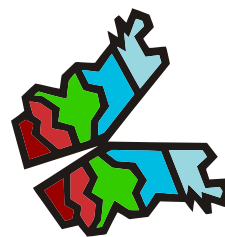


PROGETTO SARI

Sorveglianza Ambientale dei Reflui in Italia

RICERCA DEL VIRUS SARS-COV-2 NEI REFLUI URBANI: I RISULTATI 2021-2023 NELLA REGIONE MARCHE



ARPA
M
AGENZIA REGIONALE
PER LA PROTEZIONE AMBIENTALE
DELLE MARCHE



REPORT

LUGLIO 2023



ARPAM
AGENZIA REGIONALE
PER LA PROTEZIONE AMBIENTALE
DELLE MARCHE



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

ARPAM

Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche
Via Luigi Ruggeri n. 5 – ANCONA

Il Report è stato curato da:
LABORATORIO MULTISITO ARPAM
Sede di Pesaro

Luglio 2023



RICERCA DEL VIRUS SARS-COV-2 NEI REFLUI URBANI: I RISULTATI 2021-2023 NELLA REGIONE MARCHE

Introduzione

Nel mese di giugno 2020 è stato avviato in Italia il **Progetto SARI**, coordinato dall'**Istituto Superiore di Sanità** e a cui - per il territorio marchigiano - hanno aderito **Regione Marche, ARPA Marche e IZS Umbria Marche**, con lo scopo di predisporre un sistema per tracciare la presenza del virus sul territorio nazionale, tramite l'analisi dei reflui urbani.

Il progetto ha richiesto un monitoraggio programmato di sorveglianza ambientale del virus SARS-Cov-2 nei principali reflui urbani e lo studio ha consentito di ottenere risultati statistici affidabili sull'andamento epidemico consentendo di poter programmare eventuali allerte precoci riguardo l'incremento dei contagi e la diffusione di nuove varianti.

L'epidemiologia basata sulle acque reflue ("Wastewater Based Epidemiology") è un approccio che utilizza i reflui urbani come fonte di osservazione dinamica della circolazione dei patogeni. Inizialmente applicata a poliovirus ed altri virus enterici, di recente è stata utilizzata per lo studio della circolazione di SARS-CoV-2 nella popolazione.

ARPA Marche ha aderito al progetto in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico di Fermo: sono stati individuati 6 punti di monitoraggio in corrispondenza degli ingressi dei principali depuratori della Regione Marche (Pesaro-Borgheria; Fano-Ponte Metauro; Fano-Ponte Sasso; Ancona- Zipa; Ancona-Vallechiara; Ancona-Camerano) e sono stati effettuati prelievi con frequenza settimanale per tutta la durata dello studio.

Le analisi sono iniziate a novembre 2021 e i risultati hanno permesso di monitorare la diffusione dei contagi nei principali agglomerati urbani marchigiani.

Materiali e metodi

Le analisi sono state effettuate secondo il Protocollo progetto SARI dell'ISS.

I campionamenti sono stati eseguiti in corrispondenza dell'ingresso degli impianti di depurazione individuati con campionatori automatici per ottenere il campione medio composito delle 24 ore.

I campioni, conservati in bottiglie in polietilene sono stati consegnati al Servizio laboratorio Multisito ARPAM sede di Pesaro entro 24 ore dal prelievo, per essere tempestivamente preparati all'analisi entro 48 ore dal prelievo.

La prima fase dell'analisi, svolta dal laboratorio di virologia ambientale di ARPAM, consiste nella concentrazione del campione di refluo, a partire da un'aliquota di 45 ml.



Concentrazione: il campione viene poi trattato termicamente a 56°C per l'inattivazione delle particelle virali infettanti eventualmente presenti.

Dopo una prima centrifuga di 30 minuti viene recuperato il surnatante e miscelato con PEG e NaCl.

Una seconda centrifuga permette di eliminare il surnatante per procedere poi al recupero del pellet, contenente gli acidi nucleici concentrati.

