



PROTOCOLO

DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN AGUAS RESIDUALES

(Versión 1.11, noviembre 2020)

ASPECTOS GENERALES

- El personal de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) que vaya a realizar el muestro de las aguas residuales deberán seguir las recomendaciones generales de bioseguridad establecidas para los trabajadores de las EDARs. En este caso, para la toma de muestras se recomienda que los operarios vayan equipados con los equipos de protección individual entre los que se incluye: guantes y botas de goma, casco de trabajo con protector de ojos o gafas, mascarilla FFP2 y mono.
- El personal del equipo que vaya a recibir y a analizar muestras de aguas procedentes de una estación depuradora en las que pueda haber sospecha de presencia del SARS-CoV-2 deberán seguir las pautas estándar y recomendaciones generales de bioseguridad establecidas para los laboratorios de nivel 2 de contención biológica (NCB2). Estas normas, están a disposición de todo el personal del equipo de trabajo en el manual de bioseguridad del laboratorio y que se puede encontrar en el siguiente enlace de la Organización Mundial de la Salud:
https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
- De forma genérica, **los equipos de protección individual serán** los estándares, ya utilizados para cualquiera de las muestras que se analizan en el laboratorio y que son sospechosas de contener patógenos humanos (bacterias, virus y protozoos patógenos). Estos equipos de protección incluyen **guantes desechables** (p. ej. guantes Kimberly-Clark Kimtech Sterling Nitrile-Xtra, con protección contra microorganismos y virus, EN ISO 374-5:2016), **bata/pijama de laboratorio** (p. ej. batas de un solo uso, de manga larga con puño elástico y cuello camisero fabricada en polipropileno de 25gr) y, de forma opcional, **gafas anti-salpicaduras al manipular sustancias potencialmente infecciosas**.
- En el caso de las muestras de aguas residuales, al tratarse de muestras cuya información es limitada, según el manual de la OMS, se deben de adoptar medidas de un NCB2, entre las que se incluye:
 - Bata impermeables de manga larga (p. ej. batas de un solo uso manga larga con puño elástico y cuello camisero fabricada en polipropileno de 25gr).



- Se utilizarán guantes desechables, de protección para muestras infecciosas. Los guantes deben ser los específicos para su uso en un BSL-2 (p. ej. guantes Kimberly-Clark Kimtech Sterling Nitrile-Xtra, con protección contra microorganismos, incluyendo virus, EN ISO 374-5:2016).
- Manejo de muestra dentro de una campana de seguridad biológica (CSB) de clase II.
- **En las situaciones en que no exista la protección de la cabina de bioseguridad**, se utilizarán gafas de seguridad para las actividades con líquidos infecciosos y maskarilla antipartículas (maskarilla de alta eficacia FFP2 o FFP3), si existiera riesgo de producción de aerosoles o de proyección de líquidos infecciosos.
- Se evitarán las técnicas que impliquen la formación de aerosoles, o en todo caso se aplicarán barreras de confinamiento si estas técnicas fueran necesarias, normalmente los recintos de contención de las cabinas. Se debe evitar al máximo actividades que impliquen manipulación de las muestras potencialmente infecciosas (alícuotado o dilución de muestras).
- También como norma general, todos los procedimientos que puedan generar aerosoles de partículas finas (volteado, apertura de tubos, etc.) deberán realizarse en una CSB de clase II.
- Toda la manipulación de las muestras se realizará dentro de la CSB de clase II y manteniendo los equipos de protección individual que se cambiarán todas las veces que sea necesario.
- **Después de procesar las muestras, se descontaminarán las superficies de trabajo, así como todos los equipos utilizados (agitadores, centrífugas, cabina de bioseguridad) utilizando alcohol al 70% y papel desechable.**



TOMA DE LAS MUESTRAS:

- La toma de muestras en las EDARS es una operación determinante en la que se debe asegurar la completa trazabilidad de la muestra desde el momento de la toma hasta la recepción en el laboratorio de esta.
- Al igual que para el resto de las actividades que se desarrollan en las EDARs, los operarios que entren en contacto con aguas residuales deben de llevar las EPIs necesarios para evitar la contaminación entre los que se incluye: guantes y botas de goma, casco de trabajo con protector de ojos o gafas, mascarilla FFP2 y mono.
- A la hora de la toma de muestra es recomendable que se identifique y se registre el tomador de muestra, así como el proceso de envío de muestra al laboratorio. En este caso, si el proceso de toma de muestra no es puntual (p. ej. muestras de aguas compuestas), durante la toma de muestra se procurará asegurar una temperatura de < 10 °C. Si la muestra se almacena previamente a su envío al laboratorio, la temperatura de almacenamiento deberá ser 3 ± 2 °C y durante el transporte, se procurará asegurar una temperatura de 5 ± 3 °C, siendo estos criterios de estabilidad de almacenamiento y transporte los establecidos en la norma ISO 5667-3:2012 Calidad de agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y manipulación de muestras.
- Identificación del punto de toma de muestra. A la hora de seleccionar el punto de muestreo, se deberá tener en cuenta que es imprescindible asegurar que la toma de muestra se realiza en un lugar de máxima homogeneidad, evitando en todo momento puntos de confluencia de varias corrientes de agua residual y aportes de posibles vertidos industriales, realizando la toma en una zona en la que lámina de agua posea los mínimos flotantes posibles y siendo la profundidad de la toma de muestra idónea aquella que está a $1/3$ de la altura de la lámina superficial de agua.
- Identificación del proceso de toma de muestra, teniendo en cuenta que independientemente del proceso, la totalidad de equipos habrán sido previamente desinfectados y que antes de la toma de muestra, se realizará un enjuague de los recipientes de almacenamiento de muestra con el agua a muestrear.

