
Webinar

COVID-19: SICUREZZA DEL CICLO IDRICO INTEGRATO E PROSPETTIVE DI RICERCA

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 18 maggio 2020

Lucia Bonadonna, Valentina Fuscoletti, Marcello Iaconelli, Giuseppina La Rosa,
Luca Lucentini, Camilla Marchiafava, Daniela Mattei
Dipartimento di Ambiente e Salute, ISS

RIASSUNTO - Alla luce dei primi ritrovamenti in Italia di materiale genetico di SARS-CoV-2 nelle acque di scarico, l'articolo riassume i temi trattati nel corso del webinar, finalizzato ad affrontare la fattibilità e la valenza strategica della sorveglianza ambientale sui virus in acque reflue come possibile strumento di prevenzione e controllo di focolai epidemici, anche attraverso specifici aggiornamenti sulla ricerca analitica del virus in matrici idriche complesse. Il webinar è stato organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in collaborazione con l'Istituto per la Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-IRSA).

Parole chiave: sorveglianza ambientale; virus; acque reflue

SUMMARY (*COVID-19: Safety of the integrated water cycle and research perspectives*) - The paper summarizes the issues discussed during the webinar aimed at addressing, in light of the first findings in Italy of genetic material of SARS-CoV-2 in wastewater, the feasibility and strategic value of environmental surveillance on viruses in wastewater. This could be a possible tool for prevention and control of epidemic outbreaks, also through specific updates on the analytical research of the virus in complex water matrices. The webinar was organized by the Italian National Institute of Health (ISS) with the collaboration of the Institute for Water Research of the National Research Council (CNR-IRSA).

Key words: environmental surveillance; virus; wastewater

giuseppina.larosa@iss.it

Accompagnati dal benvenuto di Luigi Bertinato, Responsabile della Segreteria Scientifica di Presidenza dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), e di Giuseppe Mascolo, Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), dopo la presentazione degli obiettivi del webinar da parte di Luca Lucentini, Direttore del Reparto Qualità dell'Acqua e Salute dell'ISS e da Lucia Bonadonna, Direttore f.f. del Dipartimento di Ambiente e Salute (DAMSA) dell'ISS, nella prima parte del webinar gli autori hanno evidenziato l'importanza dei risultati della sorveglianza ambientale sui virus in acque reflue come strumento di prevenzione e di controllo. In particolare, Giuseppina La Rosa (DAMSA/ISS) ha evidenziato come la possibilità di utilizzare i reflui urbani per la sorveglianza di patogeni virali è riconosciuta fin dagli anni '40 del secolo scorso, a seguito dei primi studi sulla presenza di poliovirus in acque reflue, e come dalla concentrazione del virus in reflui urbani si possa, sebbene con complicati algoritmi, stimare il numero dei contagiati.

L'esperienza del DAMSA/ISS in questo settore risale a un progetto CCM (Centro Nazionale per il Controllo delle Malattie del Ministero della Salute) del 2007, in cui vennero utilizzati i reflui urbani per la sorveglianza di virus enterici a trasmissione fecale-orale, ed è continuata negli anni successivi attraverso il coinvolgimento e il coordinamento di molti altri progetti di ricerca e accordi di collaborazione per la ricerca sia di virus enterici (enterovirus, virus dell'epatite A ed E, norovirus, adenovirus, virus enterici associati a gastroenteriti) sia di virus non tipicamente enterici (papilloma virus, poliovirus), collezionando oltre 1.700 campioni di reflui utilizzabili anche per studi retrospettivi. Con questo razionale sono stati analizzati alcuni campioni di reflui urbani per la ricerca del SARS-CoV-2, rivelandone la presenza nei reflui di Milano il 24 e 28 febbraio 2020, in concomitanza con il primo caso autoctono registrato in Italia* (21 febbraio 2020).