Estrazione degli acidi nucleici: il passaggio successivo dell'analisi consiste nell'estrazione degli acidi nucleici con il metodo basato sull'utilizzo della silice magnetica.

Oltre ai campioni da analizzare il metodo prevede anche la preparazione di un campione di controllo negativo e uno di controllo positivo.

I passaggi analitici consistono in una fase di lisi virale ed una fase di recupero degli acidi nucleici mediante l'utilizzo della silice e lavaggi progressivi del campione.

Una volta terminata la procedura di estrazione, i campioni vengono inviati all'IZS di Fermo per procedere alla rilevazione degli acidi nucleici mediante Real Time RT PCR: la metodica prevede la determinazione quantitativa del gene ORF-1ab (nsp14) del virus di SARS-CoV-2, in accordo con le indicazioni della Raccomandazione 2021/472 della Commissione Europea.

Tutti i campioni vengono analizzati in doppio per evitare falsi positivi o falsi negativi e contemporaneamente vengono analizzati controlli adeguati per valutare l'efficienza delle fasi di concentrazione/estrazione e l'assenza di inibizione significativa della reazione. Per ogni seduta analitica si allestiscono diluizioni seriali dei controlli positivi di amplificazione a RNA e DNA e del controllo di processo, Norovirus. Le relative curve standard servono a quantificare e valutare l'efficienza di estrazione.

Sono considerati accettabili i campioni con la percentuale di inibizione inferiore al 75 % e l'efficienza di concentrazione/estrazione $\geq 1\%$.

Sono considerati positivi i campioni con valore di $Cq \leq 40$,

Per ciascun campione positivo viene calcolata la concentrazione di SARS-CoV-2 in copie genomiche / μL di RNA e da questo valore si ricava la concentrazione del virus per litro di refluo.

Risultati ottenuti

L'andamento dei campioni positivi è risultato abbastanza uniforme in tutti i siti campionati.

Tutti i depuratori analizzati hanno permesso di evidenziare dei picchi epidemici particolarmente elevati nei mesi di novembre - dicembre 2022 e gennaio 2023; negli altri mesi analizzati sono stati riscontrati valori mediamente più bassi, probabilmente in relazione alle misure di contenimento adottate per limitare il più possibile la diffusione del virus.