En la medida que sea posible, los procesos de muestreo se detallarán en el “**Acta de toma de muestra**” teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Toma de muestra simple (la muestra se toma en un momento concreto del día), indicando el momento del día más representativo para el parámetro que se está monitorizando. En este caso, teniendo en cuenta que las partículas víricas se excretan con la orina y las heces, se elegirá un momento del día que coincida con una mayor afluencia de la población al aseo.



- Toma de muestra compuesta (manual o automática) basada en sub-muestras a lo largo de todo el día, a lo largo de un período laboral de mañana (de 8:00 a 15:00), o en una franja concreta del día, indicando para este caso el motivo de la selección de dicha franja en las observaciones del acta de muestreo., por ejemplo, una sub-muestra cada 15 min entre las 7:00 am y las 9:00 am. Siempre que se realice la toma de muestra compuesta, será importante llevarla a cabo de forma refrigerada, intentado que la temperatura en el equipo se mantenga por debajo de 10 °C, lo cual puede ser controlado introduciendo un datalogger en el compartimento de muestreo. La toma de muestra compuesta podrá realizarse en volúmenes fijos o en volúmenes proporcionales al caudal, si bien, para facilitar el proceso, se recomienda volúmenes fijos.
- Durante el proceso de toma de muestra, y siempre que sea posible, se llevarán a cabo medidas *in situ* que complementen la información, dicha medidas serán pH, conductividad a 20 °C, turbidez, temperatura ambiente y caudal instantáneo. Estas medidas quedarán reflejadas en el “**Acta de toma de muestra**” indicando en observaciones si dichas medidas están fuera de lo habitual en el punto de muestreo seleccionado. Igualmente, para muestras simples, se tendrá en cuenta que el volumen mínimo a tomar será de 500 mL, mientras que, para muestra compuestas, se asegurará que cada sub-muestra será de al menos 100 mL, de tal forma que en el proceso de integración de las sub-muestras se calculará el volumen a incluir en el recipiente final de muestra para asegurar que la muestra compuesta tenga, al menos, 500 mL.
- Se debe tener en cuenta que en aquellos casos en que se vaya a llevar a cabo la caracterización físico-química de la muestra, se deberá tomar una muestra adicional de al menos 2 L, ajustando las condiciones de toma de muestra a este volumen adicional. En el “Acta de toma de muestra” se incluirán los parámetros de caracterización físico-química que se vayan a realizar y si se va a procesar en un laboratorio diferente al que analizará RNA.
- Una vez la muestra es recogida de los distintos puntos de muestreo (p. ej. afluente, secundario, terciario), la muestra se debe conservar a temperatura de refrigeración (3 ± 2 °C) para evitar su degradación. La muestra para medición de RNA puede mantenerse en 24-48 horas a temperatura de refrigeración sin que esto cause degradación del material genético, si bien, se evitará que el tiempo entre el muestreo y la recepción en el laboratorio de dicha muestra sea superior a 48 horas. En la muestra para caracterización físico-química es imprescindible asegurar que la muestra será recibida en el laboratorio que lleve a cabo dichos análisis en un tiempo inferior a 24 horas desde su recogida.
- Si la muestra para medición de RNA no va a poder analizarse en los próximos 2-3 días, es mejor que la muestra sea congelada hasta su análisis. En cualquier caso, se debe de evitar el



congelar/descongelar las muestras varias veces ya que estos procesos sí que degradan el material genético.

