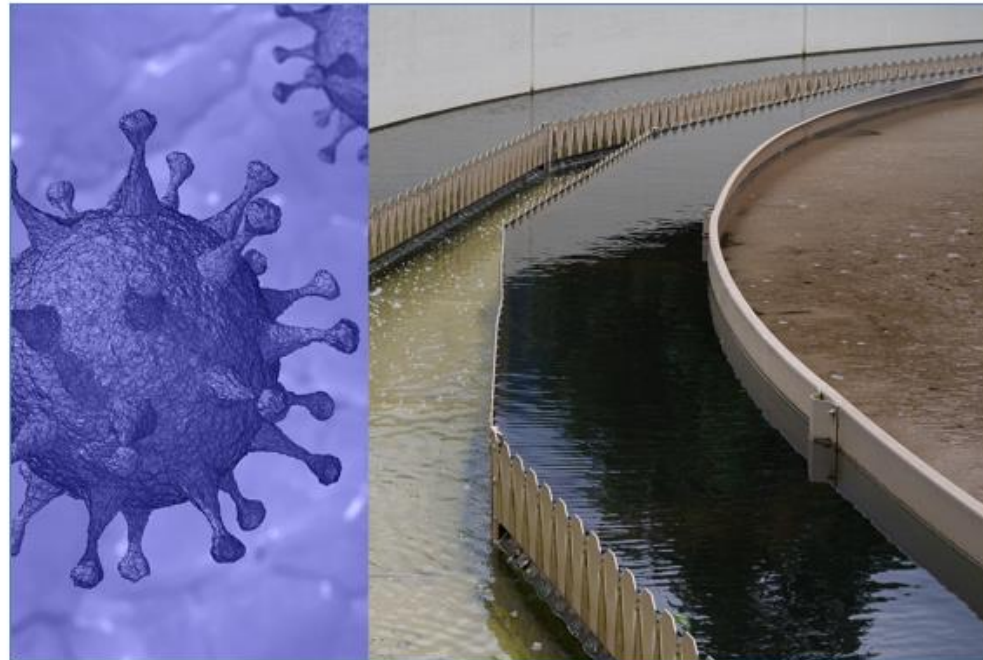


# RICERCA COVID ACQUE REFLUE: l'esperienza del Gestore del SII



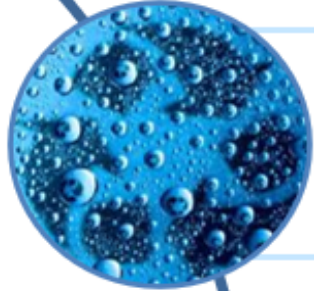
# 6 GIUGNO 2020 PROPOSTA ADESIONE PROGETTO SARI: EARLY WARNING COVID-19 WATER ALLIANCE





# INQUADRAMENTO DEL PROGETTO DI RICERCA

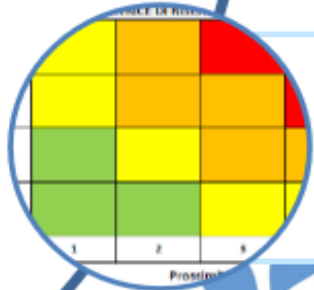
Water Alliance  
Acque di Lombardia



Le attività di ricerca sul virus SARS-Cov 2 svolte nei mesi passati di Marzo e Aprile da innumerevoli enti di ricerca nazionali ed internazionali hanno stabilito che nelle acque reflue il virus è presente in tracce di materiale genetico (frammenti di RNA), quasi sempre non vitali, e che i sistemi di depurazione sono efficaci nell'inattivazione del virus ed assolutamente sicuri.



I frammenti genetici di SARS-Cov 2 scaricati con le deiezioni umane possono essere ricercati nei reflui in ingresso agli impianti di depurazione per costruire un early warning system e specifici database ed individuare sia il numero di eventuali pazienti infetti che la loro posizione sul territorio.