Tali risultati confermano la validità dell'approccio Wastewater-Based Epidemiology (WBE), già riconosciuto a livello internazionale, per fornire importanti

(*) Comunicato Stampa ISS 30/2020 del 22 aprile 2020 (www.iss.it/comunicati-stampa1).

informazioni sia durante la fase epidemica (andamento epidemico nel tempo, circolazione geografica e data di comparsa del virus in una certa Regione prima della evidenza di casi clinici, se disponibili campioni di archivio) sia durante la fase non-epidemica (comparsa/ricomparsa del virus consentendo quindi di riconoscere e circoscrivere più rapidamente eventuali nuovi focolai epidemici). L'utilità di questo tipo di approccio appare evidente nella rappresentazione della cosiddetta "piramide della sorveglianza" (Figura 1): rispetto alle persone che hanno contratto l'infezione, solo una parte si rivolge al personale sanitario, mentre gran parte può essere asintomatica oppure paucisintomatica con risoluzione spontanea dei sintomi; una parte ha necessità di rivolgersi al Servizio Sanitario Nazionale (SSN) e solo i casi ospedalizzati o notificati al Sistema di sorveglianza vengono evidenziati nelle statistiche. In questo contesto, se la sorveglianza clinica indirizza alla punta della piramide, la sorveglianza ambientale si rivolge alla sua base, individuando l'insieme delle infezioni all'interno della popolazione, incluse quelle asintomatiche o paucisintomatiche. Su tali basi, è in fase di definizione, con il coordinamento dell'ISS, la Rete Nazionale di Sorveglianza Epidemiologica di SARS-CoV-2 nei reflui urbani, costituita a livello territoriale dalle Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (ARPA), dalle Aziende Sanitarie

Locali (ASL), dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS), da Università e centri di ricerca, e da gestori idro-potabili, e che punta a ottenere dati omogenei e confrontabili. I partecipanti effettueranno analisi con un protocollo condiviso da applicare su tutto il territorio nazionale.

Marcello Iaconelli (DAMSA/ISS) ha successivamente illustrato i dettagli tecnici per la ricerca di SARS-CoV-2 in acque reflue, dal campionamento al rilevamento, attraverso le fasi di conservazione e trasporto del campione a -20 °C e la concentrazione dello stesso (per i dettagli relativi al metodo si rimanda al rif. bibl. n. 1).

La seconda parte del webinar è stata dedicata alla presentazione di studi di carattere ambientale, tesi a monitorare la diffusione del SARS-CoV-2 nel ciclo delle acque dell'area metropolitana compresa tra Milano e Monza, condotti nel mese di aprile 2020 dal CNR-IRSA in collaborazione con il Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'Azienda SocioSanitaria Territoriale (ASST) Fatebenefratelli-Sacco di Milano, con le seguenti finalità:

- valutazione della capacità di abbattimento del SARS-CoV-2 di tre impianti di depurazione, equipaggiati con trattamenti secondari e disinfezione terziaria, attraverso la ricerca di RNA virale; ▶



Figura 1 - Piramide della sorveglianza

(*) Adattato da: Nieuwenhuijse DF, Koopmans MP. Metagenomic sequencing for surveillance of food-and waterborne viral diseases. *Front Microbiol* 2017;8:230 (2).

- ricerca della presenza dell'RNA virale SARS-CoV-2 nelle acque superficiali di corpi idrici recettori;
- studio della vitalità del virus prima e dopo i sistemi di trattamento dei reflui;
- sequenziamento del genoma e analisi filogenetica dei ceppi isolati di SARS-CoV-2.

È stata in particolare evidenziata la rapidità che caratterizza il disegno sperimentale: dal prelievo del campione alla consegna al laboratorio per l'analisi (≤ 3 ore), sottoponendo i campioni al minimo di manipolazione (solo filtrazione rapida), garantendo l'assenza di elementi di disturbo nella catena sperimentale.

I risultati dello studio, in parte descritti da Stefano Polesello (CNR-IRSA), evidenziano che i reflui in ingresso al depuratore sono contaminati da significative quantità di RNA virale, che viene tuttavia per la maggior parte eliminato nei processi depurativi. D'altra parte, il materiale genetico rilevato anche in corpi idrici superficiali è probabilmente da attribuire alla presenza di reflui non trattati di varia origine (scarichi illeciti, scarichi ancora non collettati, malfunzionamento degli scolmatori di piena) (Figura 2). In nessuno dei campioni analizzati, negativi o positivi al SARS-CoV-2, è stata riscontrata evidenza di patogenicità. I dati dello studio, confrontabili con quelli relativi a due studi, condotti rispettivamente nei depuratori di Parigi (3) e nella regione di Valencia (4), hanno confermato come la presenza dell'RNA virale nel depuratore era in grado di anticipare l'evidenza clinica dei contagi.