ENVÍO DE LAS MUESTRAS

- El envío de las muestras de aguas desde la EDAR hasta los laboratorios de análisis se debe de realizar mediante transporte refrigerado acompañando siempre la muestra los documentos de “Cadena de custodia” y “Acta de toma de muestra”.
- Las botellas de las muestras de agua se deben introducir en cajas herméticas que impidan el derrame en caso de rotura. Dentro de las cajas se debe introducir algún material absorbente que evite derrames en caso de rotura.
- Las cajas herméticas se deben introducir en una nevera portátil o caja de polispán que contenga placas de hielo para que mantengan la temperatura del agua refrigerada. Las neveras/cajas deberán ir precintadas para evitar derrames.
- Se recomienda que las neveras lleven un etiquetado de Riesgo Biológico ya que las muestras son clasificadas como potencialmente infecciosas, aunque la probabilidad de que contengan virus infecciosos es muy improbable.





RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS:

- Las muestras procedentes de las diferentes EDARs se transportarán hasta el instituto de investigación y se recibirán por parte del personal del laboratorio en la recepción del instituto.
- El personal de laboratorio llevará guantes (p. ej. guantes Kimberly-Clark Kimtech Sterling Nitrile-Xtra, con protección contra microorganismos, incluyendo virus, EN ISO 374-5:2016) y bata desechable de un solo uso (p. ej. batas de un solo uso manga larga con puño elástico y cuello camisero fabricada en polipropileno de 25gr) para recibir las muestras en la conserjería del centro y las transportará hasta el laboratorio de BSL-2.
- Antes de abrir la caja se esprayará con una solución de lejía diluida a 20 ppm o con alcohol al 70%.
- Una vez en el laboratorio, las muestras se irán sacando de una a una, y el resto de las muestras se mantendrán en la nevera de transporte en una zona segura del laboratorio para impedir tropiezos o vuelcos.
- Una vez se toma el volumen necesario de cada muestra, se guardará una pequeña alícuota de la muestra en una duquesita de 100 mL, bien rotulada y se guardará en los congeladores de -20 / -80 °C, destinados a las muestras biológicas, los cuales están adecuadamente señalizados con la señal de Peligro Biológico.
- **El resto del agua que no se vaya a analizar y que no sea necesario guardar, se situará en la zona destinada al material contaminado para su posterior autoclavado.**

CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El protocolo de la concentración de las muestras está basado en el protocolo descrito por Randazzo et al. (2020).
- Dentro de la CSB de clase II, se coge el envase original en el que nos llega la muestra y se tomarán **200 mL de cada una de las muestras** en los tubos de centrífuga.
- En la CBS añadimos 100 μ L de mengovirus (vMCO CECT 100000) o, alternativamente, coronavirus porcino (PEDV, cepa CV777) a la dilución 1:10 ó 1:100 dependiendo de la concentración inicial del material, como control de proceso.
- Se prepara el control de recuperación inoculando en 1 mL de PBS la misma dilución de mengovirus o PEDV empleada en las muestras.



- Dentro también de la CSB de clase II, **ajustamos el pH del agua a 6** con HCl IN o 0,1N. Es preferible utilizar tiras de pH en lugar de un pH metro para así evitar contaminación cruzada de las muestras.
- Una vez ajustado el pH, añadimos una parte de una solución de **AlCl₃ de 0.9N por cada 100** partes de muestra para obtener 0.009N. Para ellos añadimos a cada uno de los tubos de centrifuga 2 mL de una disolución de AlCl₃ de concentración 4% (p/V) (0,4 g de AlCl₃ en 10 mL de agua destilada, esta disolución stock se realizará previamente en la campana de gases del laboratorio). Una vez añadido el AlCl₃, agitamos manualmente los tubos de centrifuga para asegurarnos un buen mezclado del AlCl₃.
- Dentro de la CSB de clase II, reajustamos el **pH a 6** con HCl IN o 0.1N o NaOH IN o 0.1N, dependiendo del pH que tengamos en la muestra.
- Una vez ajustado el pH cerramos bien los tubos de la centrifuga y los ponemos en el **agitador orbital 15 min a 150 rpm**.
- Una vez agitado, vamos a la centrifuga y los **centrifugamos a 1700g durante 20 minutos**.
- **Como norma general, la apertura del rotor de la centrifuga se llevará a cabo dentro de la CSB de clase II**. En el caso de una rotura de los tubos que contienen muestras durante el proceso de centrifugación, toda carga y descarga de los mismos deberá de hacerse de forma obligatoria dentro de la CSB de clase II.
- Dentro de la CSB de clase II, **descartamos de nuevo el sobrenadante en una botella pyrex, que una vez finalizada la concentración colocaremos en la zona del material contaminado para su posterior autoclavado**.
- Resuspendemos el pellet con **10 mL de una solución de beef extract al 3%** (30 g beef extract en 1000 ml de agua).
- Cerramos bien el tubo y lo sacamos al agitador para agitar durante **10 minutos – 200 rpm**.
- Una vez agitado, centrifugamos a **1900 g – 30 minutos**.
- Como norma general, la apertura del rotor de la centrifuga se llevará a cabo dentro de la CSB de clase II. En el caso de una rotura de los tubos que contienen muestras durante el proceso de centrifugación, toda carga y descarga de los mismos deberá de hacerse de forma obligatoria dentro de la CSB de clase II.
- **Una vez se termina el uso de la centrifuga se esprayará con una solución de alcohol al 70% y se limpiará con papel para garantizar su limpieza**.
- Dentro de la CSB de clase II, **descartamos de nuevo el sobrenadante en una botella pyrex, que una vez finalizada la concentración colocaremos en la zona del material contaminado para su posterior autoclavado**.