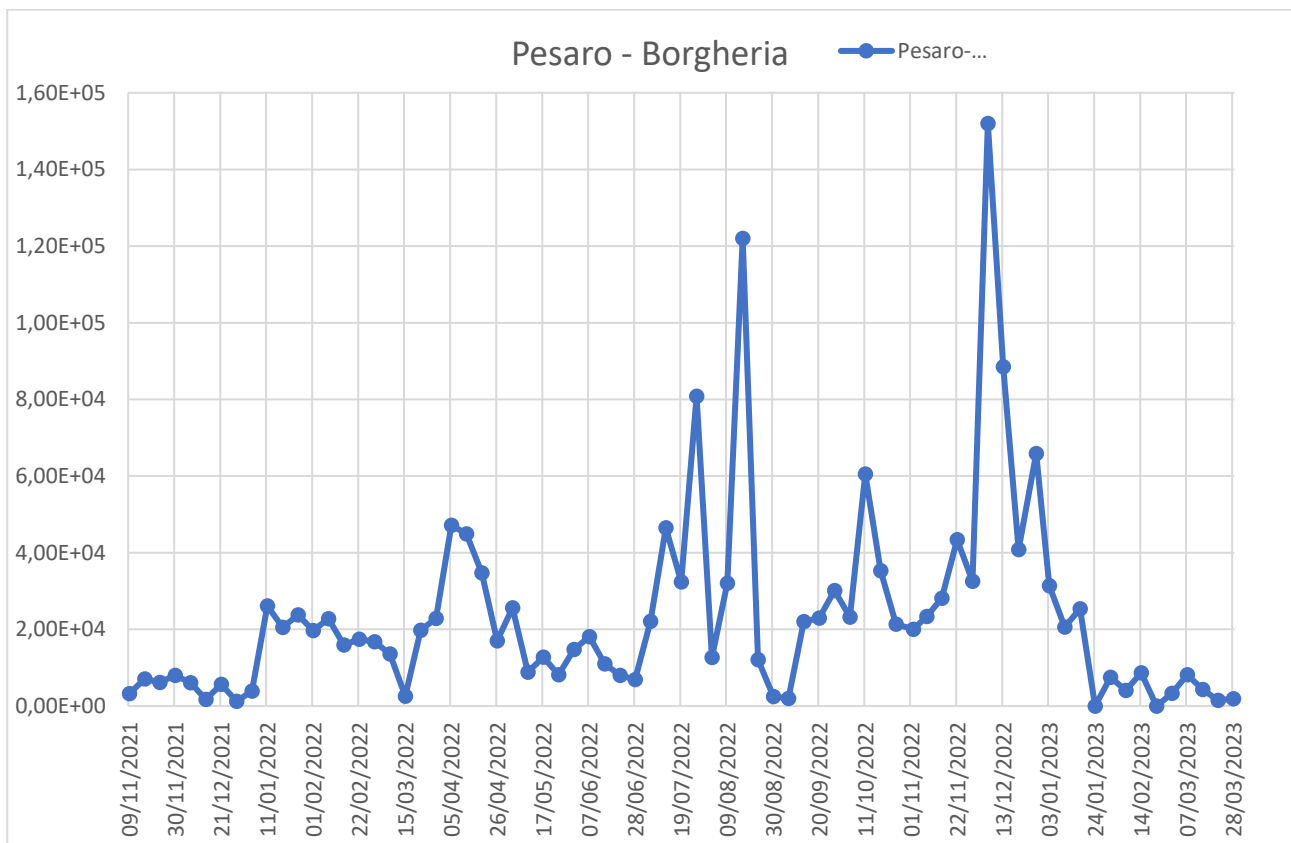


Nelle schede che seguono si riportano i risultati ottenuti, differenziati a seconda del punto di prelievo, tramite grafici che riportano la concentrazione delle copie genomiche del virus per litro di refluo (asse Y) rispetto alla data del prelievo (asse X).

Pesaro - Borgheria

Come evidenziato nel grafico sottoriportato, i valori più elevati di genoma virale si sono evidenziati nel mese di dicembre 2022 e a luglio e agosto 2022.