ISS in collaborazione con Ministero della Salute, Ministero dell'Ambiente, UTILITALIA sta organizzando il progetto di ricerca SCORE ed una rete di ricerca a valenza epidemiologica per tutto il territorio nazionale che permetterà di ottenere dati robusti, omogenei a livello nazionale e garantirà la corretta gestione dell'analisi di rischio con tutte le autorità preposte, in primis ATS ed ARPA.



Water Alliance  
Acque di Lombardia

# PROGETTO SARI ISS PRESENTATO ALLE WATER UTILITIES DA ISS ED UTILITALIA

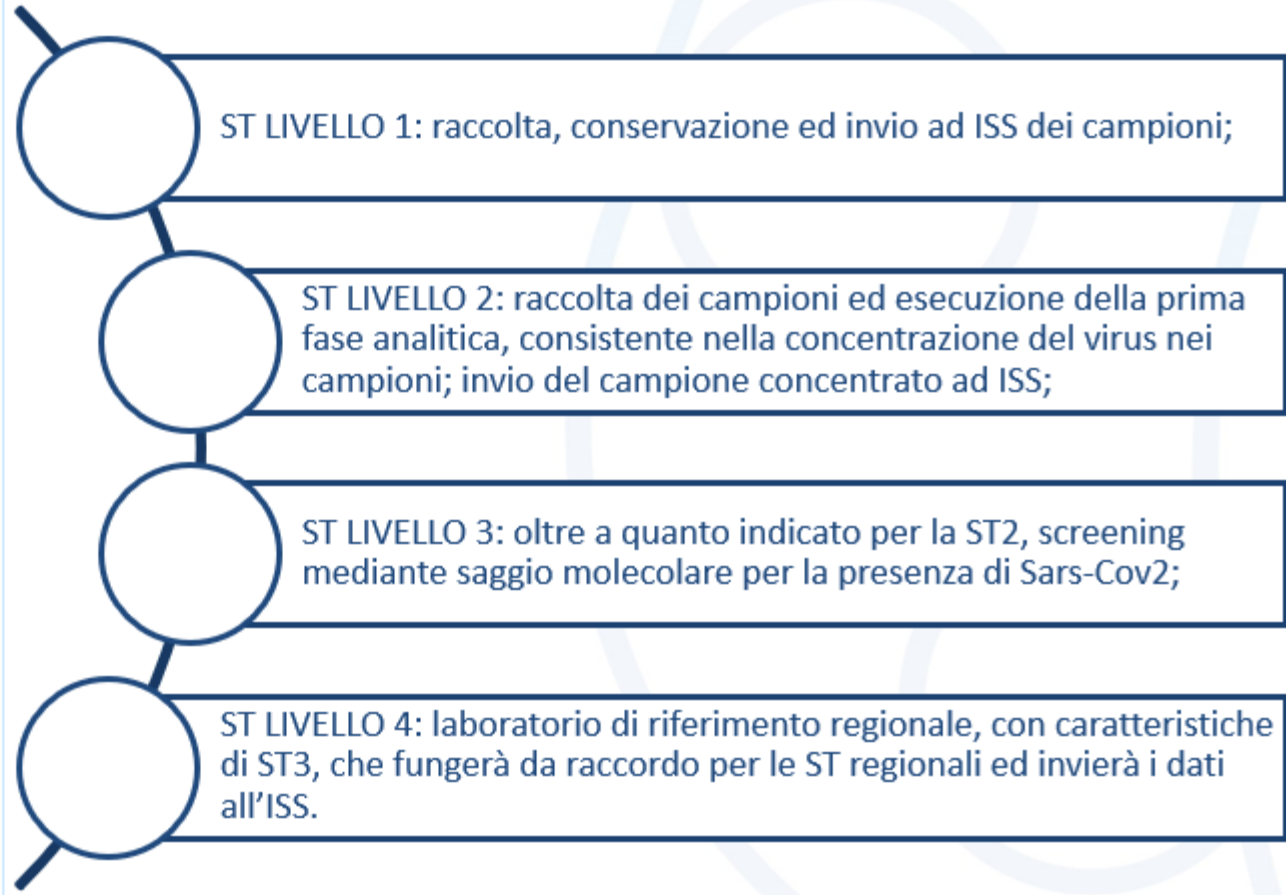


Ricerca epidemiologica Sars-Cov2 nelle acque reflue

WEBINAR, 26 maggio 2020 - ore 10.30

Riservato alle associate del settore acqua

Il 26 Maggio ISS ed UTILITALIA organizzano un webinar in cui ISS illustra il progetto SARI e presenta ai gestori la possibilità di aderire su base volontaria secondo tre possibili livelli di collaborazione:





Water Alliance  
Acque di Lombardia

# PROPOSTA DI ADESIONE AL PROGETTO SARI PER WATER ALLIANCE COME ST LIVELLO 4



## Capacità Water Alliance

I gestori di **Water Alliance** possiedono al proprio interno le **risorse**, le **competenze** e le **attrezzature** per eseguire in autonomia le analisi e saranno guidati nell'ulteriore formazione da ISS come previsto dal progetto SCORE per applicare il metodo definito dall'Istituto



## Sicurezza nostri operatori

Le **attività** di prelievo dei campioni e di **analisi non espongono il personale ad un rischio biologico** specifico **nei confronti del virus** e pertanto le esecuzioni di queste attività non richiederanno implementazioni di procedure diverse da quelle già presenti nelle nostre strutture



## Costi

I costi di ogni analisi si aggirano circa intorno ai 40 euro per campione per l'acquisto dei consumabili necessari; le attività analitiche sono complesse e richiedono di operatori dedicati. Il preventivo del progetto potrà essere effettuato definendo il numero degli impianti su cui eseguire le analisi. **Da ISS è richiesto un campionamento per impianto ogni due settimane**



## Benefici

I **benefici** sono tanti, tra cui in primis **Potenziamento delle capacità dei gestori** nel monitoraggio di rischi biologici, **Potenziamento attività integrate ambiente/salute**, formazione e informazione, **Collaborazione proficua con ISS/ATS/ARPA** per la prevenzione a livello territoriale e la gestione del rischio pandemico



## Tempi

Il progetto sarà svolto in **due campagne, la prima estiva** nei prossimi mesi di Giugno, Luglio, Agosto per un totale di 5 campioni per impianto; **la seconda a partire da Settembre 2020** e fino a Settembre 2021 con un totale di 24 campioni per impianto

er4





Water Alliance  
Acque di Lombardia

# STRUTTURA OPERATIVA PROGETTO PER LE SOCIETA' WA



Ogni società di WA che intende aderire al progetto dovrà occuparsi di :

- ❖ Scegliere gli impianti che ritengono più adatti alla sperimentazione
- ❖ Eseguire i prelievi ed inviarli ai laboratori della rete in grado di proseguire con le attività analitiche
- ❖ Farsi carico dei costi per i campioni che intende analizzare
- ❖ Partecipare al processo di valutazione del risultato ed in caso di risultati positivi estendere il campionamento alla rete fognaria in modo da risalire al cluster di popolazione ammalata

Le società di WA che dispongono di personale esperto in biologia molecolare ed un laboratorio biologico di classe 2 dotato di strumento PCR real time potranno eseguire le analisi complete e restituire il risultato a ciascuna società.

Il Centro di Ricerca di CAP Holding si rende disponibile per l'esecuzione delle analisi per tutte le società che non sono attrezzate oltre che per le attività di georeferenziazione e costruzione del data base informativo necessario per il progetto.



## AVVIO DEL PROGETTO DI SORVEGLIANZA AMBIENTALE DI SARS-COV-2 ATTRAVERSO I REFLUI URBANI IN ITALIA PER INDICAZIONI SULL'ANDAMENTO EPIDEMICO E ALLERTA PRECOCE (ACRONIMO: SARI, IN PRECEDENZA SCORE)