- El pellet se resuspende en 1 ó 2 mL de PBS 1x. Si la muestra no se va a extraer en el mismo día se congelará a -20°C bien etiquetada y en un congelador de muestras biológicas potencialmente contaminadas y que tenga la señal de riesgo biológico.

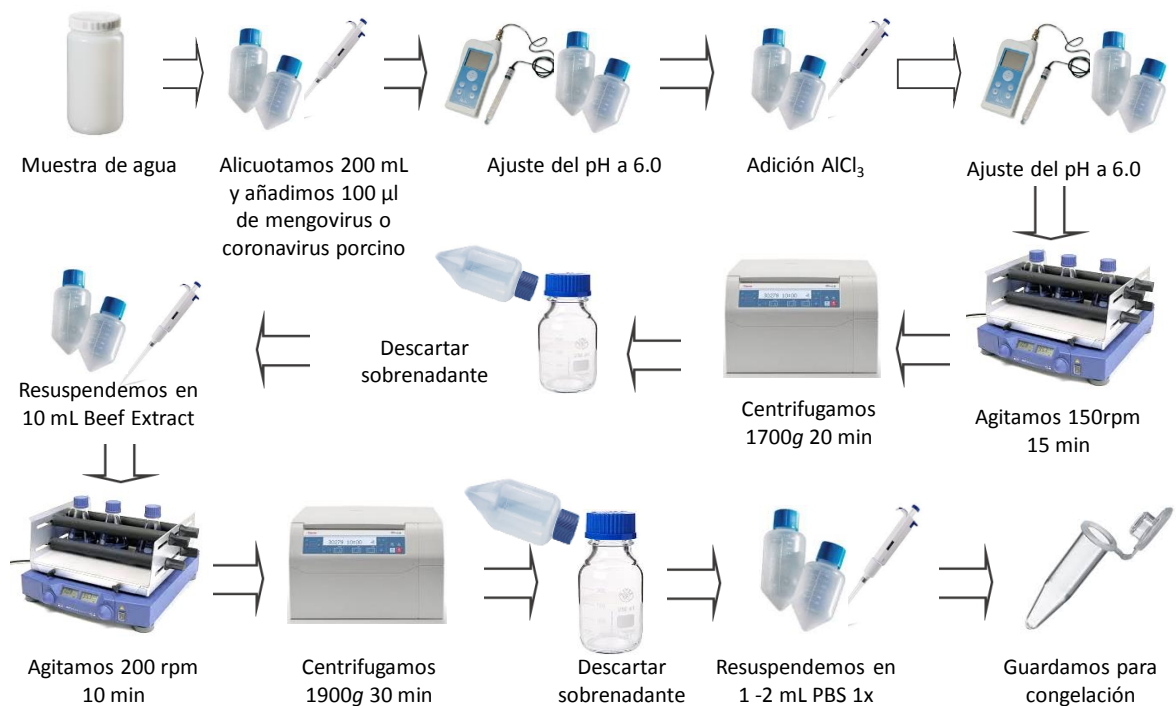


Figura I. Esquema general de los pasos de concentración de muestras.

EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

- **Todo el proceso de extracción se llevará a cabo en la CSB de clase II.**
- Como normal general, las EPIs que se utilizarán serán:
 - Batas impermeables de manga larga (p. ej. batas de un solo uso manga larga con puño elástico y cuello camisero fabricada en polipropileno de 25gr).
 - Se utilizarán guantes desechables (p. ej., guantes Kimberly-Clark Kimtech Sterling Nitrile-Xtra, con protección contra microorganismos y virus, EN ISO 374-5:2016), de protección para muestras infecciosas.
 - En las situaciones en que no exista la protección de la cabina de bioseguridad, se utilizarán gafas de seguridad para las actividades con líquidos infecciosos y mascarilla antipartículas (mascarilla de alta eficacia FFP2 o FFP3s), si existiera riesgo de producción de aerosoles o de proyección de líquidos infecciosos.