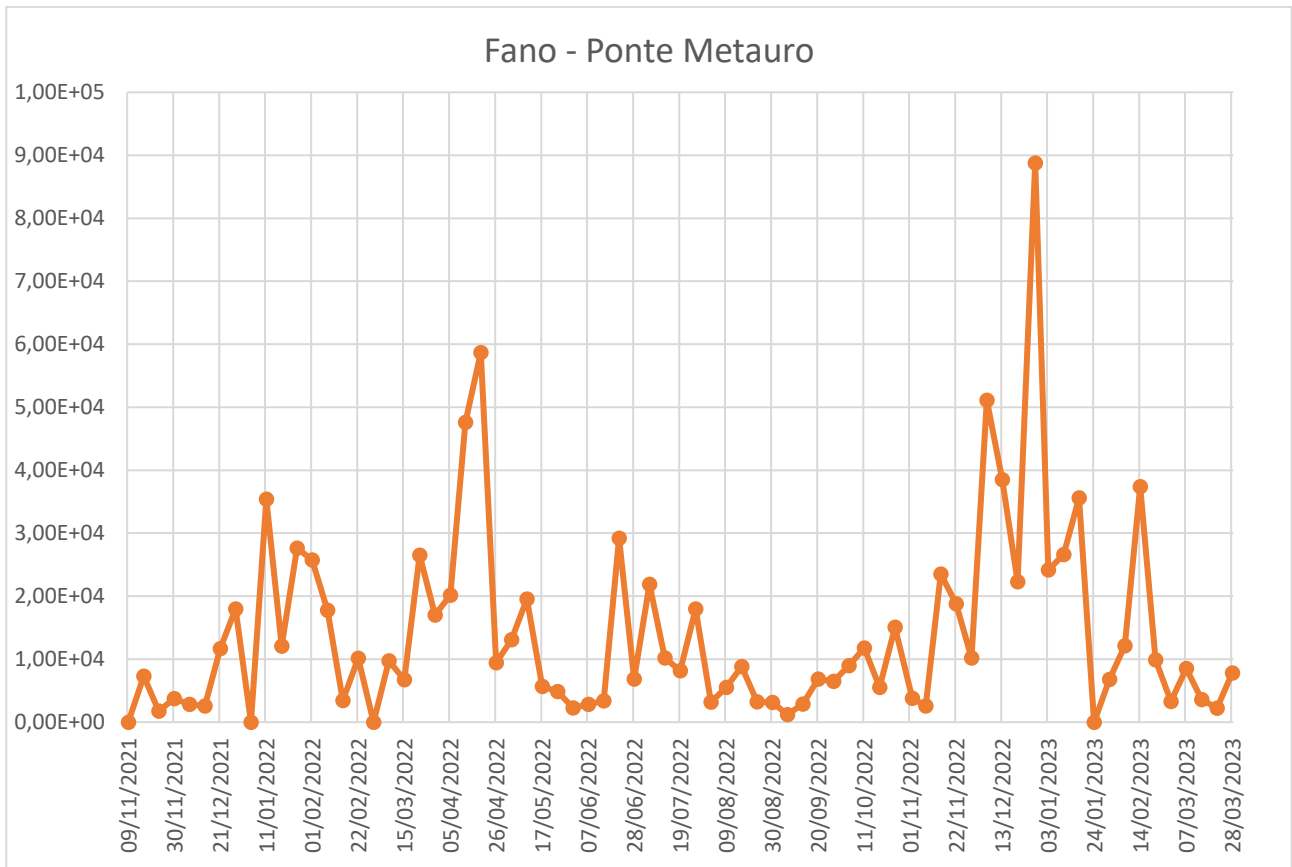
Valori sensibilmente elevati si sono avuti anche ad aprile 2022 ed ottobre 2022.





Fano - Ponte Metauro

Anche nel depuratore Fano-Ponte Metauro, i valori più elevati si sono rilevati tra dicembre 2022 e gennaio 2023. Altri picchi di concentrazione del genoma virale si sono osservati a gennaio 2022, aprile 2022, giugno 2022 e novembre e febbraio 2023.

