

Ricerca del virus SARS-CoV-2 nei reflui urbani: primi risultati in Valle d'Aosta

Abstract

A giugno 2020 è stato avviato, in Italia, il [progetto SARI, ovvero “Progetto di Sorveglianza Ambientale di SARS-CoV-2 attraverso i Reflui urbani in Italia: indicazioni sull'andamento epidemico e allerta precoce”](#).

Il coordinamento tecnico-scientifico del progetto è a cura dell'[Istituto Superiore di Sanità - ISS](#).

In sintesi lo scopo è quello di **predisporre un sistema per tracciare la presenza del virus sul territorio nazionale, tramite l'analisi dei reflui urbani**, analogamente a quello che già succede attualmente per altri virus.

Anche **ARPA Valle d'Aosta partecipa al progetto SARI**, come struttura di livello ST3R, cioè come struttura di coordinamento di tutte le attività analitiche eseguite nell'ambito del progetto per la Valle d'Aosta.

I siti di campionamento scelti, durante il periodo estivo, sono stati il depuratore di Brissogne, quello di La Salle e quello di Valtournenche. I prelievi sono stati effettuati con una cadenza settimanale nel periodo luglio-agosto 2020 in tutti e tre i siti, mentre a partire da metà settembre ci si è limitati a prelevare solo al depuratore di Brissogne.

Le analisi dei campioni sono iniziate a metà novembre. I risultati ottenuti fin qui sono molto interessanti in quanto **sono state rilevate tracce del genoma virale di SARS-Cov-2 già a partire dai primi campioni**, prelevati presso il depuratore di Valtournenche il 15 luglio 2020. Nella settimana successiva, tracce del virus sono state rilevate anche nel depuratore di La Salle, mentre in quello di Brissogne solo a partire dal 29 luglio 2020.

In oltre 30 dei 40 campioni analizzati è stata rilevata almeno una delle due sequenze target del virus, ricercate tramite RT—Real Time PCR, cosa che indica la presenza, o meglio la presunta presenza, di RNA virale nei campioni.

I protocolli analitici utilizzati sono ancora in fase di validazione, in quanto si tratta di metodiche molto complesse, di conseguenza **i dati ottenuti in questa prima fase della ricerca possono essere considerati solo indicativi della presenza di tracce del virus nei campioni raccolti e quindi della sua circolazione nel territorio regionale**.

I risultati ottenuti sono sicuramente molto interessanti e devono essere una base per indagini e approfondimenti ulteriori.

Articolo completo

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**.

Molti gruppi di ricerca, in diversi paesi, hanno identificato RNA del virus nelle acque reflue (Medema et al., 2020; Wu et al., 2020; Nemudryi et al., 2020; Wurtzer et al., 2020; Ahmed et al., 2020; Randazzo et al., 2020; Chavarria-Mirò et al., 2020; Hata et al., 2020; Kocamemi et al., 2020; Bar-Or et al., 2020; Prado et al., 2020, La Rosa et al., 2020a; La Rosa et al., 2020b), utilizzando metodi analitici diversi, sia per la fase della concentrazione del refluo che per la ricerca del virus con metodi molecolari, nessuno dei quali è stato formalmente validato per il SARS-CoV-2.

In Italia, a giugno 2020, è stato avviato il [progetto SARI, ovvero "Progetto di Sorveglianza Ambientale di SARS-CoV-2 attraverso i Reflui urbani in Italia: indicazioni sull'andamento epidemico e allerta precoce"](#). Il **coordinamento tecnico-scientifico del progetto è a cura dell'[Istituto Superiore di Sanità - ISS](#)**, sotto l'egida del Coordinamento Interregionale della Prevenzione (CIP) Commissione Salute, della Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome. La partecipazione delle strutture territoriali, come ARPA, ASL, IZS, Università, centri di ricerca e gestori del servizio idrico integrato, è su base volontaria.

Le attività sperimentali sono condotte a quattro livelli, denominati ST1, ST2, ST3 o ST3R, a seconda del grado di complessità delle stesse. Il livello ST1 si occupa del campionamento dei reflui, il livello ST2 del campionamento e della fase di concentrazione dei campioni, il livello ST3, oltre alle due fasi precedenti, si occupa della rilevazione del virus nei campioni concentrati, infine **il livello ST3R è la struttura di coordinamento di tutte le attività analitiche eseguite nell'ambito del progetto, in una determinata regione. ARPA Valle d'Aosta partecipa al progetto "SARI" come struttura di livello ST3R.**

Il progetto è articolato in due fasi. La **prima fase, la fase "pilota"**, è iniziata con le prime riunioni del gruppo di lavoro, nel mese di giugno, e **ha lo scopo di validare tutte le procedure**, a partire dal

prelievo dei campioni fino alla comunicazione dei dati. Nella **seconda fase**, prevista in un primo tempo a partire dall'autunno, ma che di fatto non è ancora iniziata, **si passerà ad implementare il piano di sorveglianza nazionale**.