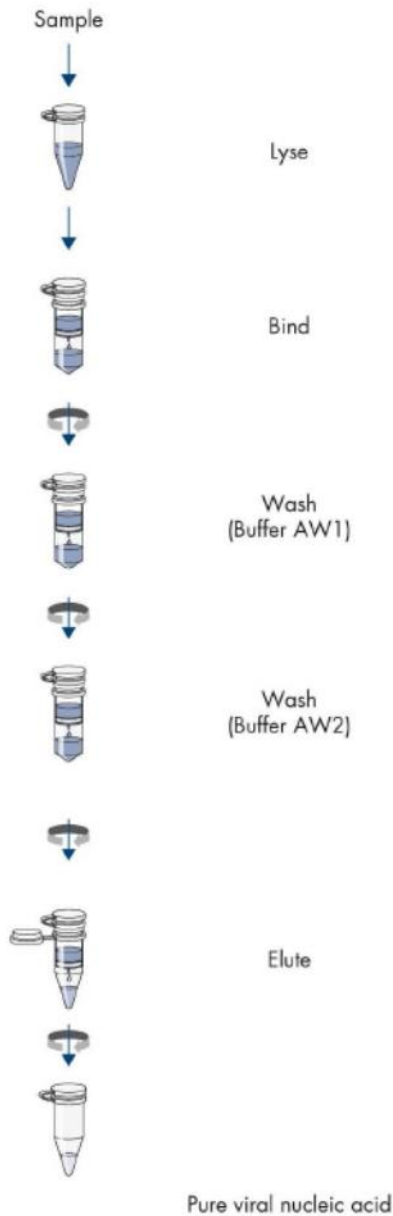
- Para la extracción, se tomarán 150 µL de cada muestra concentrada y se seguirán las instrucciones del kit de extracción QIAamp® Viral RNA (Qiagen) o del Nucleospin RNA virus Kit (Macherey-Nagel).
- Los tampones AVL y RAWI contienen sales de guanidina, que pueden formar compuestos altamente reactivos cuando se combinan con lejía. Si se derrama el líquido que contienen estos tampones, límpielo con detergente de laboratorio y agua. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, hay que limpiar primero el área afectada con detergente de laboratorio y agua, y luego con hipoclorito sódico 1% (v / v).
- Para hacer la lisis, añadimos a la muestra el tampón de lisis (600µL) y 25 µl Plant RNA isolation aid (Ambion)
- Agitamos y centrifugamos 10000xg 5min.
- El sobrenadante se recoge en un tubo limpio y se incuba a 70°C durante 5 min.
- Seguir los pasos de lavado detallados en los protocolos (Figura 2).
- Eluir el RNA en 100 µL de agua libre de RNasas.
- Una vez el RNA es extraído la muestra ya no supone riesgo y se puede manipular en cualquier laboratorio, adoptando en todo momento las buenas prácticas de trabajo.

Alternativamente se puede realizar una extracción utilizando el kit Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit y el equipo Maxwell RSC (Promega), siguiendo el siguiente protocolo:

- 300 µL de muestra, 400 µL CTAB y 40 µL de proteínasa k (proporcionada con el kit). Vortex 10 segundos.
- Incubar 10 min a 60 °C.
- Centrifugar 10 min a 16000xg y descartar el pellet.
- Añadir 300 µL del tampón de lisis al cartucho y añadir también el sobrenadante de la muestra.
- Añadir 100 µL del tampón de elución a los tubos de elución y utilizar el programa de ejecución seleccionado para el aislamiento óptimo del ARN "Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid" incluido en el software del equipo.

Alternativamente, el uso de otros kits comerciales o métodos manuales de extracción de RNA viral diferentes a los descritos pueden ser utilizados, pero deben ser previamente sujetos a su validación por parte de los laboratorios.

QIAamp Viral RNA
Mini Spin Procedure










1. Add Plant and Lysis buffer	 + 600 μ L Lysis Buffer + 25 μ L Plant RNA Isolation Aid 150 μ L concentrated sample
2. Remove debris and heat	 Vortex \rightarrow  Supernatant 70 $^{\circ}$ C, 5 min 10 000 x g, 5 min
3. Adjust binding conditions	 600 μ L ethanol
4. Bind viral RNA	 Load sample stepwise x2 8,000 x g, 1 min
5. Wash and dry silica membrane	 1 st wash 500 μ L RAW 2 nd wash 600 μ L RAV3 3 rd wash 200 μ L RAV3 1 st and 2 nd 8,000 x g, 1 min 3 rd 11,000 x g, 5 min
6. Elute highly pure RNA	 50 μ L RNase-free H ₂ O (70 $^{\circ}$ C) RT, 1-2 min x2 11,000 x g, 1 min 100 μ L Final elute volume

Figura 2. Proceso de extracción del RNA viral. Adaptado desde Qiagen QIAamp® Viral RNA (izquierda) y Machery-Nagel NucleoSpin Virus, Mini kit for viral RNA/DNA purification User Manual (derecha).