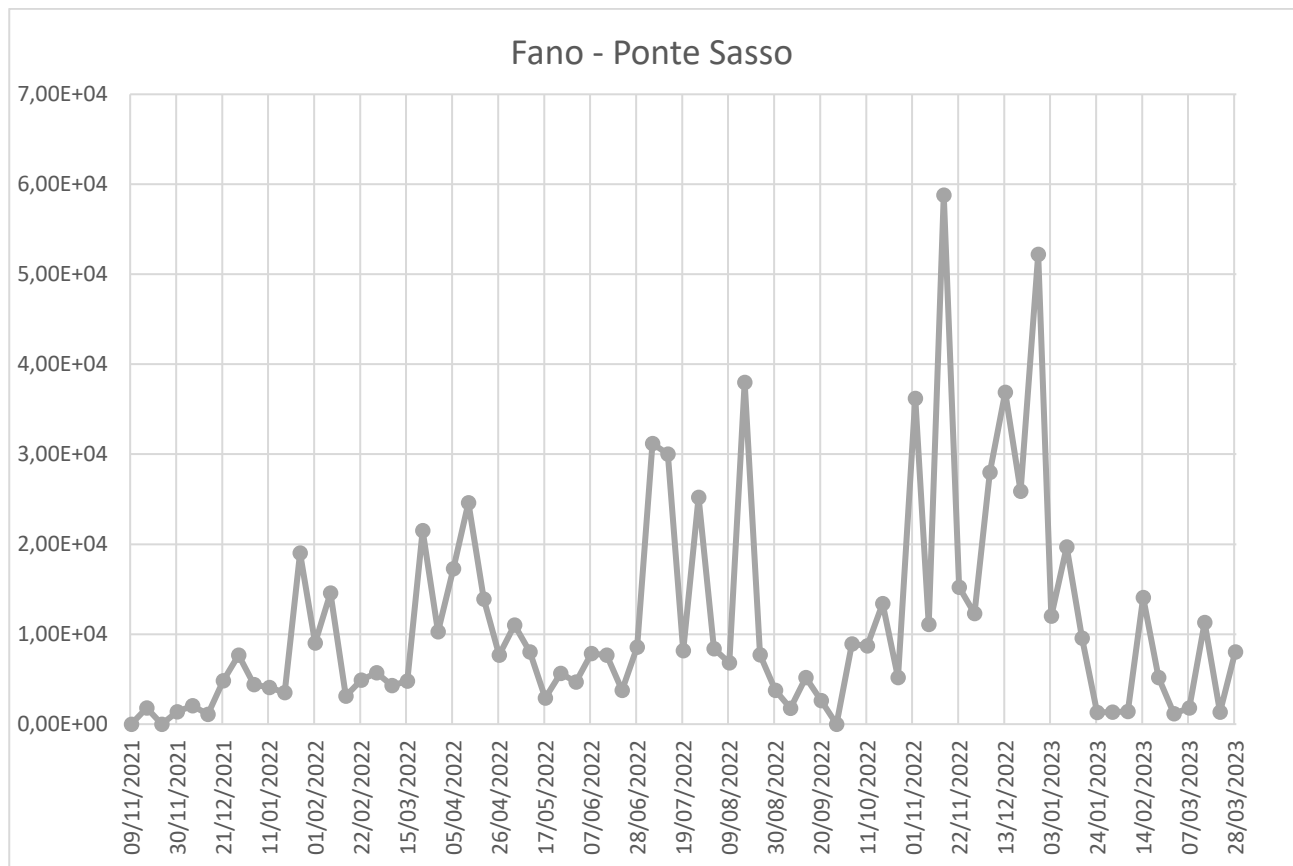




Fano - Ponte Sasso

I valori più elevati di genoma virale nel depuratore di Fano Ponte Sasso sono stati rilevati nei mesi di novembre e dicembre 2022 e gennaio 2023.

L'intero anno 2022 ha comunque evidenziato una considerevole diffusione del virus, che ha evidenziato picchi di concentrazione nei mesi di febbraio, marzo, aprile, giugno, luglio ed agosto.

