



IL MONITORAGGIO DEL SARS-COV2 NELLE ACQUE REFLUE: INTEGRAZIONE TRA SISTEMI DI SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA E AMBIENTALE

**Arianna Azzellino¹, Manuela Antonelli¹, Giorgio Bertanza², Marta Domini²,
Andrea Turolla¹, Francesca Malpei¹**

¹ Politecnico di Milano, Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale

² Università degli Studi di Brescia, Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio, Ambiente e di Matematica

È il 9 gennaio 2020, quando viene data notizia dell'identificazione di un nuovo Coronavirus come agente causale della malattia respiratoria che poi verrà denominata Covid-19. Pochi mesi dopo, l'11 Marzo 2020, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) dichiarerà lo stato di pandemia. Da allora e nei due anni a seguire il mondo intero ha dovuto imparare a fare i conti con una malattia dal decorso spesso aspecifico e simil-influenzale, in grado di causare disturbi lievi nella maggior parte dei soggetti infettati, ma col rischio elevato di una rapida evoluzione fino a quadri più gravi e spesso mortali in fasce di popolazione più fragili. Il grado di diffusività risulta talmente elevato da sovraccaricare le capacità dei sistemi sanitari dei diversi Paesi, richiedendo, almeno inizialmente,

precedentemente alla disponibilità dei vaccini, severe misure di contenimento e di restrizione delle libertà individuali. L'economia di molti Paesi subisce un significativo arresto, così come il nostro vissuto quotidiano che ancora oggi fatica a ritornare quello precedente alla pandemia.

L'Italia viene duramente colpita dalla prima ondata della pandemia e gli organi competenti in materia di sanità si attivano per istituire sistemi di sorveglianza per monitorare la presenza del virus, integrando i dati microbiologici ed epidemiologici forniti da Regioni e Province Autonome (PA), sotto il coordinamento del Laboratorio Nazionale di Riferimento per SARS-CoV-2 dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS). Per lungo tempo questo monitoraggio rimane l'unica guida per le

autorità per definire le regole di contenimento dell'emergenza sanitaria. Tuttavia, il virus si diffonde molto velocemente e manifesta altrettanto velocemente la capacità di dare origine a varianti più contagiose del ceppo originario.

In questo contesto nasce e cresce da subito l'interesse a valutare la fattibilità di integrare i sistemi di sorveglianza epidemiologica e microbiologica con una sorveglianza ambientale basata sull'analisi delle acque reflue. In ambito virologico, la sorveglianza ambientale sulle acque reflue (Wastewater Based Epidemiology, WBE), basata sul principio che i virus vengono escreti dai soggetti infetti in quantità rilevanti, per periodi più o meno lunghi, e quindi risultano tracciabili attraverso la rete fognaria, era già operativa da anni su alcuni virus con via di trasmissione oro-fecale, come i poliovirus (WHO, 2003)

I principi base della WBE sono: consentire di intercettare precocemente e rapidamente la presenza e circolazione del virus in ampi territori, approfondire la conoscenza delle relazioni tra soggetti sintomatici e asintomatici, contribuire alla conoscenza sulla circolazione di "Variants of Concern" (VoC) e supportare i processi decisionali.

I pozzetti in fognatura e le acque reflue in ingresso ai depuratori costituiscono infatti importanti punti di osservazione sulla circolazione di virus, e non solo, nella popolazione, consentendo di ottenere campioni aggregati di reflui provenienti da interi centri urbani e quindi di circoscrivere queste aree di circolazione.

Rimaneva il dubbio però che una sorveglianza di questo tipo potesse essere efficace anche nel caso di virus con trasmissione attraverso le vie respiratorie, come il SARS-CoV-2. Durante la pandemia, diversi sono stati gli studi che hanno evidenziato tracce del genoma di SARS-CoV-2 nelle acque reflue in moltissime aree del mondo, tra cui Paesi Bassi, USA, Francia, Spagna, Australia, Cina, Giappone, Regno Unito e Israele (Tran et al., 2021).