DETECCION Y CUANTIFICACION DEL RNA VIRAL

- El RNA extraído se manipulará en el laboratorio de preparación de PCR adoptando en todo momento las buenas prácticas de trabajo.
- La detección se llevará a cabo utilizando la PCR cuantitativa de Applied Biosystem 7500, LightCycler 480 o un equipo similar.
- La PCR cuantitativa (RT-qPCR) incluye hasta seis dianas víricas (**Tabla 1**):
 1. RT-qPCR de 4 dianas víricas específicas para SARS-CoV-2:
 - 1.1. Fragmento IP4;
 - 1.2. Fragmento E;
 - 1.3. Fragmento N1;
 - 1.4. Fragmento N2.

La detección y cuantificación debe hacerse utilizando al menos dos dianas de las cuatro descritas. La selección de las dos dianas se deja a la elección de cada laboratorio.

2. RT-qPCR específica para los controles de proceso (mengovirus o PEDV) y así monitorizar la eficiencia del proceso de concentración y extracción. Se analizarán dos pocillos de RNA directo y dos pocillos de la dilución -1 para cada muestra para monitorizar la presencia de inhibidores de PCR.
- La **Tabla 2** muestra la preparación de Master Mix en el caso de que se utilice la master mix One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time; RR064A). Si se utiliza otra master mix, los volúmenes y concentraciones pueden variar.
 - La **Tabla 3** muestra los ciclos de temperatura y tiempo para las PCRs necesarias para la detección SARS-CoV-2, PEDV y mengovirus en el caso de que se utilice la master mix One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit.



Tabla 1. Secuencia de cebadores y sondas.

Diana	Nombre	Secuencia 5'-3'	Long (nt)	Ref.
IP4	nCoV_IP4-I4059Fw	GGTAACTGGTATGATTTTCG	19	Institut Pasteur (2020)
	nCoV I_IP4-I4146Rv	CTGGTCAAGGTTAATATAGG	20	
	nCoV_IP4-I4084Probe(+)	FAM-TCATACAAACCACGCCAGG-BHQI	19	
E	E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	18	Corman et al., 2019
	E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	20	
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQI/TAMRA	20	
N1	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAATCAGCGAAAT	20	CDC, 2019
	2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG	24	
	2019-nCoV_N1-P	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQI	24	
N2	2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAA	20	CDC, 2019
	2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA	18	
	2019-nCoV_N2-P	FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQI	23	
Mengovirus	Mengo 110 (FW)	GCG GGT CCT GCC GAA AGT	18	Pintó et al., 2009
	Mengo 209 (REV)	GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC	26	
	Mengo 147 (PROBE)	FAM-ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC-MGBNFQ	20	
PEDV	PEDV_forward	CAGGACACATTCTTGGTGGTCTT	23	Zhou et a.,
	PEDV_reverse	CAAGCAATGTACCACTAAGGAGTGTT	26	
	PEDV_probe	FAM-ACGCGCTTCTCACTAC-MGB	16	

Preparación de la Master Mix y de la placa

Nota: La configuración y preparación de la placa puede variar dependiendo de la carga de trabajo del día y del tipo de muestra.

1. En el laboratorio específico para la preparación de las PCRs y con la superficie limpia colocar los siguientes reactivos entre hielo: tampón RT-qPCR, enzima y cebadores/sonda. Mantén los reactivos refrigerados durante su uso.
2. Mezclar el tampón, el enzima y los cebadores/sonda 5 veces.
3. Centrifugar los reactivos y los cebadores/sonda durante 5 segundos para colocar el contenido al final del tubo y después colócalo en una gradilla refrigerada.
4. Etiqueta cada tubo de microcentrifuga de 1,5 mL por cada ser de cebadores/sonda (p.ej., IP4, gen E, gen N, PEDV, mengovirus).
5. Determina el número de reacciones (N) que hay que preparar para cada ensayo.



Es necesario preparar la mezcla de la reacción incluyendo los controles positivos (N=2) y negativos (N=2) que deben incluirse en todas las RT-qPCRs. Para la diana IP4, como control positivo se puede utilizar un RNA genómico (ATCC, ref. VR-1986D) o Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3); para el resto de dianas además se pueden utilizar: para la diana E el control positivo el 2019-nCoV_E Positive Control (IDT, ref. 10006896) o el RNA sintético (EURM-019) y para las dianas NI y N2 el 2019-nCoV_N_Positive Control (IDT, ref. 10006625) o el RNA sintético (EURM-019). El control negativo será agua libre de RNAsas.