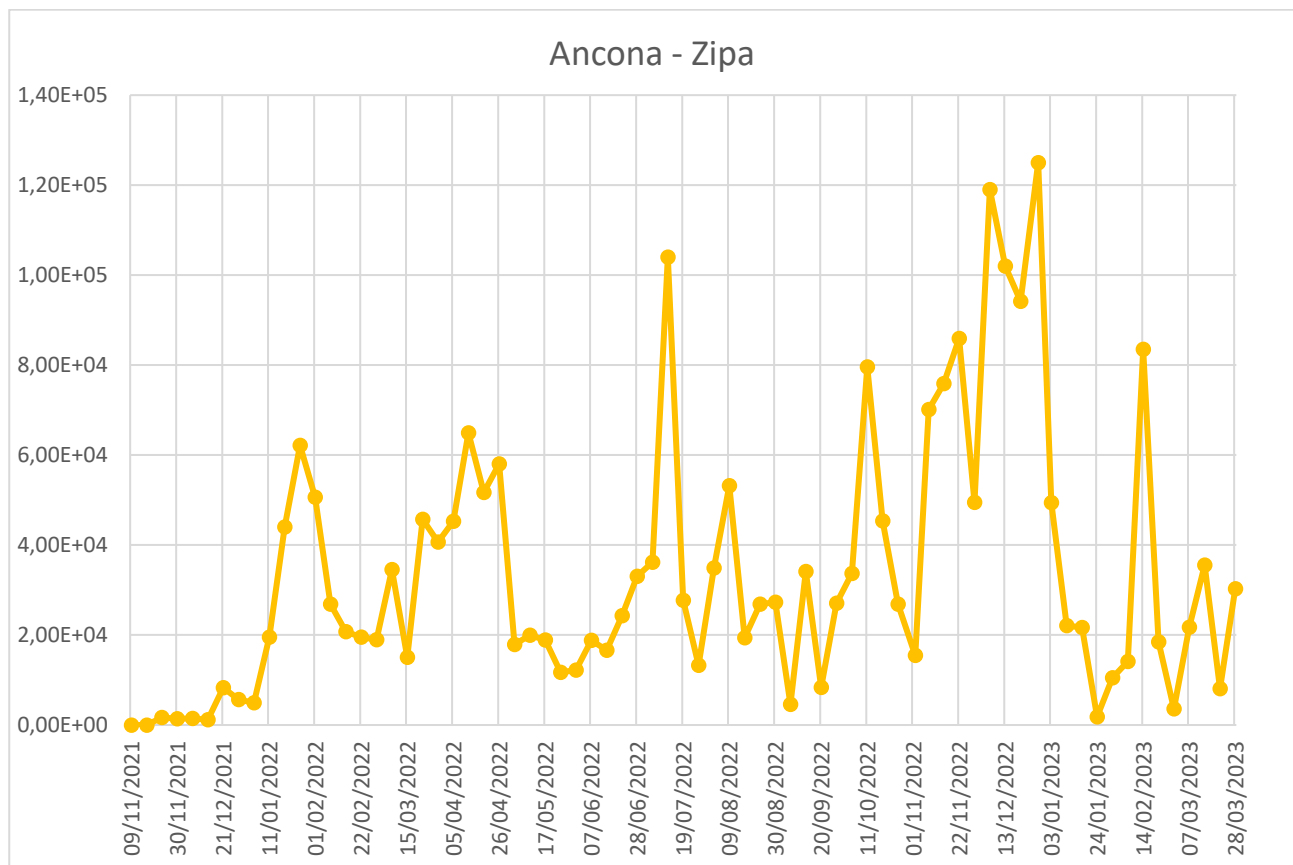




Ancona - Zipa

Il depuratore di Ancona Zipa, il più rappresentativo nelle Marche, ha evidenziato valori sempre significativi, durante tutto il periodo monitorato. I valori più bassi di genoma virale si sono ottenuti nei mesi di novembre e dicembre 2021, quasi sicuramente riconducibili alle misure di contenimento adottate in quel periodo.