In ragione di questi studi, diversi Paesi hanno dato avvio a programmi di sorveglianza ambientale del SARS-CoV-2 nei reflui urbani e hanno creato dei network per lo scambio di informazioni in tempo reale fra ricercatori di tutto il mondo (Bivins et al. 2020).

Uno degli ambiti di intervento riconosciuti come necessari nella Raccomandazione della Commissione Europea 2021/472 del 17 marzo 2021 per affrontare l'emergenza sanitaria innescata dalla pandemia è la rapida individuazione delle varianti di SARS-CoV-2 che destano preoccupazione (VoC). Gli studi condotti a livello Europeo ed extra-Europeo hanno infatti dimostrato come la sorveglianza del SARS-CoV-2 e delle sue varianti nelle acque reflue possa costituire una fonte

di informazioni rapida e affidabile sulla diffusione del virus nella popolazione ed efficiente sotto il profilo dei costi, potendo anche contribuire in misura rilevante a rafforzare la sorveglianza genomica ed epidemiologica.

Il monitoraggio delle acque reflue viene perciò considerato un approccio complementare e indipendente alle strategie di sorveglianza e di test della Covid-19.

La rete di monitoraggio necessaria però, così come le procedure ad essa correlate, dovevano essere totalmente create non essendoci già un framework esistente facilmente adattabile a questa nuova esigenza.

In Italia, nel luglio 2020, veniva avviato il progetto SARI ("Sorveglianza Ambientale di SARS-CoV-2 attraverso i Reflui urbani in Italia"), un progetto non finanziato, avviato dall'ISS e condiviso con il Cip – Coordinamento interregionale della prevenzione, Commissione salute, Conferenza delle Regioni e Province autonome –, che si avvaleva della disponibilità volontaria di laboratori di diverse regioni italiane e della cooperazione del Sistema Nazionale di Protezione Ambientale (Snpa) e dell'Associazione delle aziende idriche Utilitalia.

Il progetto SARI ha perciò costituito una prima fase preparatoria per il monitoraggio auspicato dalla Raccomandazione dell'Unione Europea partito nell'ottobre 2021.

Nell'ambito di SARI furono sviluppati gli indirizzi metodologici e procedurali per il campionamento e l'analisi dei reflui, e viene definita una prima bozza delle gerarchie e dei flussi procedurali delle attività di monitoraggio a partire dalle strutture regionali o delle province autonome aderenti al progetto, fino al coordinamento nazionale di competenza ISS.

Gli enti aderenti hanno così proceduto ad una prima individuazione di siti di campionamento (notevolmente variabile per estensione e frequenza di campionamento e analisi) e di strutture operative responsabili del prelievo dei campioni e/o delle procedure analitiche di estrazione del genoma e identificazione/quantificazione di SARS-CoV-2 nei reflui. Sempre in ambito SARI, è stata anche creata una dashboard di acquisizione e gestione dati ad accesso controllato, funzionale ad essere alimentata e visualizzata da Regioni e Province autonome, con il coordinamento di ISS.

Fin da questa prima esperienza emergono difficoltà ed elementi confondenti associabili sia ai fattori ambientali, che possono influenzare le caratteristiche qualitative dei reflui, sia alle procedure di campionamento, analisi e di acquisizione e trasferimento dati adottate dai diversi laboratori della rete.

Il riflesso di queste difficoltà è anche testimoniato dalla limitata copertura territoriale e rappresentatività dell'archivio dati creato, il cui flusso dati in ingresso è stato discontinuo e sporadico, e spesso addirittura fornito in forma retrospettiva.

Il progetto SARI viene poi incardinato in un primo programma di finanziamento del Ministero della Salute avviato nel marzo 2021, che prevedeva la partecipazione formale di 14 Regioni/Province autonome con capofila la Regione Lombardia e una durata di 24 mesi e consentiva alle Regioni/Province autonome aderenti di cominciare a preparare il terreno per la sorveglianza effettiva.