6. La mezcla de la reacción será en exceso debido a los errores del pipeteo. Usa la siguiente guía para determinar N:
 - a. Si el número de muestras (n) incluyendo los controles es menor de 14, entonces calcula $N = n + 1$;
 - b. Si el número de muestras (n) incluyendo todos los controles es mayor de 14: $N = n + 2$.
7. Para cada set de cebadores/sonda, calcula la cantidad de cada reactivo que debes de añadir para cada mezcla de reacción (N= número de reacciones). La composición de las distintas reacciones de RT-qPCR para una sola muestra (N=1) se detallan en las tablas siguientes:

Tabla 2. Composición de las distintas reacciones de RT-qPCR cuando el equipo no necesita ROX.

	SARS-CoV-2			Controles de proceso	
	IP4	E	NI/N2	Mengovirus	PEDV
2x One Step (µl)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Takara Ex Taq (µl)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Prime Script Enzyme (µl)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Forward primer (µl)	0,40 ^a	0,50 ^b	0,75 ^c	0,50 ^a	0,50 a
Reverse primer (µl)	0,40 ^a			0,50 ^a	0,50 a
Sonda (µl)	0,20 ^a			0,50 ^a	0,50 a
ROX (µl)	- ^d	-	-	0,20	0,20
H ₂ O (µl)	1,10	1,60	1,35	0,40	0,40
RNA (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

- a. La solución madre de cebadores y sondas a concentración de 10 µM.
- b. SARS-CoV-2 (2019-nCoV) CDC qPCR Probe Assay, RUO Kit, IDT, Ref. 10006713.
<https://eu.idtdna.com/pages/landing/coronavirus-research-reagents/cdc-assays>



c. SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Charité/Berlin Primer Probe Panel, E Assay_First Line Screening, Ref. 10006804. <https://eu.idtdna.com/pages/landing/coronavirus-research-reagents/who-assays>

d. Añadir 0.20 µL de ROX en la master mix a 10 µL de volumen final cuando el equipo utilizado lo requiera.

Tabla 3. Composición de las distintas reacciones de RT-qPCR cuando el equipo necesita ROX.

	SARS-CoV-2			Controles de proceso	
	IP4	E	NI/N2	Mengovirus	PEDV
2x One Step (µl)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Takara Ex Taq (µl)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Prime Script Enzyme (µl)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Forward primer (µl)	0,40 ^a	0,50 ^b	0,75 ^c	0,50 ^a	0,50 ^a
Reverse primer (µl)	0,40 ^a			0,50 ^a	0,50 ^a
Sonda (µl)	0,20 ^a			0,50 ^a	0,50 ^a
ROX (µl)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
H ₂ O (µl)	0,90	1,40	1,15	0,40	0,40
RNA (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

a. La solución madre de cebadores y sondas a concentración de 10 µM.

b. SARS-CoV-2 (2019-nCoV) CDC qPCR Probe Assay, RUO Kit, IDT, Ref. 10006713. <https://eu.idtdna.com/pages/landing/coronavirus-research-reagents/cdc-assays>

c. SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Charité/Berlin Primer Probe Panel, E Assay_First Line Screening, Ref. 10006804. <https://eu.idtdna.com/pages/landing/coronavirus-research-reagents/who-assays>



Tabla 4. Programas de RT-qPCR para las distintas dianas moleculares para la detección de SARS-CoV-2, PEDV y mengovirus.

Paso	SARS-CoV-2						Controles de proceso		
	IP4/E			NI/N2			PEDV/mengovirus		
	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción	55°C	20 min	1x	50°C	15 min	1x	45°C	15 min	1x
Desnaturalización	95°C	3 min	1x	95°C	2 min	1x	95°C	2 min	1x
PCR	95°C	15 sec	50x	95°C	3 sec	45x	95°C	15 sec	45x
	58°C	30 sec		55°C	30 sec		60°C	1 min	

CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Es necesario visualizar las curvas de amplificación siguiendo las instrucciones del equipo de PCR cuantitativa, para determinar presencia de Cts (cycle threshold, ciclo umbral) aberrantes o erróneos.

1. Controles de RT-qPCR:

Para cada diana analizada, el respectivo control positivo de RT-qPCR es positivo (con amplificación) y el control negativo resulta negativo (sin amplificación) → ensayo validado.

El control positivo de RT-qPCR es negativo → ensayo no valido, repetir la RT-qPCR.

El control negativo de PCR y/o extracción es positivo → ensayo no valido.

2. Positividad de SARS-CoV:

- Las dos dianas son negativas → **NEGATIVO**;
- Las dos dianas son positivas → **POSITIVO**;
- Una diana es positiva y la otra es negativa → **POSITIVO** a confirmar mediante RT-qPCR de una tercera diana:
 - Si la tercera diana da positiva → **POSITIVO**;
 - Si la tercera diana da negativa → **PRESUNTO POSITIVO**.