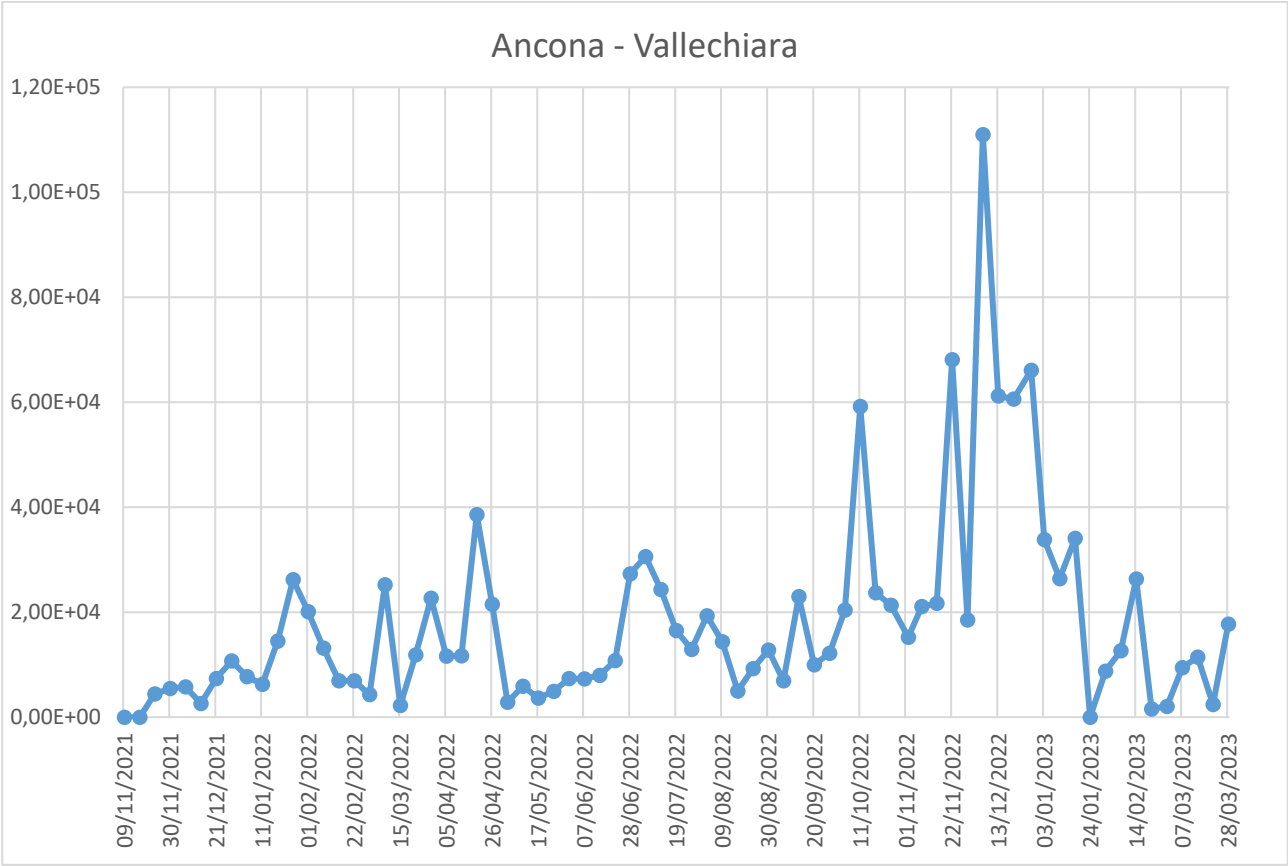
I picchi più elevati si sono riscontrati, come per tutti gli altri depuratori, nei mesi di novembre e dicembre 2022; valori elevati anche a giugno e luglio 2022, ottobre 2022 e febbraio 2023.





Ancona - Vallechiara

L'andamento del depuratore di Ancona Vallechiara è in linea con Zipa, con picchi di concentrazione a novembre- dicembre 2022 e gennaio 2023, valori sensibilmente elevati anche a gennaio, aprile, giugno luglio e ottobre 2022.