Sara Rimoldi (ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano) ha completato la presentazione dello studio con la descrizione del protocollo analitico applicato per la ricerca di SARS-CoV-2 nelle acque reflue e la valutazione dell'infettività del virus. In sintesi, i campioni venivano concentrati mediante un processo in due fasi di prefiltrazione e di filtrazione, seguite da estrazione genomica. I genomi estratti venivano analizzati mediante un test RT-qPCR qualitativa e sottoposti a sequenziamento del genoma intero. Gli ampliconi venivano assemblati e analizzati per stabilirne le relazioni filogenetiche. Una seconda aliquota non concentrata dei campioni veniva inoculata su monostrato di cellule competenti per verificare la presenza di particelle virali infettive (per i dettagli relativi al metodo si rimanda al rif. bibl. 5).

Sugli stessi campioni di reflui in ingresso al depuratore è stata effettuata anche una misura della presenza di alcuni farmaci che possono essere impiegati per le terapie anti-COVID (di tipo antibiotico o antinfiammatorio), con lo scopo di valutare se questi potessero rappresentare, oltre che un rischio sanitario (ad esempio, per aumento dell'antibiotico-resistenza), un rischio ambientale aggiuntivo a quello già rappresentato dalla pressione antropica su questo bacino idrico popoloso e industrializzato. I primi risultati hanno consentito l'identificazione di alcune di queste sostanze (idrossiclorochina e il suo metabolita desetil-clorochina, il Darunavir, paracetamolo, antibiotici, azitromicina, acido clavulanico) e hanno messo in evidenza la per-

