirea acestora în consorțiu

Completarea bazei de date, actualizarea “bazinelor” de colectare a apelor reziduale in raport cu incidenta cazurilor de boală

Pentru regiunea de Vest s-au furnizat datele pentru caracterizarea manifestării epidemiologice a COVID-19 în momentul recoltării probelor de către Partenerul 7.

Arad – 10 probe recoltate în 05.10.2020 conform Procesului verbal de recoltare nr.1.

ARAD – MUNICIPIUL ARAD		Incidenta cumulativa in ultimele 14 zile, la 1000 locuitori
Temperatura ambientala in ziua recoltarii, 05.10.2020	23°C	/
Total populatie	162.450 locuitori	/
Ponderea populatiei >65 ani	14,26%	/
Total cazuri COVID 19 de la debut pana in 21.09.2020	2394	/
Total cazuri COVID 19 de la debut pana inclusiv 05.10.2020	2841	/
Nr. cazuri noi 21.09.2020	0	/
Nr. cazuri noi 22.09.2020	9	/
Nr. cazuri noi 23.09.2020	24	/
Nr. cazuri noi 24.09.2020	21	/
Nr. cazuri noi 25.09.2020	26	/
Nr. cazuri noi 26.09.2020	20	/
Nr. cazuri noi 27.09.2020	26	/
Nr. cazuri noi 28.09.2020	7	/
Nr. cazuri noi 29.09.2020	24	/
Nr. cazuri noi 30.09.2020	32	/
Nr. cazuri noi 01.10.2020	25	/
Nr. cazuri noi 02.10.2020	27	/
Nr. cazuri noi 03.10.2020	30	/
Nr. cazuri noi 04.10.2020	8	/
Nr. cazuri noi 05.10.2020	7	/
Nr cazuri noi in ultimele 14 zile (21.09-04.10.2020)	279	1,72
Nr cazuri noi in ultimele 14 zile (22.09-05.10.2020)	286	1,76
Nr cazuri noi (21.09-05.10.2020)	286	1,76 [IC pe 15 zile]

Numar focare active in Arad in 05.10.2020	2	/
R0 pe judetul ARAD in 05.10.2020	1,27 [1,18=1,34]	/

FOCARE: Ambele in Centre rezidentiale de ingrijire

ARAD – Localitati din judet	Moneasa	Incidenta cumulativa in ultimele 14 zile, la 1000 locuitori	Dezna	Incidenta cumulativa in ultimele 14 zile, la 1000 locuitori
Total populatie	967	/	1258	/
Ponderea populatiei >65 ani	20,06%	/	23,37%	/
Nr. cazuri noi 21.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 22.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 23.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 24.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 25.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 26.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 27.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 28.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 29.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 30.09.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 01.10.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 02.10.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 03.10.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 04.10.2020	0	/	0	/
Nr. cazuri noi 05.10.2020	0	/	0	/
Nr cazuri noi in ultimele 14 zile (21.09-04.10.2020)	0	0	0	0
Nr cazuri noi in ultimele 14 zile (22.09-05.10.2020)	0	0	0	0
Nr cazuri noi (21.09-05.10.2020)	0	0 [IC pe 15 zile]	0	0 [IC pe 15 zile]
Numar focare active in cele 2 localitati in 05.10.2020	0	/	0	/

Timisoara – 4 probe recoltate în 06.10.2020 conform Procesului verbal de recoltare nr.2.

TIMISOARA		Incidenta cumulativa in ultimele 14 zile, la 1000 locuitori
Temperatura ambientala in ziua recoltarii, 06.10.2020	15°C, precipitatii abundente	/
Total populatie	326.418 locuitori	/
Ponderea populatiei >65 ani	17,73%	/
Total cazuri COVID 19 de la debut pana in 22.09.2020	5516	/
Total cazuri COVID 19 de la debut pana inclusiv 06.10.2020	6009	/
Nr. cazuri noi 22.09.2020	34	/
Nr. cazuri noi 23.09.2020	40	/
Nr. cazuri noi 24.09.2020	29	/
Nr. cazuri noi 25.09.2020	37	/
Nr. cazuri noi 26.09.2020	30	/
Nr. cazuri noi 27.09.2020	15	/
Nr. cazuri noi 28.09.2020	19	/
Nr. cazuri noi 29.09.2020	37	/
Nr. cazuri noi 30.09.2020	46	/
Nr. cazuri noi 01.10.2020	33	/
Nr. cazuri noi 02.10.2020	40	/
Nr. cazuri noi 03.10.2020	31	/
Nr. cazuri noi 04.10.2020	9	/
Nr. cazuri noi 05.10.2020	46	/
Nr. cazuri noi 06.10.2020	47	/
Nr cazuri noi in ultimele 14 zile (22.09-05.10.2020)	446	1,36
Nr cazuri noi in ultimele 14 zile (23.09-06.10.2020)	459	1,41
Nr cazuri noi (22.09-06.10.2020)	493	1,51 [IC pe 15 zile]

Numar focare active in Timisoara in 06.10.2020	3 cu 35 cazuri	/
RO pe judetul Timis in 06.10.2020	1,27 [1,21=1,33]	/

FOCARE:

- Centrul de recuperare și reabilitate neuropsihiatrică Timișoara – 4 cazuri confirmate
- Spitalul clinic de urgență pentru copii “L.Țurcanu” Timișoara – 15 cazuri confirmate
- Unitate economică Timișoara - 16 cazuri confirmate

SPITAL	NR PACIENTI COVID 19 In intervalul 23.09-06.10.2020	NR TOTAL PACIENTI INTERNATI In intervalul 23.09-06.10.2020	MORBIDITATE SPITALIZATA COVID-19 in perioada mentionata
SPITAL COVID - SPITALUL CLINIC DE BOLI INFECTIOASE SI PNEUMOFTIZIOLOGIE DR.VICTOR BABES TIMISOARA	119	173	68,77%
SPITAL SUPTOR COVID -SPITALUL CLINIC C.F. TIMIȘOARA	27	71	38,03%

SPITAL	NR PACIENTI COVID 19 In intervalul 21.09-05.10.2020	NR TOTAL PACIENTI INTERNATI In intervalul 21.09-05.10.2020	MORBIDITATE SPITALIZATA COVID 19 in perioada mentionata
SCJU Arad (Sectia Boli Infectioase)	239	239	100%
SCJU Arad (Chirurgie + ATI)	403	403	100%

S-au primit date epidemiologice similare și de la Partenerul 5 pentru județul Cluj și de la Partenerul 2 pentru județul Iași (dar acestea din urmă nu permit stabilirea incidenței cumulative în ziua recoltării). S-au introdus într-un fișier de tip Excel, pentru permiterea analizei statistice, în care incidențele cumulative din momentul recoltării, au fost completate cu valorile ce lipseau, preluate din surse oficiale.

Analiza epidemiologica prin coroborarea datelor moleculare obtinute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane

1. Prelucrarea statistica a datelor - descriptivă și analitică

Baza de date s-a analizat cu ajutorul soft-ului IBM SPSS Statistics v.20. Variabilele continue numerice s-au caracterizat prin mediana și IQR iar cele de tip categorie, prin valoare și procentaj. Testarea distribuției datelor s-a realizat prin aplicarea testului Shapiro-Wilk. Compararea variabilelor de tip categorie s-a realizat prin testul hi^2 iar a celor continue prin t-testul nepereche cu aplicarea testului Levene pentru evaluarea egalității varianței. Pentru corelația bivariată s-a aplicat coeficientul de corelație Spearman rho. Toate testele statistice s-au calculat cu 2 extremități iar pragul de semnificație statistică s-a considerat $p \leq 0,05$.

- Probele pozitive din apele reziduale au fost înregistrate doar în apele netratate ($n=17$, 62,96% din totalul de 27, Pearson Chi-Square Asymptotic Significance ($p=0,005$)).

statie * poz Crosstabulation				
		poz		Total
		0	1	
statie	In + can.	10	17	27
	out	6	0	6
Total		16	17	33

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.792 ^a	1	.005		
Continuity Correction ^b	5.475	1	.019		
Likelihood Ratio	10.123	1	.001		
Fisher's Exact Test				.007	.007
N of Valid Cases	33				
a. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.91.					
b. Computed only for a 2x2 table					

- b. Condițiile meteorologice fără averse de ploaie ar putea crește șansa depistării ARN SARS-CoV-2 în influx de 16.33 ori – chiar dacă rezultatul este ne semnificativ statistic, valoarea este în apropierea pragului, fiind explicabilă și prin numărul redus de determinări ($p = 0.0759$).

						Count
conditii meteo	necunoscute	poz	0	statie	in	7
					out	4
		1	statie	in	14	
	15°C, averse ploaie	poz	0	statie	in	3
					out	1
		1	statie	out	1	
23°C	poz	0	statie	out	1	
		1		statie	in	3

Odds ratio probe poz fără ploaie+nec/ploaie	16.3333
95% CI	0.7475 to 356.8971
z statistic	1.775
Significance level	P = 0.0759

- c. Analiza incidenței cumulative în ziua recoltării, din teritoriile cu probe pozitive (EI) versus cele cu probe negative (EII) nu identifica diferențe semnificative statistice (mediana incidenței cumulative în EI=2,28[1,76-2,49]/media=2,06 versus EII=1,76[0,61-2,40]/media=1,73, t test $p=0,615$).