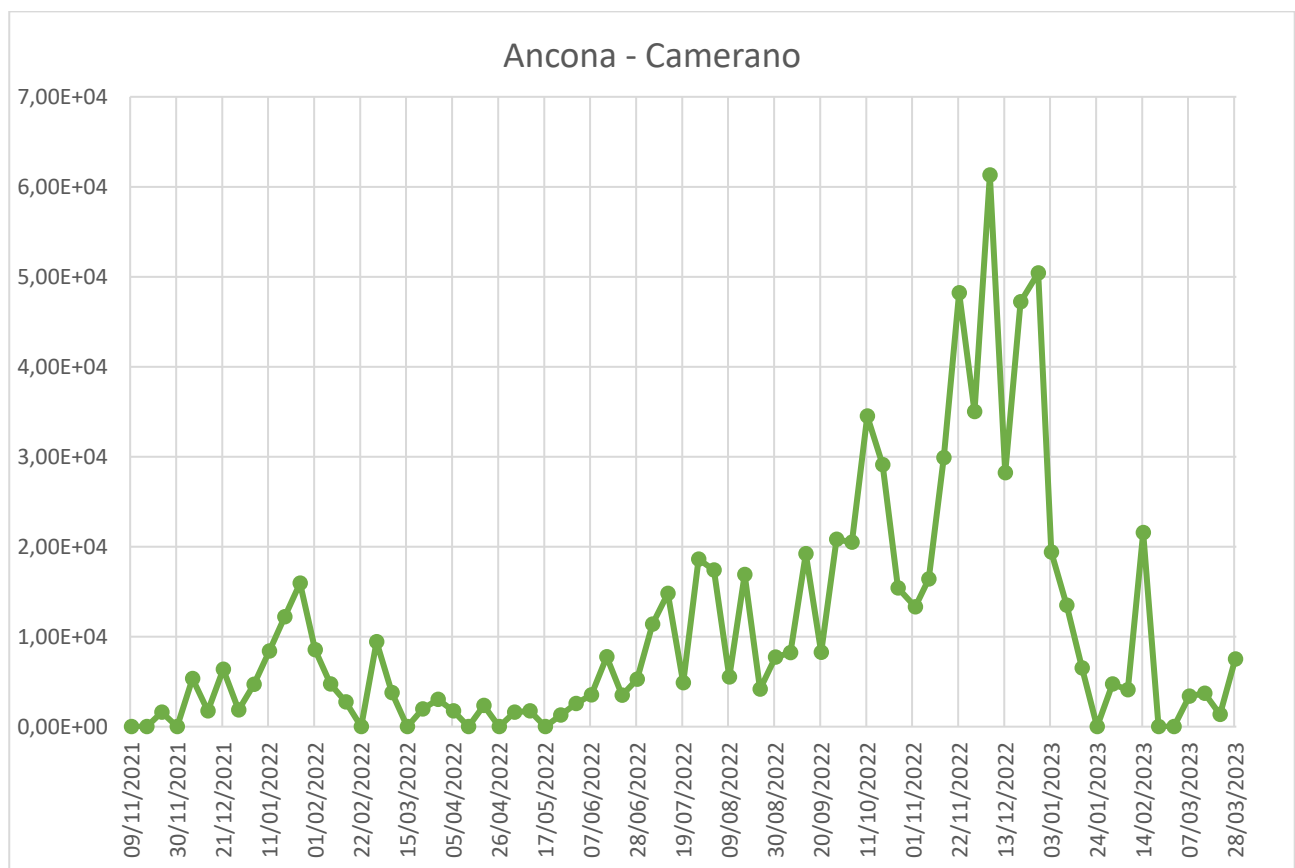




Ancona - Camerano

Anche nel depuratore di Ancona Camerano i valori più elevati sono stati riscontrati, come in tutti gli altri depuratori delle Marche, nei mesi di novembre e dicembre 2022 e gennaio e febbraio 2023.

Gli altri picchi di diffusione virale sono evidenti a gennaio-febbraio 2022, nei mesi estivi 2022 e a ottobre 2022.





Conclusioni

Lo studio condotto fino ad ora in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico di Fermo, ci ha permesso di confermare l'estesa diffusione del virus Sars-Cov-2 in tutti i mesi monitorati.

Il virus è risultato pressoché sempre presente nei reflui urbani delle principali città marchigiane, evidenziando incrementi di concentrazione in determinati periodi.

Le concentrazioni più basse si sono riscontrate nei periodi di minore emergenza sanitaria, a conferma dell'efficacia delle misure di contenimento e della perdita di aggressività del virus.

Sarebbe auspicabile proseguire con questa tipologia di monitoraggio in futuro per controllare e affrontare prontamente l'emergere di eventuali nuove varianti.

PROGETTO SARI

Sorveglianza Ambientale dei Reflui in Italia

RICERCA DEL VIRUS
SARS-COV-2
NEI REFLUI URBANI:
I RISULTATI 2021-2023
NELLA REGIONE MARCHE



ARPA
REGIONE MARCHE
AGENZIA REGIONALE
PER L'AMBIENTE
E IL TERRITORIO



REPORT
LUGLIO 2023