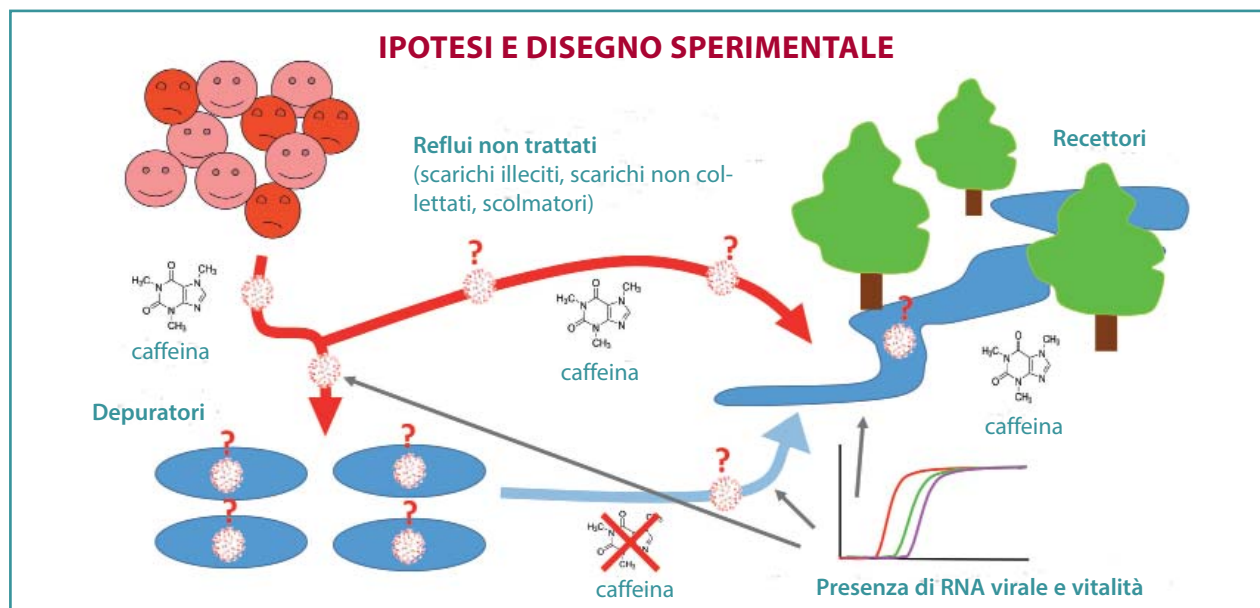


Figura 2 - Rappresentazione grafica dello studio IRSA-CNR



Ingresso del refluo urbano all'impianto di depurazione

manenza, in alcuni casi, delle sostanze anche negli impianti di depurazione. L'applicazione dell'approccio WBE all'analisi di farmaci e di altre sostanze che l'uomo ingerisce volontariamente o involontariamente, e che una volta metabolizzati raggiungono i collettori fognari e da qui i depuratori cittadini, consente di ottenere importanti informazioni relativamente agli stili di vita (ad esempio, uso di droghe d'abuso, alcol e fumo), esposizione a contaminanti, stato di salute. Le informazioni ricavabili, sia di tipo qualitativo che quantitativo, possono essere prodotte rapidamente in pochi giorni, costituendo uno strumento adatto a fornire informazioni epidemiologiche che possono essere complementari a strumenti indicatori epidemiologici già utilizzati (ad esempio, questionari alla popolazione, statistiche empiriche e studi di monitoraggio). La scelta dei residui metabolici (*biomarker*) deve essere molto accurata:

- devono essere escreti per via urinaria o fecale in concentrazione piuttosto rilevante;
- devono essere stabili nei reflui urbani;
- devono provenire esclusivamente da metabolismo umano.

Nel corso del webinar, Sara Castiglioni (Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano) ha descritto alcune esperienze legate all'applicazione dell'epidemiologia delle acque reflue nell'era COVID-19. La prima riguarda proprio l'analisi dei farmaci utilizzati per il trattamento di COVID-19 per stimare l'effettivo utilizzo nella popolazione rispetto a dati pregressi e anche in relazione a eventuali indicazioni delle Autorità.

L'epidemiologia delle acque reflue è stata inoltre utilizzata come strumento per valutare il cambiamento del profilo di utilizzo delle droghe d'abuso e del consumo di alcol e di fumo a seguito del lockdown nella città di Milano.

La terza parte del webinar, dedicata a evidenziare il contributo dei sistemi a rete alle strategie di sorveglianza e prevenzione, e il ruolo crescente che la virologia ambientale rappresenta nel settore delle acque, ha visto la partecipazione di Giuseppe Bortone (ARPA Emilia-Romagna), in rappresentanza del Sistema Nazionale per la Protezione Ambientale (SNPA)**, e di Anna Laura Carducci (Università di Pisa). Bortone ha chiarito gli obiettivi e il ruolo di SNPA a supporto delle politiche di sostenibilità e di prevenzione ambientale, a tutela della salute pubblica, e ha rimarcato la necessità di una cooperazione ancora più integrata, che punti a fare rete con tutte le componenti del sistema nazionale. Per rafforzare l'efficacia delle politiche ambientali e sanitarie, vi sono già strumenti importanti e fattivi (la rete RIAS - Rete Italiana Ambiente e Salute - e la Task force per il Piano della Prevenzione 2020-2025). A questi si aggiunge il coinvolgimento di SNPA all'implementazione dei Piani di Sicurezza dell'Acqua (PSA). A chiusura dell'intervento, è stata evidenziata la necessità di potenziare la capacità del Sistema in termini di monitoraggio dei rischi biologici e di individuare sistemi di allerta precoce per patogeni emergenti. A dirigere tali interventi per rafforzare la capacità di elaborare programmi e progetti di prevenzione risultano essenziali le attività della Task force Ambiente e Salute, istituita presso il Ministero della Salute.

L'intervento di Anna Laura Carducci ha fornito una sintesi delle conoscenze relative alla valutazione del rischio virologico nel contesto dei PSA. Fino a oggi, si rileva che la sicurezza rispetto alla presenza di virus nell'ambiente è stata poco approfondita. A valle di questa pandemia il problema ha acquisito notevole rilevanza, anche alla luce del possibile utilizzo ai fini di sanità pubblica delle tecniche per rivelare la presenza dei virus. Le conclusioni dell'intervento sollevano alcune questioni aperte, quali l'individuazione di indicatori e surrogati per i trattamenti, la necessità di stabilire i tassi di recupero dei metodi applicati e la necessità di comprendere il rapporto fra infettività virale e copie ►

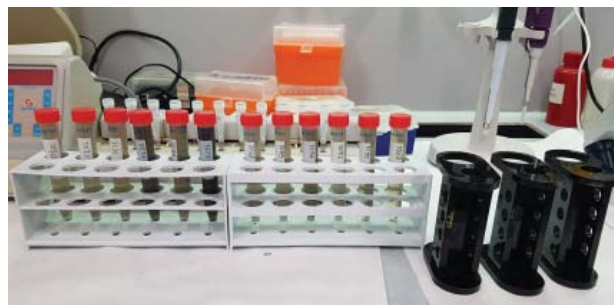
(**) Il Sistema SNPA, istituito dalla Legge 132/2016, è costituito dalle 21 Agenzie regionali e provinciali per la protezione ambientale e da ISPRA, che svolge ruolo di coordinamento.

genomiche. In ultimo, nel richiamare l'importanza di stabilire piani di monitoraggio sensati e limiti critici, viene ribadita l'esistenza dell'approccio QMRA (Quantitative Microbial Risk Assessment), proposto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (6).