* incidența luată o singură dată per localitate

Tests of Normality

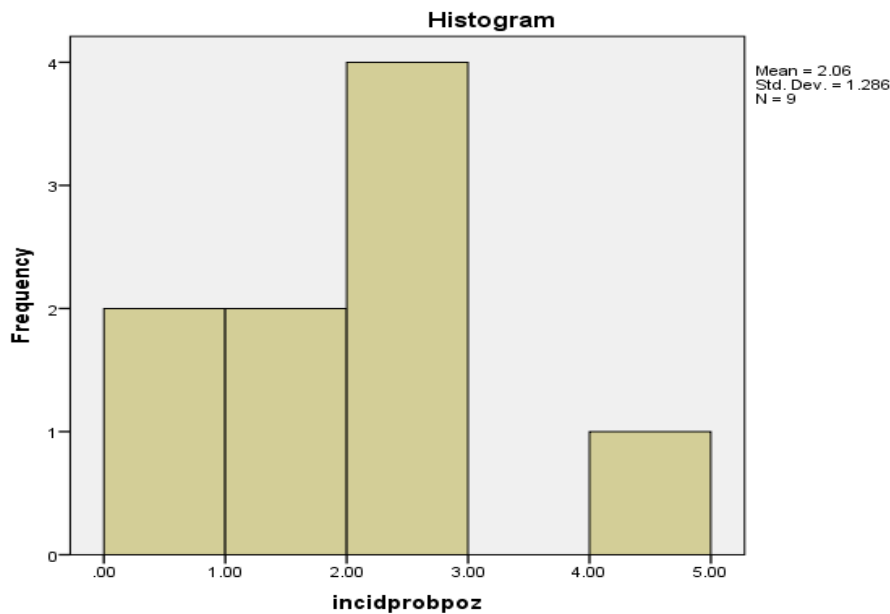
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
incidprobpoz	.202	9	.200*	.940	9	.584
incidprobneg	.157	9	.200*	.939	9	.568

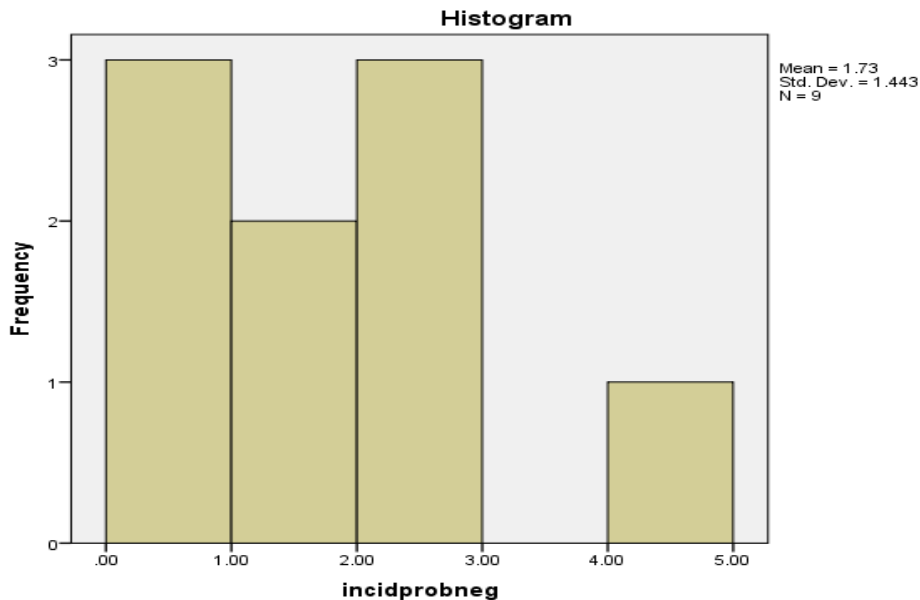
*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

		Statistic	Std. Error
incidprobpoz	Mean	2.0644	.42870
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.0759
		Upper Bound	3.0530
	5% Trimmed Mean	2.0433	
	Median	2.2800	
	Variance	1.654	
	Std. Deviation	1.28611	
	Minimum	.00	
	Maximum	4.51	
	Range	4.51	
	Interquartile Range	1.40	
	Skewness	.233	.717
	Kurtosis	1.168	1.400
	incidprobneg	Mean	1.7344
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	.6255
		Upper Bound	2.8434
5% Trimmed Mean		1.6766	
Median		1.7600	
Variance		2.081	
Std. Deviation		1.44271	
Minimum		.00	
Maximum		4.51	
Range		4.51	
Interquartile Range		2.22	
Skewness		.572	.717
Kurtosis		.376	1.400





Independent Samples Test

Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
incidenta	Equal variances assumed	.227	.640	.512	16	.615	.33000	.64425	-1.03574	1.69574
	Equal variances not assumed			.512	15.793	.616	.33000	.64425	-1.03720	1.69720

Compararea mediei incidente cumulative in ziua recoltării din EI versus EII arată aceeași lipsă de diferență semnificativă statistic.

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The medians of incidenta are the same across categories of var.	Independent-Samples Median Test	1.000 ^{1,2}	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

¹Exact significance is displayed for this test.

²Fisher Exact Sig.

Calcularea mediei/medianei incidentelor cumulative la 1000 locuitori introduse **pentru fiecare probă**, a condus la aceleași rezultat fără semnificație statistică – media 1,83 cazuri la mie pentru probele negative și respectiv 2,15 cazuri la mie pentru cele pozitive, $p=0,549$.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VAR00005	.209	16	.060	.882	16	.041
VAR00004	.165	16	.200*	.876	16	.034

*. This is a lower bound of the true significance.

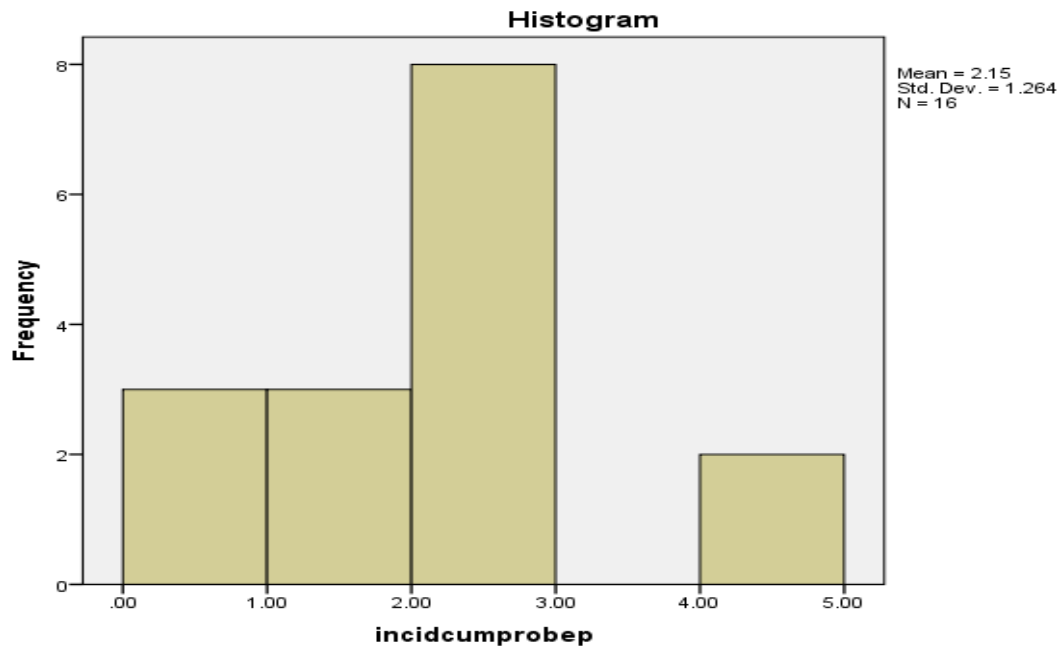
a. Lilliefors Significance Correction

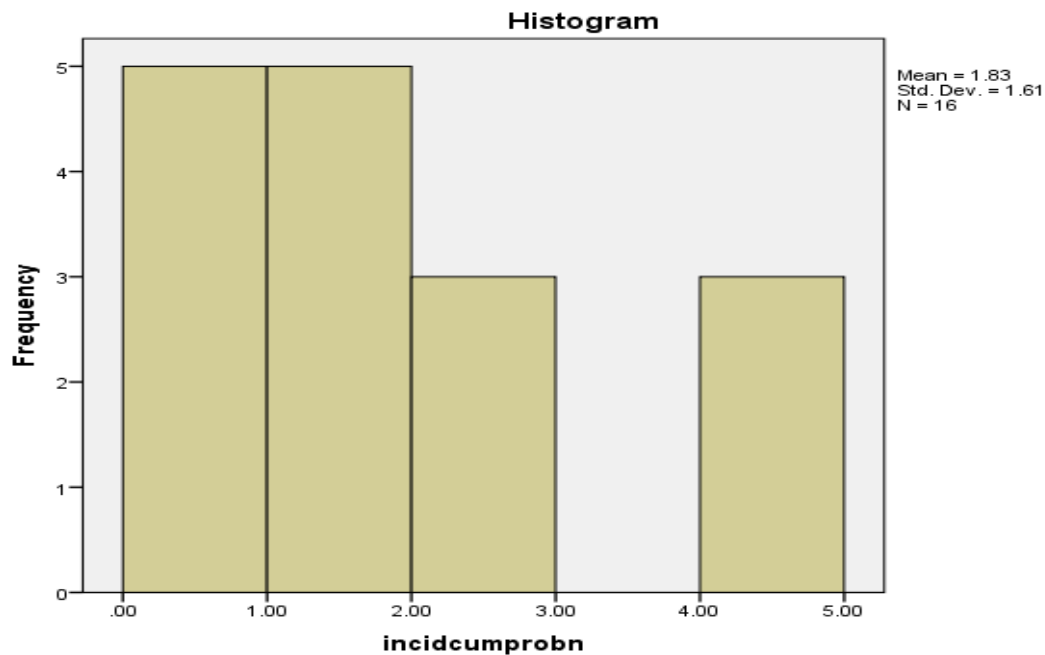
Descriptives

		Statistic	Std. Error
incidcumprobep	Mean	2.1481	.31589
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.4748
		Upper Bound	2.8214
	5% Trimmed Mean	2.1362	
	Median	2.4000	
	Variance	1.597	
	Std. Deviation	1.26356	
	Minimum	.00	
	Maximum	4.51	
	Range	4.51	
	Interquartile Range	.71	
	Skewness	.113	.564
	Kurtosis	.615	1.091
incidcumprobn	Mean	1.8294	.40240
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.9717
		Upper Bound	2.6871
	5% Trimmed Mean	1.7821	
	Median	1.4100	
	Variance	2.591	
	Std. Deviation	1.60960	
	Minimum	.00	
	Maximum	4.51	
	Range	4.51	
	Interquartile Range	2.53	
	Skewness	.595	.564
	Kurtosis	-.694	1.091