I risultati che si otterranno nel primo periodo saranno **finalizzati alla strutturazione di una rete nazionale di sorveglianza ambientale**, suscettibile di ulteriore sviluppo nella fase autunnale. Un altro obiettivo della fase pilota è quello di validare, a livello nazionale, il protocollo analitico proposto da ISS e i processi di comunicazione dei risultati. Per tale motivo si è richiesto, alle strutture aderenti, di utilizzare i metodi raccomandati da ISS, questo tuttavia non pregiudica ogni altra eventuale azione di ricerca di carattere metodologico, modellistico o per altri fini, che comunque risulta ausiliare rispetto al progetto SARI. I dati di sorveglianza ottenuti nell'implementazione del progetto verranno condivisi con le regioni dall'ISS. Essi dovranno essere considerati come preliminari e non costituire elementi di analisi di rischio di per sé idonei per assumere decisioni gestionali, fino al momento dell'avvio della fase di sorveglianza vera e propria.

Nel mese di luglio 2020 sono iniziate le attività di campionamento: il prelievo dei campioni è stato eseguito in corrispondenza dell'ingresso dell'impianto di depurazione, prima dei trattamenti, mediante campionatori automatici, per ottenere un campione composito delle 24 ore. ISS ha raccomandato a tutti i partecipanti di utilizzare le procedure fornite, privilegiando, durante l'estate, il campionamento di siti turistici.

I siti di campionamento scelti da ARPA VdA, durante il periodo estivo, sono stati il depuratore di Brissogne, quello di La Salle e quello di Valtournenche. I prelievi sono stati effettuati con una cadenza settimanale nel periodo luglio-agosto 2020 in tutti e tre i siti, mentre, a partire da metà settembre, i campionamenti sono stati effettuati solo al depuratore di Brissogne.

I campioni raccolti durante la fase pilota, nel periodo estivo, sono stati conservati in congelatore a -20°C, fino a metà novembre, momento nel quale si è proceduto alla fase di concentrazione del campione, di estrazione degli acidi nucleici e di rilevazione di eventuali tracce di virus.

La fase iniziale di concentrazione è stata eseguita, per tutti i 40 campioni analizzati fino ad ora, a partire da un volume di 250 ml, utilizzando il metodo di riferimento, raccomandato da OMS per la sorveglianza ambientale del poliovirus (WHO, 2003) e modificato da ISS per gli scopi del progetto SARI (La Rosa et al., 2020).

L'estrazione degli acidi nucleici virali è stata eseguita seguendo due protocolli diversi, il primo descritto in La Rosa et al., 2020, che sarà poi utilizzato per implementare le analisi nell'ambito del progetto SARI, il secondo, messo a punto da ARPA Valle d'Aosta per la rilevazione del SARS-CoV-

2 su tamponi umani e adattato al progetto SARI, con lo scopo di utilizzare i reattivi e la strumentazione già presenti nel nostro laboratorio.

Il sistema di rilevazione del RNA virale, utilizzato da ARPA Valle d'Aosta in questa prima fase, non è quello proposto nel protocollo ISS, in quanto l'Agenzia sta ultimando in questi giorni l'acquisizione di tutti i reattivi necessari. Si tratta di un kit commerciale di RT-Real Time PCR, che prevede un primo *step* di retro trascrizione ed un successivo *step* di amplificazione di due specifiche sequenze *target*, una nella regione di *ORF1 ab* e una del gene *N* di SARS-Cov-2.

I protocolli analitici utilizzati sono ancora in fase di validazione, in quanto si tratta di metodiche piuttosto complesse, **di conseguenza i dati ottenuti, in questa prima fase della ricerca, possono essere considerati solo indicativi della presenza di tracce del virus nei campioni raccolti e quindi della sua circolazione nel territorio regionale.**

I risultati ottenuti sono comunque molto interessanti in quanto **sono state rilevate tracce del genoma virale di SARS-Cov-2 già a partire dai primi campioni**, prelevati presso il depuratore di Valtournenche il 15 luglio 2020. Nella settimana successiva tracce del virus sono state rilevate anche nel depuratore di La Salle, mentre in quello di Brissogne solo a partire dal 29 luglio 2020.

In oltre 30 dei 40 campioni analizzati è stata rilevata almeno una delle due sequenze target, cosa che indica la presenza, o meglio la presunta presenza, di RNA virale nei campioni.

I risultati qui riportati, pur dovendo essere approfonditi con ulteriori prove di conferma, **ci fanno supporre che questo sistema sia in grado di evidenziare la circolazione del virus in una determinata area geografica, anche in un momento in cui il numero di casi rilevati nella popolazione è molto basso, se non addirittura nullo**, confermando quanto già riscontrato dagli altri studi citati.

Tuttavia bisogna specificare **che rilevare tracce di RNA virale nei reflui non corrisponde a rilevare, in questa particolare matrice, virus vitale e infettivo**: ciò significa soltanto che, molto presumibilmente, nella popolazione afferente a quel depuratore ci sono delle persone che hanno "incontrato" le particelle virali e le stanno eliminando tramite le loro deiezioni.

In attesa dell'avvio del piano di sorveglianza nazionale, la sperimentazione di ARPA Valle d'Aosta continuerà nei prossimi mesi, anche nell'ambito di un progetto di tesi, in collaborazione con l'Università di Torino. L'Agenzia sarà quindi in grado di pubblicare, con un maggior dettaglio di approfondimento, i risultati di un intero anno di monitoraggio.