La Regione Lombardia, tra le prime Regioni ad aderire al progetto SARI, ha potuto a sua volta avvalersi di una rete di collaborazione locale di Università e Istituti di Ricerca ("Rete Lombarda WBE"), nata in precedenza sulla spinta del Dipartimento di Ingegneria Civile Ambientale del Politecnico di Milano, in collaborazione con il Dipartimento DICATAM dell'Università di Brescia, e annoverante diverse eccellenze lombarde per la parte di estrazione e quantificazione del genoma di SARS-CoV-2 nei reflui quali l'Università Bicocca, l'Università Statale di Milano, l'IRSA CNR, l'Università Cattolica di Piacenza e Cremona, l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri e l'Istituto Zoonosologico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER).

Nell'ambito delle attività della "Rete Lombarda WBE" è stato infatti organizzato un ring test di inter-confronto tra i laboratori per verificare la confrontabilità delle procedure di estrazione e di quantificazione analitica adottate (Pellegrinelli et al., 2022) ed è stato raccolto un primo importante pool di dati dagli impianti delle aree più colpite fin dalla prima ondata del Covid-19, con i quali si sono iniziati a valutare l'affidabilità dei metodi e i possibili approcci all'elaborazione dei dati. L'esperienza e le collaborazioni maturate in seno alla Rete Lombarda WBE costituiscono anche attualmente il principale supporto conoscitivo per la sorveglianza operativa promossa con la raccomandazione EU che ha preso avvio effettivo nell'ottobre 2021. Da sottolineare l'importanza della stretta collaborazione con le società di gestione dei numerosi impianti di depurazione che hanno aderito all'iniziativa, attuando, con proprie risorse, i piani di monitoraggio proposti dal gruppo di ricerca.

Se una lezione deve infatti essere appresa dall'esperienza della WBE, è la necessaria complementarità delle competenze e la standardizzazione delle proce-

sure a partire dal prelievo del campione fino ad arrivare alla archiviazione ed alla elaborazione integrata ed interpretazione dei dati.

Su questi temi sono diverse le questioni scientifiche ancora aperte, quali la scelta dei geni di riferimento più opportuni per la miglior quantificazione del genoma del SARS-CoV-2, la possibilità che specifiche caratteristiche territoriali delle reti fognarie possano influenzare l'anticipo o il ritardo del segnale presente nei reflui rispetto alla curva epidemica, la necessità di normalizzare il carico virale rilevato nel refluo con stime affidabili e articolate degli abitanti ed abitanti equivalenti allacciati, nel tentativo di valutare non soltanto l'andamento relativo della curva epidemica, ma anche la percentuale di infetti sulla popolazione allacciata, la frequenza di una particolare variante nella popolazione, o la scelta di un approccio di tipo statistico-regressivo piuttosto che concettuale-deterministico per lo sviluppo di modelli di previsione in grado supportare i processi decisionali.

Su tutti questi aspetti sarà importante il contributo dell'Ingegneria Ambientale che potrà fornire il know-how per interpretare correttamente i risultati analitici senza il disturbo dei possibili "fattori di confondimento" (ad esempio, effetto delle condizioni meteorologiche, variabilità della popolazione allacciata, effetto della temperatura sulle cinetiche di scomparsa e degradazione delle tracce virali) e per sviluppare gli opportuni modelli di stima del valore rilevato nei reflui con le caratteristiche della curva epidemica. ■

Riferimenti bibliografici

- Bivins A. et al., 2020 Wastewater-Based Epidemiology: Global Collaborative to Maximize Contributions in the Fight Against COVID-19. *Environmental Science & Technology*, 54 (13), 7754-7757. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02388>
- Pellegrinelli L., Castiglioni S., Cocuzza C., Bertasi B., Primache V., Schiarea S., Salmoiraghi G., Franzetti A., Musumeci R., Tilola M., Galuppini E., Bertanza G., Callegari M., Stefani F., Turolla A., Ammoni E., Cereda D., Pariani E., Binda S., 2022, The WBE Study Group Evaluation of Pre-Analytical and Analytical Methods for Detecting SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater Samples in Northern Italy. *Water*, 14 (5), 833. <https://doi.org/10.3390/w14050833>
- Tran H.N., Le G.T., Nguyen D.T. et al., 2021, "Sars-cov-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern", *Environ Res.*, 193.
- WHO, 2003, Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. WHO, Department of Vaccines and Biological, Doc n. WHO/V&B/03.03.