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
incident1	Equal variances assumed	2.040	.163	.606	31	.549	.30063	.49616	-.71129	1.31254
	Equal variances not assumed			.601	28.017	.553	.30063	.50030	-.72417	1.32542





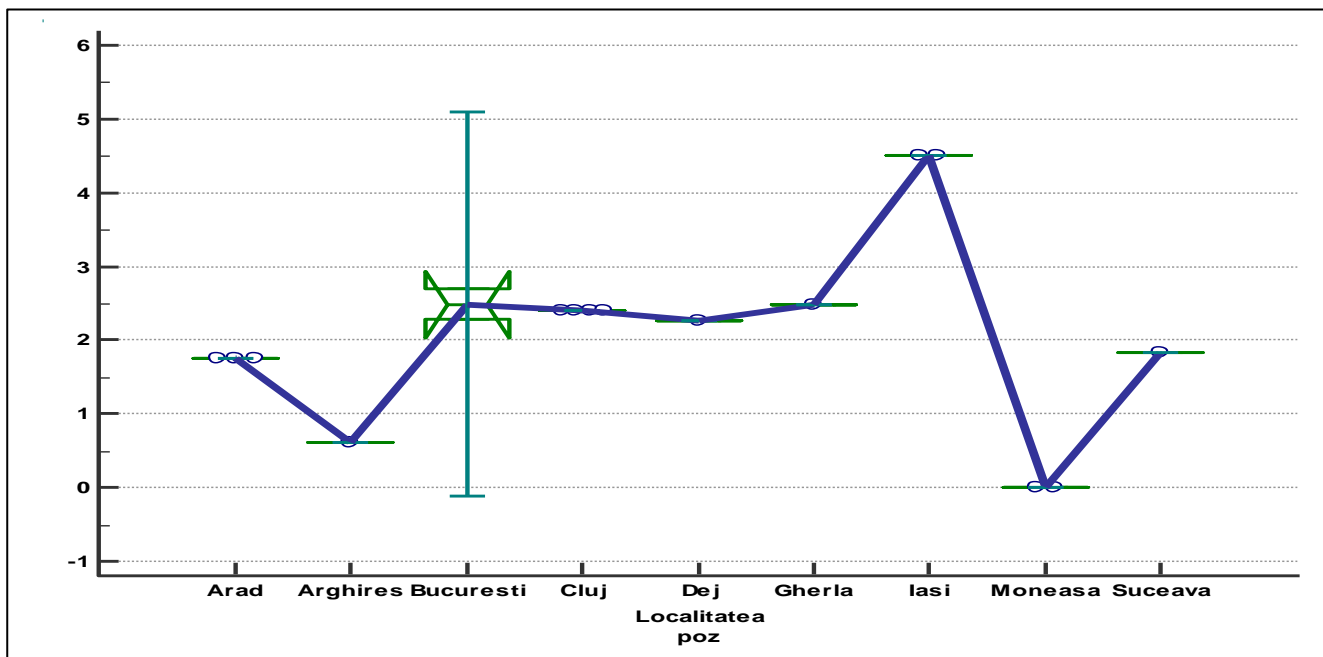
Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The medians of incidente1 are the same across categories of Var1.	Independent-Samples Median Test	.381	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of incidente1 is the same across categories of Var1.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.363 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Variable	Incidenta_cumulativa_la_1000_loc Incidenta cumulativa la 1000 loc		
Factor	Localitatea		
Filter	poz		
Total sample size	17		
Factor	n	Mean	Median
Arad	3	1.76000	1.76000
Arghires	1	0.61000	0.61000
Bucuresti	2	2.48500	2.48500
Cluj	4	2.40000	2.40000
Dej	1	2.26000	2.26000
Gherla	1	2.49000	2.49000
Iasi	2	4.51000	4.51000
Moneasa	2	0.00000	0.00000
Suceava	1	1.84000	1.84000

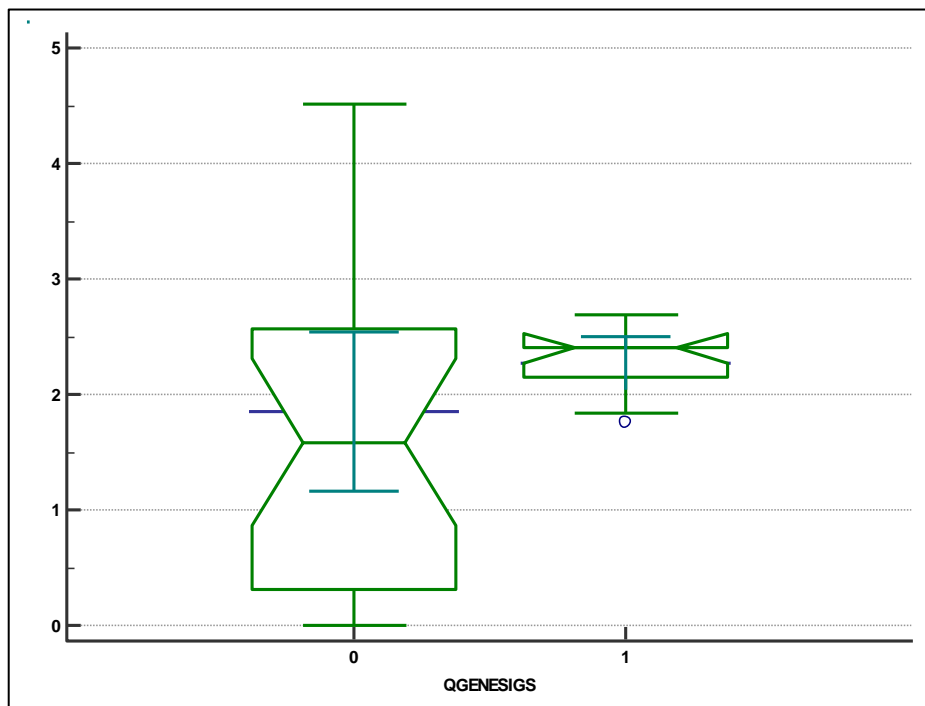


Reprezentare grafică a incidențelor cumulative in ziua recoltării, pe localități

d. Procentul de pozitivitate al diferitelor gene variază, după cum urmează:

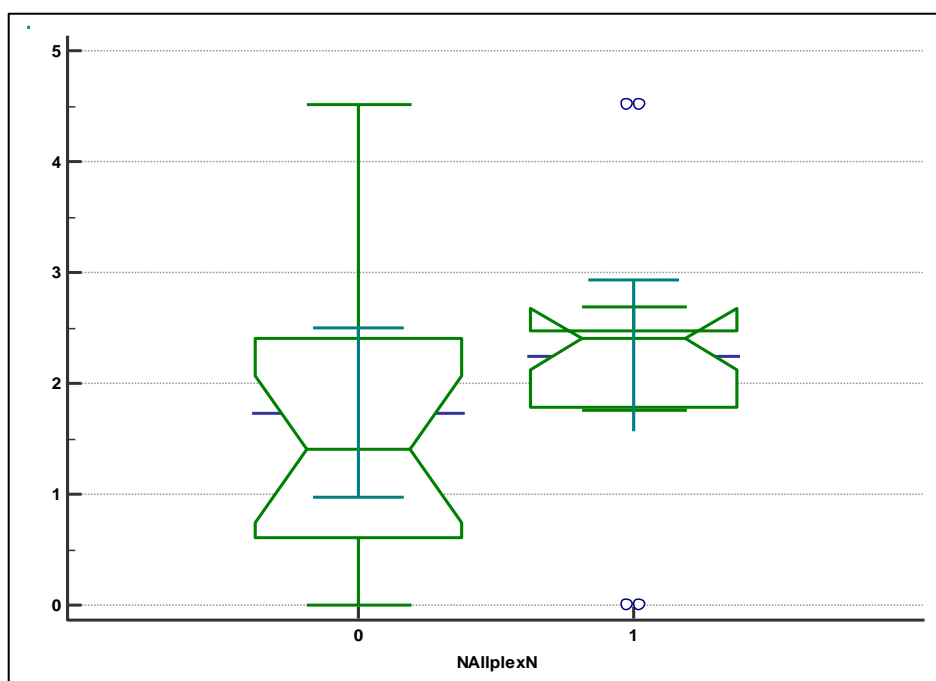
	poz	%
QEScreening in house	2	11.76
QRdRPScreening in house	8	47.06
QGENESIGORF1ab	9	52.94
QGENESIGS	9	52.94
QAllplex E	11	64.71
QAllplex RdRP	11	64.71
QAllplex N	15	88.24
Proba N	17	100.00
NScreening in houseE	4	23.53
NScreening in houseRdRP	5	29.41
NGENESIGORF1ab	13	76.47
NGENESIGS	12	70.59
NAllplex E	13	76.47
NAllplex RdRP	12	70.59
NAllplex N	15	88.24

Variable	Incidentacumulativa1000loc		
Factor	QGENESIGS		
Total sample size	33		
Factor	n	Mean	Median
0	24	1.85417	1.58500
1	9	2.27000	2.40000



Incidența cumulativă la 1000 loc, unde 1 sunt probele pozitive si 0 sunt cele negative, pentru gena S (Spike) - GENESIG

Variable	Incidentacumulativa1000loc		
Factor	NAllplexN		
Total sample size	33		
Factor	n	Mean	Median
0	18	1.73500	1.41000
1	15	2.24667	2.40000



Incidența cumulativă la 1000 loc, unde 1 sunt probele pozitive si 0 sunt cele negative, pentru gena N – Allplex

- e. Incidența cumulativă în ziua recoltării s-a corelat doar cu numărul de cicluri de amplificare RT-PCR cu kit-ul NucleoSpin RNA– Macheray-Nagel - GENESIG pentru gena S (Spike) ($\rho=0,723$, $p=0,001$, corelație puternică, pozitivă, foarte semnificativă statistic) și respectiv, Allplex - pentru gena ce codifică proteina N a nucleocapsidei ($\rho=0,482$, $p=0,50$, corelație medie, pozitivă, semnificativă statistic).