Conclusioni

L'evento si è concluso con una Tavola rotonda, finalizzata alla discussione delle possibili sinergie tra Autorità ed Enti gestori per la costruzione di una strategia nazionale di prevenzione e controllo nell'ambito della lotta al COVID-19. Contributi e spunti di riflessione importanti sono venuti dalla rappresentanza delle Regioni. Francesca Russo (Coordinamento Interregionale di Prevenzione, CIP - Commissione Salute della Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome) ha evidenziato come la pandemia abbia posto il rapporto ambiente e salute al centro delle politiche in grado di salvare vite. Il CIP lavora costantemente a un ruolo di prevenzione sanitaria che trasformi le logiche di emergenza in una vera prevenzione, capace di intercettare, nel momento in cui si manifestano, i rischi ambientali. La disponibilità espressa dalle Regioni a partecipare alla Rete di Sorveglianza è fondamentale per garantire la capillarità dei controlli. Nel territorio nazionale tale collaborazione vede una sostanziale conferma dell'Associazione Nazionale Comuni Italiani (ANCI), rappresentata in questa sede da Enrico Stefano (Consigliere comunale e Presidente della Commissione servizi pubblici locali di ANCI nazionale) e da Riccardo Varone (Presidente ANCI Lazio). L'interazione attiva con ANCI sarà fondamentale, come rileva Luca Lucentini, visto che i gestori comunali sono oltre 1.500.

A chiusura degli interventi presentati alla Tavola rotonda, Tania Tellini (coordinatrice delle attività del settore acqua di Utilitalia) ha evidenziato lo sforzo



Fase di estrazione genomica dei campioni di refluo urbano concentrato

profuso dagli operatori delle aziende del Servizio Idrico Integrato (SII) durante l'emergenza per continuare a garantire un servizio fondamentale e sicuro. Proseguendo, ha denotato il ruolo proattivo dei gestori a tutela della risorsa idrica, confermato dal numero elevato di controlli durante l'intero ciclo idrico integrato e dall'elevata adesione all'implementazione dell'approccio PSA. A conferma di tale proattività, Tellini ha sottolineato che Utilitalia e i gestori aderiscono con entusiasmo al Progetto proposto dall'ISS, che rappresenta un'analisi indiretta, non invasiva e su ampia scala.

Il webinar ha registrato in tutte le fasi, dalla programmazione al suo follow-up, uno spiccato interesse: il numero di partecipanti è stato pari a circa 500, molti dei quali esperti appartenenti a enti e istituzioni impegnati nella prevenzione sanitaria e ambientale e nella gestione del ciclo idrico. L'ultima sessione del webinar è stata dedicata a rispondere ad alcune delle domande inviate via web dai partecipanti, alle quali, vista la numerosità, è stato possibile solo in parte dare una risposta durante l'evento, ma a cui è stato risposto successivamente tramite e-mail. A tale proposito è stata istituita una casella mail RefluiCovid-19@iss.it a cui scrivere anche per manifestazioni di interesse alla Rete Nazionale di Sorveglianza. ■

Dichiarazione sui conflitti di interesse

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

Riferimenti bibliografici

1. La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ* 2020;736:139652.
2. Nieuwenhuijse DF, Koopmans MP. Metagenomic sequencing for surveillance of food-and waterborne viral diseases. *Front Microbiol* 2017;8:230.
3. Wurtzer S, Marechal V, Mouchel J-M, et al. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *medRxiv* 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.
4. Randazzo W, Cuevas-Ferrando E, Sanjuan R, et al. Metropolitan Wastewater Analysis for COVID-19 Epidemiological Surveillance. *medRxiv* 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.20076679>
5. Rimoldi SG, Stefani F, Gigantiello A, et al. 2020. Presence and vitality of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *medRxiv* 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.20086009>.
6. World Health Organization. *Quantitative microbial risk assessment. Application for water safety management. Updated November 2016*. Geneva: WHO; 2016.