3. Control de proceso:

- Se considerarán válidos aquellos resultados en los que el porcentaje de recuperación del control de proceso sea $\geq 1\%$ en alguna de las dos diluciones ensayadas %) (ISO 15216-1, 2017).



CRITERIOS DE CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS POSITIVAS

1. Se convertirán los valores de $Ct < 40$ de cada pocillo a copias genómicas/L interpolando el Ct de la muestra problema a las rectas patrón externas construidas con diluciones seriadas en base 10 de material de referencias cuantificado.
2. La recta patrón de cada gen debe tener un coeficiente de correlación mínimo (r^2) de 0,98 y la pendiente de la recta debe estar entre -3,10 y -3,60 (corresponde a unas eficiencias de amplificación del 90 al 110 %) (ISO 15216-1, 2017).

REFERENCIAS

- ISO 15216-1, 2017. Microbiology of the Food Chain e Horizontal Method for Determination of Hepatitis A Virus and Norovirus Using Real-Time RT-PCR Part I: Method for Quantification. ISO 15216-1:2017.
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G. 2020. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Research* 181: 115942 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>.
- Institut Pasteur, Paris. Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. 2020 2; Corman, V.M., et al., Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020. 25(3);
- CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR RUO Panel <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>;
- Pintó R.M., Costafreda M.I., Bosch A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75 pp. 7350–7355;
- Zhou, X., Zhang, T., Song, D., Huang, T., Peng, Q., Chen, Y., Li, A., Zhang, F., Wu, Q., Ye, Y., Tang, Y. 2017. Comparison and evaluation of conventional RT-PCR, SYBR green I and TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cell Prob*, 33, pp. 36–41.



ENVÍO DE LAS MUESTRAS CONCENTRADAS

- Para el envío de las muestras concentradas entre laboratorios, se procederá de la siguiente manera:
 - Las muestras bien etiquetadas y en bolsas herméticas se congelarán a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras tendrán un volumen igual o inferior a 3 mL.
 - Las bolsas herméticas que tienen en su interior las muestras se colocarán entre papel absorbente para evitar derrames.
 - La bolsa envuelta en papel absorbente se colocará dentro de una caja de poliespán en cuyo interior se colocará hielo seco. Esta caja se precintará y se introducirá en una segunda caja de cartón que también se precintará para su envío y se colocará un cartel que indicará que son muestras de peligro biológico.
 - Las muestras se recibirán en el instituto por personal especializado.



Todas las cajas que transporten muestras llevarán un indicativo de peligro biológico de tamaño 10 x 10 cm².



ANEXO I. Información relativa a los códigos de referencia del material y reactivos empleados.

- Los materiales propuestos son lo que han sido utilizados para los distintos estudios de SARS-CoV-2 en aguas residuales y pueden ser sustitutos por otros de igual o mejor calidad o rendimiento. Los nombres de proveedores, fabricantes o productos específicos se incluyen solo con fines informativos y no implican el respaldo de los Autores o sus afiliaciones. Los autores declaran que no tienen intereses económicos o relaciones personales que puedan haber influido en la selección del material detallado a continuación.

Material	Referencia	Proveedor
Mengovirus	vMCO CECT 100000	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)
Tiras pH	2614-991	Whatman
Aluminium chloride (AlCl ₃)	195785000	ACROS Organics
Beef extract	1700.00	Condalab
QIAamp® Viral RNA	52904	Qiagen
Nucleospin RNA virus Kit	740956	Macherey-Nagel
Plant RNA isolation aid	AM9690	Ambion
Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit	ASI600	Promega
One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR064A	TAKARA
SARS-CoV-2 RNA genómico	VR-1986D	ATCC
Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2	MN908947.3	Twist Bioscience HQ
2019-nCoV_E Positive Control	10006896	IDT
2019-nCoV_N_Positive Control	10006625	IDT



Contactos:

IATA-CSIC

Dra. Gloria Sánchez: gloriasanchez@iata.csic.es

Dr. Walter Randazzo: wrandazzo@iata.csic.es

CEBAS-CSIC

Dra. Ana Allende: aallende@cebas.csic.es

Dra. Pilar Truchado: ptruchado@cebas.csic.es

Agradecimientos:

Agradecer a Pedro Tomás Martín de la Vega - Responsable del Laboratorio del Consorcio PROMEDIO (Badajoz), su ayuda y colaboración en los aspectos relacionados con la toma de muestra de las aguas residuales en la EDAR.

Protocolo adaptado de la publicación: Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G. 2020. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. Water Research 181: 115942 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>

Sugerencia de cita: Randazzo, W., Truchado, P., Allende, A., Sánchez, G. 2020. Protocolo para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales. VIARAL-CSIC. Acceso página web: <https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/concesiones-y-autorizaciones/vertidos-de-aguasresiduales/alerta-temprana-covid19/default.aspx>