Correlations

		POZITIVE	ORFlabGQ	SGQ	ORFlabGN	SGN	
Spearman's rho	POZITIVE	Correlation Coefficient	1.000	.051	.217	.356	.723**
		Sig. (2-tailed)	.	.845	.403	.161	.001
		N	17	17	17	17	17
ORFlabGQ		Correlation Coefficient	.051	1.000	.599*	.267	.100
		Sig. (2-tailed)	.845	.	.011	.300	.704
		N	17	17	17	17	17
SGQ		Correlation Coefficient	.217	.599*	1.000	-.087	.545*
		Sig. (2-tailed)	.403	.011	.	.741	.024
		N	17	17	17	17	17
ORFlabGN		Correlation Coefficient	.356	.267	-.087	1.000	.292
		Sig. (2-tailed)	.161	.300	.741	.	.255
		N	17	17	17	17	17
SGN		Correlation Coefficient	.723**	.100	.545*	.292	1.000
		Sig. (2-tailed)	.001	.704	.024	.255	.
		N	17	17	17	17	17

***: Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

*: Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Correlations

		POZITIVE	EQSCOR	QRdf	QN	NECOR	NRdt	NN	
Spearman's rho	POZITIVE	Correlation Coefficient	1.000	.367	-.129	.263	.170	-.021	.482
		Sig. (2-tailed)	.	.147	.623	.308	.515	.935	.050
		N	17	17	17	17	17	17	17
EQSCOR		Correlation Coefficient	.367	1.000	.424	.772**	.274	.575*	.350
		Sig. (2-tailed)	.147	.	.090	.000	.288	.016	.168
		N	17	17	17	17	17	17	17
QRdf		Correlation Coefficient	-.129	.424	1.000	.554*	.488*	.167	.043
		Sig. (2-tailed)	.623	.090	.	.021	.047	.521	.869
		N	17	17	17	17	17	17	17
QN		Correlation Coefficient	.263	.772**	.554*	1.000	.162	.385	.511
		Sig. (2-tailed)	.308	.000	.021	.	.535	.127	.036
		N	17	17	17	17	17	17	17
NECOR		Correlation Coefficient	.170	.274	.488*	.162	1.000	-.054	-.037
		Sig. (2-tailed)	.515	.288	.047	.535	.	.838	.888
		N	17	17	17	17	17	17	17
NRdt		Correlation Coefficient	-.021	.575*	.167	.385	-.054	1.000	.027
		Sig. (2-tailed)	.935	.016	.521	.127	.838	.	.917
		N	17	17	17	17	17	17	17
NN		Correlation Coefficient	.482*	.350	.043	.511*	-.037	.027	1.000
		Sig. (2-tailed)	.050	.168	.869	.036	.888	.917	.
		N	17	17	17	17	17	17	17

*: Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

***: Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

2. Corelarea rezultatelor obtinute cu incidența COVID 19 în teritoriul acoperit

În toate cele 4 probe recoltate în **Timișoara** nu s-a decelat virusul SARS-COV-2, cu toate că 2 probe au provenit din canalizarea a 2 spitale în care morbiditatea spitalizată pentru COVID-19 a fost de 68,77%, respectiv 38,03%.

Trebuie să menționăm că recoltarea s-a efectuat în timpul unei averse de ploaie torențială, cu creșterea masivă a debitului apelor reziduale, prin aport masiv de apă meteorică.

În județul **Arad**, 50% din probele recoltate au relevat încărcătură virală de SARS-COV-2:

- cele 2 probe recoltate de la secțiile de Boli Infecțioase și Chirurgie/ATI ale Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad, secții cu morbiditate spitalizată pentru COVID-19 de 100%;
- 1 probă recoltată înainte de intrarea în stația de epurare a orașului;
- și 2 probe recoltate de la intrarea în stația de epurare a localității Moneasa, cu toate că incidența cumulativă a cazurilor de COVID-19, în cele 14 zile anterioare recoltării a fost 0,00 la 1000 locuitori, ceea ce arată avantajul acestei metode de supraveghere, cu identificarea excreției și la pacienții asimptomatici. Dar Moneasa a avut la debutul lunii septembrie o incidență cumulativă de 4,73 la 1000 locuitori, fapt pentru care a fost introdusă în acest studiu și în plus are regim de stațiune balneo-climaterică, ceea ce ridică problema populației tranzitorii din această zonă turistică.

Pentru județul **Cluj**, din cele 9 probe recoltate s-au pozitivat 5 (55,56%) cu kit-ul QIAamp Viral RNA Minikit – Qiagen și 7 (77,78%) cu NucleoSpin RNA kit – Macheray-Nagel :

- 4 probe recoltate de la intrarea în stațiile de epurare ale localităților Arghiresu, Gherla, Dej și Cluj Napoca;

- 3 probe recoltate din canalizarea a 3 spitale din Cluj.

Din cele 7 probe recoltate în zona **Moldovei**, 3 s-au pozitivat (42,85%):

- 2 din canalizarea Spitalului CF Iași și a Spitalului Sf. Ioan Suceava
- și una recoltată înainte de stația de epurare a municipiului Iași.

Din cele 3 probe recoltate în **București**, 2 s-au pozitivat (66,67%) provenind din canalizarea Spitalului de Boli Infecțioase și tropicale Victor Babeș și a celui de campanie din Otopeni.

Per total, din cele 33 de probe, 13 (39,39%) s-au pozitivat cu kit-ul QIAamp Viral RNA Minikit – Qiagen, respectiv 17 (51,52%) cu NucleoSpin RNA kit – Macheray-Nagel (p=0,322).

În lipsa a minim 3 recoltări din fiecare locație, nu se pot calcula trendurile în teritoriul arondat. De asemenea, am luat act de indicația evaluatorilor studiului care au considerat că realizarea hărților de clustere excede domeniul proiectului și nu ne-am mai focusat pe ele.

Dezvoltarea unui Plan national de supraveghere SARS-Cov-2 in ape reziduale

1. Adaptarea strategiei de supraveghere, in contextul epidemiologic actual

Avantajele unui sistem de supraveghere a apelor reziduale pentru ARN SARS-CoV-2

- ARN SARS-CoV-2 apare în materiile fecale la 3 zile de la infecție și precede pozitivarea testelor din probe nazo-faringiene [1];
- mediana duratei pozitivității probelor este semnificativ mai mare în materiile fecale comparativ cu probele respiratorii; persistența ARN SARS-CoV-2 în fecale este dovedită chiar în condiția în care exudatele nazo-faringiene sunt negative [2];
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale permite monitorizarea prezenței infecției într-o comunitate (deservită de acea rețea de canalizare) sau într-un anumit loc – clădire, instituție, loc de muncă (ca metodă complementară la screening-ul pentru COVID-19 în locații cu risc ridicat pentru COVID-19 cum ar fi penitenciarele etc.) [3];
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale oferă date privind prezența virusului în comunități în care testarea clinică este subutilizată sau indisponibilă;
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale indică infecția COVID-19, independent de forma clinică de boală, deoarece excreția fecală a SARS-CoV-2 apare și la pacienții simptomatici dar și la cei asimptomatici;
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale nu este influențată de adresabilitatea populației la sistemul sanitar;
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale se constituie într-un indicator al trendului în manifestarea epidemiologică a infecției COVID-19 în comunitate (atât pentru modificările raportate, cât și pentru cele nedecelate de sistemul tradițional), atât pe termen scurt (sub două

- săptămâni) cât și pentru modificările susținute (pe două săptămâni sau mai mult). De asemenea, permite identificarea direcției trendului - crescătoare, descrescătoare sau în platou [3];
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale permite compararea datelor obținute de la diferite stații de epurare, în ciuda diferențelor în ceea ce privește populația deservită și volumul apelor reziduale;
 - **trendul identificat pe baza supravegherii apelor reziduale coincide sau precede cu câteva zile tendințele raportate pe baza numărului de cazuri noi de COVID-19 raportate, putând servi ca un potențial sistem de avertizare timpurie cu privire la prezența sau tendințele infecției COVID-19 în acea comunitate;**
 - **datele de supraveghere obținute în acest fel pot fi folosite de Direcțiile de Sănătate Publică locale, de alte organizații teritoriale sau naționale în vederea detectării, monitorizării și adaptării reacției față de pandemia de COVID-19 (prin intensificarea testării la nivel comunitar, prin intensificarea campaniei de sănătate publică focusată pe mijloacele preventive). Inclusiv pot fi folosite pentru evaluarea impactului măsurilor luate în vederea atenuării epidemiei la nivel local;**
 - testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale se poate constitui într-o metodă de screening eficientă din punct de vedere al costurilor și al timpului (fiecare eșantion incluzând un grup de indivizi), în completarea screeningului prin testare individuală;
 - testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale nu este o metodă nouă, se aplică și în supravegherea altor boli transmisibile – de ex. circulația tulpinilor sălbatice/derivate vaccinale de virus poliomieltic, a altor virusuri enterale ca norovirusuri sau VHA [4].

Fundamentare inițială

Problematika sistemului de supraveghere a apelor reziduale pentru depistarea SARS-CoV-2 a fost deja abordată în numeroase cercetări științifice, pornind de la faptul că virusurile se multiplică doar intracelular și că excreția fecală a SARS-CoV-2 este prelungită comparativ cu cea respiratorie (un studiu chinezesc a identificat o medie de 27,9 zile versus 16,7 zile). [7] Astfel:

- Italia a identificat virusul în 6 din cele 12 probe recoltate între februarie și aprilie 2020 de la stațiile de epurare a apelor reziduale din Milano și Roma - un rezultat pozitiv fiind obținut într-un eșantion din Milano, colectat în 24.02.2020, la câteva zile după notificarea primului caz autohton de COVID-19. În Roma s-a identificat în 31.04, când deja existau 2.186 cazuri în areal [8];
- Spania a analizat eșantioane de la două stații de tratare a apelor reziduale din Barcelona, între 13 aprilie și 25 mai 2020. De asemenea au testat probe înghețate, recoltate încă din ianuarie 2018. S-a descoperit că virusul era prezent la Barcelona în 15 ianuarie 2020, cu 41 de zile înainte ca primul caz să fie raportat oficial în oraș. În plus, au descoperit prezența genomului virusului într-o probă colectată pe 12 martie 2019, cu nouă luni înainte ca virusul să fie descoperit pentru prima dată în China, cu concentrații similare celor identificate în martie și aprilie 2020 [9]; Și în Valencia un studiu similar a concluzionat că virusul a fost transmis în comunitate mai devreme decât se credea anterior [10];
- Olanda a detectat virusul în probele de ape reziduale în prima săptămână după apariția primelor cazuri confirmate, demonstrând posibilitatea utilizării metodei ca indicator timpuriu al intensificării circulației virusului în populație [11,12];
- Franța a realizat un studiu între 30 martie și 23 aprilie 2020 ce a confirmat creșterea unităților genomice în apele reziduale odată cu creșterea numărului de cazuri umane de COVID-19 observate la Paris și posibilitatea detecției chiar înaintea începerii creșterii exponențiale a epidemiei [13];
- Australia a raportat primele identificări ale ARN-ului de SARS-CoV-2 din apele reziduale din S-E Queensland-ului (Brisbane) în 27/03/2020, respectiv în 01/04/2020, atunci când mediana numărului de infecții depistate a fost de 171 și respectiv 1090 [4];

- Germania a detectat ARN de SARS-CoV-2 în 9 probe de ape reziduale recoltate din diferite municipii din Rhinul de Nord – Westphalia, în aprilie 2020 [14];
- Israel – având experiența anterioară a depistării circulației de virus poliomieltic în apele fecaloid-menajere în 2013, ce a determinat reintroducerea vaccinării cu virus viu atenuat, au adaptat metodologia pentru depistarea SARS-CoV-2 cu obținerea de probe pozitive atât din apele reziduale ale spitalelor și locurilor de izolare a pacienților COVID-19, dar și din rețeaua de canalizarea [15];
- Pakistanul, altă țară ce a folosit rețeaua preexistentă de supraveghere a circulației virusului poliomieltic pentru a investiga prezența SARS-CoV-2 în 78 de eșantioane colectate din 38 de districte, a obținut un procentaj de pozitivitate de 27% [16];
- Marea Britanie a implementat un sistem experimental, cu 90 de stații de epurare ce permit supravegherea a cel puțin 70% din populația galeză, 22% din populația Angliei și se extinde cu alte 28 de locații în Scoția [17];
- Ungaria a început în iunie 2020 supravegherea apelor reziduale și a anunțat în noiembrie că prezența crescută a virusului în sistemele de canalizare din Budapesta, Bekescsaba, Kecskemet, Veszprem și din alte orașe importante, se poate constitui într-un indicator al unei posibile creșteri viitoare a numărului de infecții [18,19];
- Universitatea din Arizona s-ar fi putut să fi stopat o posibilă izbucnire epidemică în toamna nului 2020 prin testarea apelor reziduale din căminele studențești, deoarece, la câteva zile de la întoarcerea din vacanță de vară, a fost detectat ARN SARS-CoV-2 în canalizarea unui cămin iar la testarea tuturor studenților din acel cămin au fost identificați 2 pozitivi asimptomatici, deși cu 2 zile anterior testele i-au declarat negativi. Prin carantinarea celor 2 pozitivi nu au mai fost înregistrate cazuri secundare la ceilalți 327 rezidenți [20].

Luând în considerare aceste studii precum și avantajele prezentate anterior, considerăm utilă implementarea unui astfel de sistem complementar de supraveghere a infecției umane cu noul coronavirus și pe teritoriul României.

Scop

Aprofundarea cunoașterii manifestării epidemiologice a sindromului respirator acut cu noul coronavirus (COVID-19) pe teritoriul României, în vederea adaptării măsurilor preventive și de control, pentru limitarea și ulterior stingerea epidemiei.

Obiective

- detecția ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale;
- surprinderea trendului infecției COVID-19 într-un areal/teritoriu/locație;
- stabilirea distribuției temporale și geografice a aglomerărilor de cazuri de infecție cu SARS-CoV-2;
- evaluarea riscului pentru infecția cu SARS-CoV-2 la nivel comunitar, local, județean;
- adaptarea strategiei de prevenție și control.

Modele ideale de sisteme de supraveghere

Ideal ar fi ca sistemul de supraveghere să implice toți actorii: populație, autorități locale, organismele dedicate sănătății publice și mediului de viață, deoarece în fața amenințării prezente (și a celor care vor mai veni) trebuie să fie toți pregătiți, conștienți, antrenați iar responsabilitatea statului este de a oferi instrumente, structuri și cadru legal pentru utilizarea tuturor sistemelor de supraveghere și de contenție a unei amenințări.

Imaginea de mai jos arată că trebuie să existe un organism central, care să adune toate informațiile (de la cetățeanul care se declară afectat de infecție sau contact cu un infectat, la rețelele social-media, laboratoarele de ape reziduale, la deținătorii datelor epidemiologice).



Sursa: <https://medicalfuturist.com/sewage-data-as-a-surprising-predictor-for-covid-19-cases/>

Modele restrânse de sisteme de supraveghere

Pot fi utilizate rețelele deja existente de conținere a unei amenințări a sănătății publice (DSP, DSV, agențiile de mediu etc) dar se cere introducerea specială a supravegherii ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale.

Modele moderne de sisteme de supraveghere și intervenție

Ar trebui înființate grupuri de intervenție pentru orice fel de amenințări ale sănătății publice, versatile, care să poată identifica rapid orice fel de amenințare, mai ales la nivel global, deoarece actualul sistem de avertizare prin Regulamentul Sanitar Internațional s-a dovedit incapabil să gestioneze corect această pandemie iar OMS a fost complet depășită.

În acest sens fiecare stat trebuie să-și organizeze pe plan național laboratoare de cercetare-testare, unități de producție de echipamente de protecție, dezinfectante, medicamente, antibiotice și vaccinuri.

Design –ul sistemului de supraveghere

Tip de supraveghere: supravegherea mediului de viață al populației pe baza monitorizării țintite a apelor reziduale cu prelevare din amonte de stațiile de epurare/guri de vizitare, prin detecția ARN SARS-CoV-2

Populație: toate persoanele domiciliare sau rezidente temporar în zonele deservite de rețeaua de canalizare de pe teritoriul României;

Perioadă: pe toată perioada pandemia de COVID-19 și ulterior - această pandemie arată că oricând pot apărea amenințări ale sănătății publice cauzate de agenți biologici.

Metodologie

Înainte de a selecta o stație de tratare a apelor reziduale pentru supravegherea comunitară a SARS-CoV-2, trebuie să se stabilească:

- zona geografică și populația deservită de rețeaua de canalizare;
- contribuția relativă a tipurilor de intrări (ape industriale, rezidențiale, etc.);
- factorii care ar putea influența detectarea SARS-CoV-2 (pre-tratarea apelor reziduale de intrare sau devierea apelor reziduale pentru a regla fluxul în amonte de zona de eșantionare) [3];
- locațiile de prelevare disponibile;
- disponibilitatea unor date utilitare necesare (măsurători ale debitului de intrare, măsurători chimice / fizice ale calității apei, etc.)

Frecvența esantionării depinde de scopul supravegherii:

- pentru detecția prezenței SARS-CoV-2 în apele reziduale, este suficientă prelevarea o dată pe săptămână;
- pentru detecția trendului infecției sunt necesare cel puțin trei eșantioane - dacă eșantioanele sunt colectate de două ori pe săptămână, perioada minimă de timp pe care se poate confirma trendul pe termen scurt este de 8 zile iar cel susținut pe cinci eșantioane colectate într-un interval de 15 zile.

Se poate recolta:

- fie **eșantion de ape reziduale netratate** – ce includ ape de uz casnic (de la toalete, dușuri, chiuvete) precum și deșeuri provenite din surse ne-menajere (apă de ploaie, ape industriale). Se pot recolta ape din stația de epurare (înainte de tratarea primară) sau în amonte, în rețeaua de colectare a apelor reziduale. Trebuie să se țină cont că concentrațiile de ARN SARS-CoV-2 sunt mai variabile în amonte de stația de epurare deoarece apele au avut mai puțin timp să se amestece și excrețiile provin de la mai puțini oameni. Probele trebuie colectate în locații care preced adăugarea de substanțe chimice sau amestecarea fluxurilor în stația de epurare. În majoritatea cazurilor, apele reziduale netratate vor necesita concentrare înainte de extracția ARN-ului;
- fie **nămol primar** ce cuprinde solide suspendate care se sedimentează din apele reziduale în stația de epurare. Un avantaj al metodei ar fi scăderea necesității de concentrare a eșantionului și e preferabilă în cazul unui areal cu puțini pacienți cunoscuți. [3]

Ambele eșantioane sunt acceptabile și se alege în funcție de necesități.

Sunt 2 metode de prelevare :

- **probe captate** - pot fi colectate rapid și nu necesită echipament automat. Cu toate acestea, pot fi mai puțin reprezentative decât probele compozite. Pentru apele reziduale și nămolul netratat, probele captate sunt puternic influențate de fluctuațiile zilnice ale debitului și compoziției apelor uzate. La nivelul stației de epurare, probele de prelevare pot furniza concentrații similare probelor compozite dacă proporția comunității infectate este suficient de mare. Cu toate acestea, în acest moment, proporția minimă a comunității infectate pentru ca probele de prelevare și compozite să fie similare, este necunoscută. [3]
- **eșantioanele compozite** sunt colectate prin amestecarea mai multor probe recoltate la o frecvență de timp stabilită - de obicei 24 de ore. Se pot colecta manual sau automat.

Volumul eșantionului de colectat va depinde de tipul eșantionului. Pentru apele reziduale se va recolta un eșantion de 1 litru iar pentru nămolul primar 100 mililitri. Concentrarea a mai mult de 1 L de apă reziduală poate duce la o recuperare slabă sau la inhibarea semnalului viral. [3]

Dacă se dorește prelevare la nivel de clădire, se recomandă colectarea de probe însoțitoare și de la nivel comunitar pentru a interpreta optim rezultatele obținute.

Respectarea precauțiilor standard, purtarea echipamentului de protecție personală necesar în mod obișnuit la manipularea apelor reziduale netratate, precum și adoptarea comportamentului preventiv față de COVID-19 sunt suficiente pentru protecția celor ce recoltează eșantioanele. Probele se păstrează la temperaturi sub 4°C iar prelucrarea ar trebui să se facă în termen de 24 de ore de la colectare. Probele rămase pot fi congelate la -70 °C. Mai multe cicluri de îngheț-dezghet duc la pierderea potențială a semnalului.

Expedierea probelor se face cu respectarea prevederilor legale privind substanțele infecțioase din categoria B.

Metode de testare

Probele de apă sunt concentrate prin metoda bazată pe două faze de separare (metoda PEG-dextran, protocol WHO). Din motive de siguranță, înainte de concentrarea virală, probele trebuie inactivate 30-60 min, la 60 °C. După extracția ARN din probele concentrate cu kituri comerciale, se aplică tehnica RT-PCR calitativ și de detecție cantitativă precum și o tehnică nouă, rapidă, de amplificare izotermă - RT-LAMP.. Pentru validarea acestor tehnici sunt necesare stabilite controale negative (de extracție, amplificare și pentru definirea controalelor pozitive - martor de referință, amplicon, ARN, virus surrogat). Pentru stabilirea protocoalelor RT-PCR (sensibilitate, specificitate,

evaluare cantitativă), au fost testați mai mulți parametri de reacție și diferite ținte virale (genele orf1ab, E, RdRP, S și N). Spre deosebire de RT-PCR, amplificarea prin RT-LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) necesită 6 primeri și o temperatură constantă. Pozitivarea reacției produce o scădere de pH care este detectată colorimetric.

Date de raportare

1. Referitoare la locație: localitatea, stația de epurare, numărul de persoane deservite de stația respectivă, procesele de tratare a apelor reziduale.

2. Referitoare la prelevare: data recoltării probei, ora, tipul eșantionului (de captare sau compozit), debitul apei uzate în timpul colectării eșantionului.

3. Referitoare la testare: concentrația eșantionului, metodele de extracție și cuantificare, precum și eficiența recuperării virale și măsurători de inhibare moleculară pentru a permite compararea apelor reziduale colectate din locații multiple și analizate de diferite laboratoare.

Circuit informațional

Nivelul periferic

Apele reziduale din comunități sunt colectate în sistemul de canalizare și apoi transportate la stațiile de epurare. Regiile locale de apă și canalizare, prin personalul specializat din cadrul laboratoarelor de control vor colecta probe de apă reziduală netratată sau nămol primar.

Laboratoarele de mediu, specializate în analiza apei, din cadrul Direcțiilor de Sănătate Publică județene vor prelucra probele (în cazul metodei cromatografice). Dacă sunt aplicate metodele de analiză moleculară, probele vor fi testate în laboratoarele Centrelor Regionale de Sănătate Publică, reprezentantele INSP-ului în teritoriu, eventual în laboratoarele universităților cu profil medical sau chiar în laboratoare private cu logistica necesară. Rezultatele analizelor vor fi trimise Direcțiilor de Sănătate Publică județene.

Nivelul local

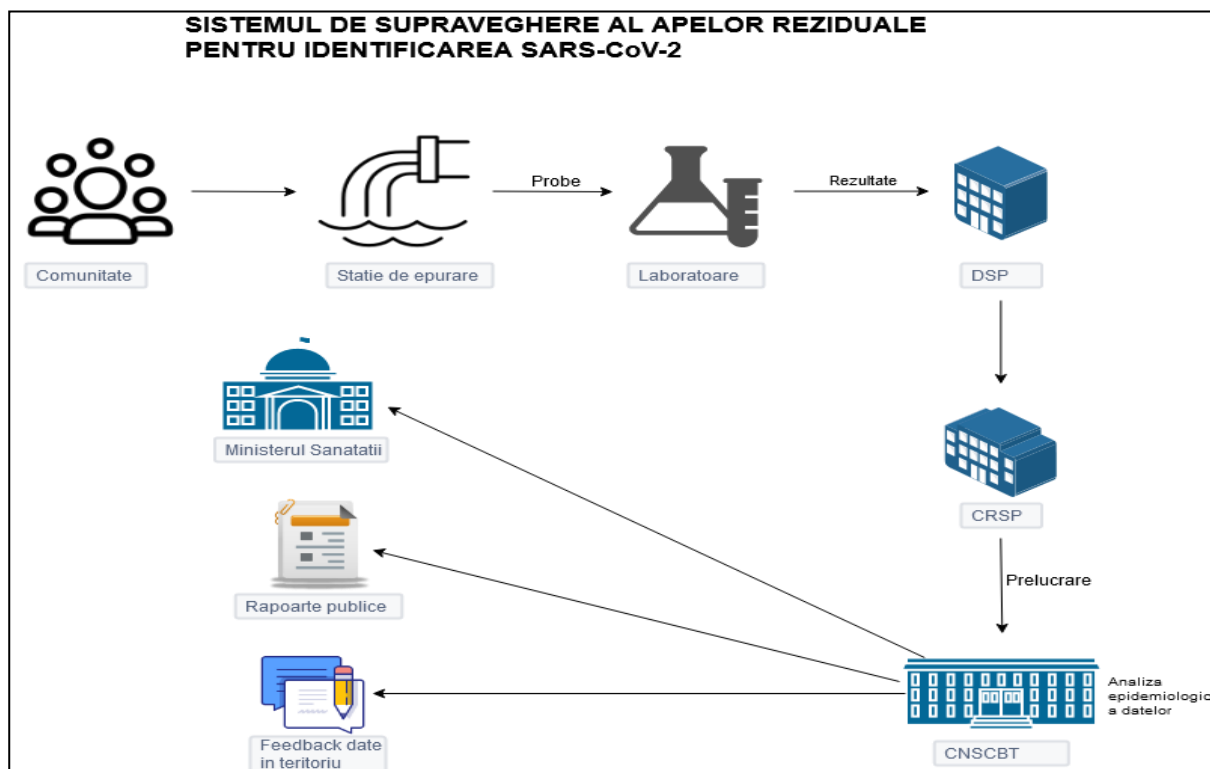
Datele de testare, împreună cu cele utilitare și cele aferente prelevării sunt transmise Direcțiilor de Sănătate Publică județene la Compartimentele de supraveghere epidemiologică și control al bolilor transmisibile respectiv la Compartimentele de Inspecția și controlul factorilor de risc din mediul de viață și muncă. Acestea vor raporta datele la CRSP-ul teritorial și la CNSCBT.

Nivelul regional

CRSP –ul teritorial va interveni în analiza epidemiologică a datelor și va acorda asistență tehnică la solicitarea DSP-urilor din teritoriul arondat sau la solicitarea CNSCBT.

Nivelul național

CNSCBT va efectua analiza epidemiologică a datelor la nivel național și va transmite rezultatele către Ministerul Sănătății. De asemenea va sigura feedback-ul datelor către CRSP –urile teritoriale și DSP-urile județene pentru optimizarea Planului de măsuri preventive și de control în teritoriu. CNSCBT va putea pune la dispoziție datele și altor părți interesate prin rapoarte publice.



Algoritmul informațional în supravegherea apelor reziduale pentru ARN SARS-CoV-2

Analiza epidemiologică recomandată

Este necesară modelarea detaliată a degradării virale și a debitelor apelor reziduale din sistem pentru a corela cu precizie concentrația virală la punctul de prelevare a probelor cu prezența virusului în comunitatea deservită de rețea.

Dacă SARS-CoV-2 este detectat în apele reziduale, înseamnă că există cel puțin o persoană infectată cu SARS-CoV-2, fie simptomatică, fie asimptomatică în teritoriul deservit de acea rețea de canalizare. Pe măsură ce se vor acumula date privind corelarea cuantificării virale în apele reziduale cu numărul de excretori, se va putea estima numărul posibil de persoane infectate și incidența infecției în teritoriu.

Dacă SARS-CoV-2 nu este detectat în apele reziduale, acest lucru ar putea indica faptul că nu există SARS-CoV-2 în acea comunitate sau concentrația virală este sub nivelul de detecție al metodei aplicate.

Un nivel redus al virusului în apele reziduale ar putea indica fie un număr mic de persoane care excretă virusul, fie o cantitate mică eliminată de fiecare excretor. [3]

Pentru stabilirea trendului, se practică regresia liniară în care variabila independentă este data prelevării, cu interpretare în funcție de semnificația statistică. Se poate utiliza și un prag procentual zilnic minim.

Se vor comunica în special trendurile, reprezentările grafice ale datelor de concentrare ajustate în funcție de debit și dimensiunea populației, concomitent cu alți indicatori de supraveghere ai infecției COVID-19, pentru o imagine de ansamblu a manifestării epidemiologice din teritoriu.

Indicatori de evaluare a sistemului de supraveghere

- numărul de stații de epurare incluse în sistem;
- % din județe care aplică sistemul de supraveghere a apelor reziduale;
- % din teritoriul județean acoperit de rețeaua de canalizare inclusă în sistemul de supraveghere;
- % localităților cu probe pozitive din totalul celor monitorizate.

2. Evaluarea sistemului de supraveghere dpdv al riscurilor posibile

Posibile limite ale unui sistem de supraveghere a apelor reziduale pentru ARN SARS-CoV-2

- nu se cunoaște până acum numărul minim de persoane infectate care să permită pozitivarea probelor din apele reziduale [3];
- nu poate funcționa ca sistem de supraveghere unic, ci doar în completarea celui existent pentru că necesită date epidemiologice pentru identificarea populațiilor cu risc mai mare de COVID-19/a locațiilor cu risc, pentru a fi cât mai mult cost/eficient;
- supravegherea apelor reziduale nu poate oferi informații despre factorii sociali și comportamentali care intervin în modificarea incidenței COVID-19 și a ratei de de transmisie a virusului;
- singură, testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale cu rezultate negative, nu ar trebui folosită pentru relaxarea măsurilor preventive și de control în comunitate;
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale nu este utilizabilă în zonele fără rețea de canalizare, nu va identifica comunitățile deservite de sisteme descentralizate, precum spitalele care își tratează apele reziduale, nu toate stațiile de epurare a apelor reziduale sunt adecvate ca locații de supraveghere sau pot fi necesare lucrări suplimentare pentru a permite recoltarea apelor reziduale în amonte de stațiile de epurare. De asemenea, este mai dificil de aplicat în mediul rural;
- informațiile furnizate de testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale pot fi mai puțin concordante cu cele din supravegherea pasiv - activă bazată pe raportarea cazurilor noi în zonele cu populație tranzitorie cum ar fi zonele turistice [3];
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale ar crește volumul de lucru al laboratoarelor (și nu doar cele aparținând sistemului de sănătate publică ci și ale Regiilor de furnizare a apei și de canalizare locale);
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale ar putea fi influențată de unele condiții meteorologice - ploaie, variații zilnice mari ale debitului, curățarea liniilor de canalizare sau de temperatura ambientală [5, 6];
- posibilitatea interferării dejectelor animale cu detectarea SARS-CoV-2 în apele reziduale ar putea îngreuna utilizarea metodei în abatoare sau în alte locuri industriale cu risc înalt pentru COVID-19;
- testarea ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale poate fi mai costisitoare și mai dificilă din punct de vedere logistic decât supravegherea cazurilor, ceea ce ridică probleme în special în cazul acoperirii unui teritoriu vast sau în areale cu nivel redus de dezvoltare.

3. Stabilirea și introducerea elementelor de profilaxie și control în Planul National de supraveghere a SARS-COV-2 în apele reziduale

Măsuri de profilaxie și control

Implementarea unui sistem de supraveghere de mediu pe baza monitorizării țintite a apelor reziduale cu prelevare din amonte de stațiile de epurare, prin detecția ARN SARS-CoV-2 ar permite:

- intensificarea testării la nivel comunitar, atunci când datele de supraveghere indică un posibil număr mare de infecții asimptomatici, care nu se regăsesc în sistemul de supraveghere activă-pasivă a cazurilor noi;
- intensificarea distanțării fizice în comunitățile cu creștere exponențială a epidemiei;
- intensificarea campaniei de sănătate publică referitoare la măsurile preventive;
- secundar, verificarea măsurilor de decontaminare a apelor reziduale pentru încărcătura cu acest virus;
- evaluarea impactului măsurilor luate în vederea atenuării epidemiei la nivel local, regional;
- prioritizarea acțiunilor de vaccinare în arealele cu trend crescător al epidemiei, după ce vaccinurile vor deveni disponibile [21];

- și chiar atenuarea consecințelor socioeconomice ale pandemiei de COVID-19, generate de blocajele repetate și extinse.

În **Rezumat**, Sindromul acut respirator COVID-19, cauzat de SARS-CoV-2, este însoțit de excreția fecală a betacoronavirusului, ce se constituie într-un marker al infecției mai fidel decât determinarea ARN SARS-CoV-2 prin metode moleculare de tip PCR din secrețiile nazo-faringiene, ceea ce face ca studierea apelor reziduale să fie o necesitate în contextul actualei pandemii și nu numai.

Din acest motiv, proiectul a investigat prezența SARS-CoV-2 în apele reziduale din 12 localități din țară (Dezna, Moneasa, Arad, Timișoara, București, Aghireșu, Gherla, Cluj-Napoca, Dej, Iași, Suceava și Siret), în perioada 05-19.10.2020, locațiile fiind selectate după principiul incidenței cumulative a cazurilor de COVID-19 pe 14 zile anterioare. Probele au provenit din rețeaua de colectare a apelor reziduale ale spitalelor care au asistat pacienți COVID-19 (n= 16) și de la companiile de apă din localitățile respective, (n= 10 probe influx și n=7 probe eflux), Toate probele au fost concentrate prin metoda bifazică PEG-dextran (OMS), probe PCR analizate dublu, prin două truse comerciale, de către instituția CO (QIAamp Viral RNA Minikit – Qiagen și NucleoSpin RNA kit – Macheray-Nagel) , P5 (UMF Cluj) (NucleoSpin RNA kit – Macheray-Nagel și kitul EliGene® Viral RNA/DNA FAST IsolationKit -ELISABETH PHARMACON). Au fost țintite - gena E (RT-PCR cu kit In-house, gena E, confirmare *RdRP*) și genele ORF1ab și S (RT-PCR cu kit GENESIG, gene ORF1ab și S) , plus RT PCR cu kit Allplex, pentru genele E, RdRP și N. Au fost decelate 17 probe pozitive (51,51%) strict înainte de tratarea apei reziduale (canalizare spital și influent), probele de eflux de la stațiile de tratare a apelor fiind negative în totalitate.

Decelarea titrurilor obținute prin RT-qPCR a fost diferită, în funcție de specificitatea și sensibilitatea celor două truse utilizate iar incidența cumulativă a cazurilor de boală umană și prezența virusului în apele reziduale netratate s-au corelat; mai mult, prezența virusului a fost demonstrată și în apele reziduale ale unor localități fără forme de boală simptomatică, ceea ce este normal la o infecție asimptomatică și autolimitantă în procent de peste 80%.

Studiul demonstrează că rezervorul uman de virus SARS-CoV-2 poate fi identificat precoce prin supravegherea apelor reziduale ale comunității și poate contribui decisiv în stabilirea măsurilor eficiente de sănătate publică.

Diseminarea datelor

Rezultatele parțiale au fost comunicate în cadrul unei lucrări ca poster, premiat în cadrul Sesiunii Științifice a INCDMM Cantacuzino din 25 nov. 2020. De asemenea, rezumatul extins al lucrării va fi publicat în revista institutului *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*. Consorțiul Proiectului 24SOL/2020 (AcvaCov). Metode moleculare pentru detecția SARS-COV-2 în apele reziduale ca instrumente de alertă pentru apariția COVID-19

- Manuscris în preparare:

“Evaluation of commercial kits for comparative detection of genomic SARS CoV-2 RNA in waste waters by RT-PCR and RT-LAMP”

Bibliografie

1. The Medical Futurist, 7 September 2020, <https://medicalfuturist.com/sewage-data-as-a-surprising-predictor-for-covid-19-cases/>
2. Xiaoming Wang, Jingwei Zheng, et al. Fecal viral shedding in COVID-19 patients: Clinical significance, viral load dynamics and survival analysis. *Virus Res.* 2020 Nov; 289: 198147.
3. CDC. National Wastewater Surveillance System (NWSS) – a new public health tool to understand COVID-19 spread in a community, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/wastewater-surveillance/targeted-use-case.html>
4. Warish Ahmed, Nicola Angel, Janette Edson, Kyle Bibby, Aaron Bivins, Jake W. O'Brien, Phil M. Choi, Masaaki Kitajima, Stuart L. Simpson, Jiaying Li, Ben Tschärke, Rory Verhagen, Wendy J.M. Smith, Julian Zaugg, Leanne Dierens, Philip Hugenholz, Kevin V. Thomas, Jochen F. Mueller. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Science of the Total Environment* 728 (2020): 138764, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
5. https://www.bigcountrynewsconnection.com/idaho/most-recent-update-on-covid-19-wastewater-testing-in-moscow-estimates-1-800-possible-cases/article_7b1d8498-cba1-11ea-b7c7-ab2e51b16e7e.html
6. David Polo, Marcos Quintela-Baluja, Alexander Corbishley, Davey L. Jones, Andrew C. Singer, David W. Graham, Jesús L. Romalde. Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 – approaches and challenges for surveillance and prediction, *Water Research* 186 (2020): 116404, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135420309398>
7. Emmanuel Kweiner Tetteh, Mark Opoku Amankwa, Edward Kwaku Armah, Sudesh Rathilal. Fate of COVID-19 Occurrences in Wastewater Systems: Emerging Detection and Treatment Technologies—A Review. *Water* 2020, 12, 2680; doi:10.3390/w12102680
8. Giuseppina La Rosa, Marcello Iaconelli, Pamela Mancini, Giusy Bonanno Ferraro, Carolina Veneri, Lucia Bonadonna, Luca Lucentini, Elisabetta Suffredini. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of the Total Environment* 736 (2020) 139652, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>
9. <https://newseu.cgtn.com/news/2020-06-29/COVID-19-found-in-Spanish-wastewater-in-March-2019-say-researchers-RJ2ZnDL8Ag/index.html>
10. Walter Randazzo, Enric Cuevas-Ferrando, Rafael Sanjuán, Pilar Domingo-Calap; Gloria Sánchez. Metropolitan Wastewater Analysis for COVID-19 Epidemiological Surveillance, <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.20076679>.
11. <https://www.nzherald.co.nz/world/covid-19-coronavirus-warning-after-coronavirus-found-in-dutch-sewage-water/QZAR7CD6TCA3XA64LV2OZMGLJQ/>
12. Gertjan Medema, Leo Heijnen, Goffe Elsinga, Ronald Italiaander, and Anke Brouwer. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2020, 7: 511–516, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>
13. Wurtzer S, Marechal V, Mouchel JM, Maday Y, Teysou R, Richard E, Almayrac JL, Moulin L. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>
14. Sandra Westhaus, Frank-Andreas Weber, Sabrina Schiwy, Volker Linnemann, Markus Brinkmann, Marek Widera, Carola Greve, Axel Janke, Henner Hollert, Thomas Wintgens, Sandra Ciesek. Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks, *Science of the Total Environment* 751 (2021):141750, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750>
15. Itay Bar-Or, Karin Yaniv, Marilou Shagan, Eden Ozer, Oran Erster, Ella Mendelson, Batya Mannasse, Rachel Shirazi, Esti Kramarsky-Winter, Oded Nir, Hala Abu-Ali, Zeev Ronen, Ehud Rinott, Yair E. Lewis, Eran Friedler, Eden Bitkover, Yossi Paitan, Yakir Berchenko and Ariel Kushmaro. Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance, <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20073569>
16. Salmaan Sharif, Aamer Ikram, Adnan Khurshid, Muhammad Salman, Nayab Mehmood, Yasir Arshad, Jamal Ahmad, Rana Muhammad Safdar, Mehar Angez, Muhammad Masroor Alam, Lubna Rehman, Ghulam Mujtaba, Jaffar Hussain, Johar Ali, Ribqa Akhtar, Muhammad Wasif Malik, Zeeshan Iqbal Baig, Muhammad Suleman Rana, Muhammad Usman, Muhammad Qaisar Ali, Abdul Ahad, Nazish Badar, Massab Umair, Sana Tamim, Asiya Ashraf, Faheem Tahir and Nida Ali. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater, using the existing environmental surveillance network: An epidemiological gateway to an early warning for COVID-19 in communities. <https://doi.org/10.1101/2020.06.03.20121426>
17. <https://news.sky.com/story/coronavirus-sewage-tests-detect-local-covid-19-hotspots-12111784>
18. <https://rmx.news/article/article/hungary-begins-coronavirus-testing-of-wastewater>
19. <https://www.digi24.ro/stiri/externe/expertii-in-sanatate-din-ungaria-au-depistat-o-prezenta-crescuta-a-covid-19-in-sistemele-de-canalizare-80-din-asezari-sunt-afectate-1395624>
20. Alanna Maya, A Secret Weapon in the Fight against COVID-19, *WaterWorld*, Oct 13th, 2020, <https://www.waterworld.com/wastewater/article/14184342/a-secret-weapon-in-the-fight-against-covid19>
21. David A. Larsen and Krista R. Wigginton. Tracking COVID-19 with wastewater. *Nature Biotechnology* 2020, 38: 1151–1153, www.nature.com/naturebiotechnology

6. Rezultate, stadiul realizării obiectivului, concluzii și propuneri pentru continuarea proiectului

Evaluarea protocolului de detecție ARN viral prin RT-PCR.

Kiturile de extracție au prezentat performanțe similare. Din 34 de probe, 17 au fost pozitive pentru SARS-COV-2 la testarea prin RT-PCR. Prin compararea celor trei protocoale RT-PCR, cele mai sensibile sunt testele cu kiturile Genesig și Allplex2019-nCoV și, din cele trei gene vizate, genele nucleocapsidei (N) și gena S sunt cele mai robuste. Probe pozitive din stațiile de epurare au fost identificate numai în influent.

Cuantificarea ARN SARS CoV-2 în ape reziduale.

A fost generată o curbă standard, folosind concentrații cunoscute de ARN SARS CoV-2, exprimate în număr de copii ARN/reacție. Limita detecție prin qPCR este:

0,51 copii ARN/ml apă uzată pt gena ORF1ab

sau 5,1 copii/ml de apă uzată pt gena S

- Probele au prezentat concentrații între 0,5 și 25,5 copii/ml de apă uzată (spital COVID). S-au determinat concentrații mai mari de ARN viral în ape reziduale provenite din spitale de boli infecțioase. În zonele cu focare stabilite, concentrațiile de ARN viral în ape reziduale apar mai crescute.

RT-PCR versus RT-LAMP

- Protocolul WHO de concentrare a probelor de apă și cele două truse de extracție a acizilor nucleici au permis detectarea ARN SARS-COV-2 prin metodele RT-PCR și LAMP
- S-a realizat optimizarea protocolului de detecție cantitativă precum și detecția calitativă a ARN SARS CoV-2 în ape reziduale prin RT-LAMP
- În timp ce RT-PCR necesită un echipament de PCR cu cicluri diferite de temperatură și durează 2h30min, RT-LAMP are loc la temperatură unică, timp de numai 30 min. Reacția RT-LAMP poate fi realizată într-o baie de apă (echipament puțin costisitor)
- Au fost dezvoltate unelte moleculare pentru optimizarea protocoalelor de extracție rapidă și detecție ARN SARS CoV-2, în condiții de biosecuritate nivel 2. S-a construit o particulă virală de tip pseudotip, având o nucleocapsidă lentivirală, al cărei genom conține ținte din genomul SARS CoV-2 și o anvelopă opțională. Acest model de genom încapsidat și anvelopat a fost folosit pentru evaluarea detecției țintelor SARS CoV-2 prin RT-LAMP. S-au comparat două metode de extracție a ARN viral, dintre care una rapidă.

În concluzie, a fost dezvoltat un sistem de detecție moleculară RT-LAMP, ca alternativă mai economică și mai rapidă decât testul RT-PCR

- A fost elaborat un proiect pentru implementarea unui sistem de supraveghere a apelor reziduale pentru detecția SARS-CoV-2
- Acest sistem permite implementarea unui algoritm predictiv pentru anticiparea focarelor de infecție cu virus SARS CoV-2
- Metoda poate fi extrapolată pentru alte virusuri ARN care sunt excretate în fecale (norovirus, rujeolă, virus hepatic A) și care sunt prezente în comunități defavorizate
- Este un fapt demonstrat că depistarea ARN SARS-CoV-2 în materiile fecale precede pozitivarea probelor nazofaringiene și deci analiza apelor reziduale identifică circulația silențioasă a virusului și poate fi un sistem de avertizare a posibilității apariției unor focare de Covid-19

Noutatea solutiei

Ce solutii similare exista?

Testarea apelor uzate a fost folosită cu succes ca metodă de detectare precoce a altor boli, cum ar fi poliomielita. Studii din Italia, Franta, Spania, Olanda, Australia, Ungaria au demonstrat utilitatea identificării precoce a prezentei virusului în apele reziduale. SUA inițiază un Sistem Național de Supraveghere a Apelor Uzate ca răspuns la pandemia COVID-19.

Care este valoarea adaugata a soluției realizate?

- Este primul studiu din Romania care ofera o solutie tehnica pentru identificarea virusului Sars Cov-2 in apa reziduale, ce poate fi utilizată ca instrument de avertizare timpurie cu privire la apariția COVID-19.
- Detecția în premieră a ARN SARS CoV-2 în probe de apa prin RT-LAMP, ca alternativa mai economica și mai rapidă la testul RT-PCR
- Studiul demonstrează că rezervorul uman de virus SARS-CoV-2 poate fi identificat precoce prin supravegherea apelor reziduale ale comunității și poate contribui decisiv în stabilirea măsurilor eficiente de sănătate publică

Beneficiarii

- Rețelele deja existente, implicate în sănătatea publica (DSP, DSV, agențiile de mediu etc) prin introducerea supravegherii prezentei ARN SARS-CoV-2 în apele reziduale.
- Laboratoarele de mediu, specializate în analiza apei, din cadrul Direcțiilor de Sănătate Publică județene vor preleva și prelucra probele prin inactivare și concentrare. Probele pot fi testate la nivel local sau central, iar rezultatele analizelor vor fi trimise Direcțiilor de Sănătate Publică județene.
- CNSCBT va efectua analiza epidemiologică a datelor la nivel național și va transmite rezultatele către Ministerul Sănătății. De asemenea va asigura feedback-ul datelor către CRSP – urile teritoriale și DSP-urile județene pentru optimizarea Planului de măsuri preventive și de control în teritoriu

Implementarea unui sistem de supraveghere de mediu pe baza monitorizării țintite a apelor reziduale prin detecția ARN SARS-CoV-2 ar permite:

- intensificarea testării la nivel comunitar, atunci când datele de supraveghere indică un posibil număr mare de infectați asimptomatici, care nu se regăsesc în sistemul de supraveghere activă-pasivă a cazurilor noi;
- intensificarea distanțării fizice în comunitățile cu creștere exponențială a epidemiei și a campaniei de sănătate publică referitoare la măsurile preventive;
- secundar, verificarea măsurilor de decontaminare a apelor reziduale pentru încărcătura cu acest virus;
- evaluarea impactului măsurilor luate în vederea atenuării epidemiei la nivel local, regional;
- prioritizarea acțiunilor de vaccinare în arealele cu trend crescător al epidemiei, după ce vaccinurile vor deveni disponibile
- atenuarea consecințelor socio-economice ale pandemiei de COVID-19, generate de blocajele repetate și extinse.

Propuneri pentru continuarea proiectului

Depistarea ARN SARS-CoV-2 în materiile fecale poate precede pozitivarea probelor nazofaringiene și, în consecință, analiza apelor reziduale identifică circulația silențioasă a virusului și poate fi un sistem de avertizare a posibilității apariției unor focare de Covid-19

Deoarece, timpul necesar studiului a fost mai scurt decât preconizat, situație cauzată, în principal, de lentoarea cu care s-au obținut avizele pentru prelevare de probe, din partea unor administratori locali din spitale și stații de epurare a apelor precum și de întârzierea cu care au fost furnizate materialele necesare, din partea furnizorilor, ar fi util un studiu extins cu 9 luni.

Datele obținute prin monitorizarea apelor reziduale, atât în timpul valurilor pandemice cât și în perioada post-pandemică, vor constitui baza algoritmului de predicție a apariției focarelor de SARS CoV-2.

Pentru a pune rezultatul cercetării în practică sunt necesare:

- studii pentru optimizarea metodei RT-LAMP prin amplificarea altor regiuni din genomul SARS CoV-2 și evaluarea corelării epidemiologice între detectia cantitativă a ARN viral și apariția focarelor de COVID-19 (prelevări longitudinale din același punct pentru a se evalua tendința infecției)
- prototiparea RT-LAMP, ca soluție ieftină și rapidă, utilizabilă în supravegherea apei reziduale în zone urbane.