### FASE PILOTA

Kick-off meeting, 30 giugno 2020 – ore 9.00

- 9.00-9.15 **Indirizzi di benvenuto e presentazione delle attività**  
L. Lucentini, L. Bonadonna  
(ISS, Dipartimento Ambiente e Salute)
- 9.15-9.30 **Aggiornamenti della sorveglianza su SARS-COV-2 in reflui (SARI) in Italia, note metodologiche e risultati**  
G. La Rosa, E. Suffredini  
(ISS, Dipartimento Ambiente e Salute e Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria)
- 9.30-9.45 **Progetto di sorveglianza ambientale di SARS-COV-2 attraverso i reflui urbani in Italia per indicazioni sull'andamento epidemico e allerta precoce (acronimo: SARI)**  
G. La Rosa, L. Bonadonna  
(ISS, Dipartimento Ambiente e Salute)
- 9.45-10.00 **Interesse e partecipazione del Coordinamento Interregionale della Prevenzione**  
F. Russo  
(Coordinamento Interregionale della Prevenzione, Commissione Salute, Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome)
- 10.00-10.15 **Ruolo dei gestori idro-potabili e Utilitalia**  
T. Tellini  
(Utilitalia)
- 10.15-10.30 **Piattaforma GIS per l'aggiornamento e l'elaborazione dati della rete di sorveglianza**  
Mauro Grigioni  
(ISS, Centro nazionale tecnologie innovative in sanità pubblica)
- 10.30-12.30 **Tavola rotonda delle strutture interessate a partecipare alla Rete di sorveglianza in fase pilota**  
*Moderatore:* L. Lucentini  
(ISS, Dipartimento Ambiente e Salute)
- 12.30-12.45 **Pianificazione dei lavori e conclusioni**  
L. Lucentini, G. La Rosa, E. Suffredini  
(ISS, Dipartimento Ambiente e Salute e Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria)

1) il progetto è stato avviato con il coordinamento tecnico-scientifico dell'ISS, sotto l'egida del Coordinamento Interregionale della Prevenzione (CIP), Commissione Salute, della Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome e la partecipazione su base volontaria - attualmente senza copertura dei costi – delle strutture territoriali (ARPA, ASL, IZS, Università, centri di ricerca e gestori del servizio idrico integrato) che confermeranno la disponibilità a condurre le attività sperimentali come ST1-ST2-ST3 o ST3R.

2) L'avvio delle attività analitiche (o almeno la raccolta di campioni di reflui da congelare) è avvenuto già da Luglio 2020 utilizzando le procedure analitiche standardizzate diffuse dall'ISS

3) I risultati preliminari del progetto sono serviti per strutturare una prima rete nazionale di sorveglianza ambientale.

4) Già nell'autunno del 2020 è stato strutturato un primo database georeferenziato su scala nazionale

Le strutture aderenti alla rete prevedono 4 diversi livelli, sulla base delle specifiche disponibilità, expertise e risorse:

- ST Livello 1: Campionamento, conservazione del campione di refluo grezzo e invio a ST3-ST3R;
- ST Livello 2: Campionamento, concentrazione del virus dal campione, conservazione e invio del

Referenti per l'istruttoria della pratica:

DANILO CEREDA Tel. 02/6765.2037

EMANUELA AMMONI Tel. 02/6765.3029

Protocollo G1.2020.0031135 del 14/09/2020

Agli Enti interessati a far parte della Rete lombarda per la sorveglianza ambientale di SARS-CoV-2 attraverso i reflui urbani

e, p.c.

Ai Direttori Generali  
delle ATS lombarde

LORO SEDI

**Oggetto : Istituzione della Rete lombarda per la Sorveglianza ambientale di SARS-CoV-2 attraverso i reflui urbani**

La DGR XI-3525-2020 nell'ambito delle azioni per il potenziamento della sorveglianza epidemiologica dell'infezione da SARS-CoV-2 ha stabilito l'istituzione della Rete lombarda per la sorveglianza ambientale di SARS-CoV-2 attraverso i reflui urbani.

La rete in oggetto ha lo scopo di coordinare le attività di raccolta ed analisi dei campioni delle acque reflue e la trasmissione dei dati all'ISS (Istituto Superiore di Sanità) nell'ambito del progetto "SORVEGLIANZA AMBIENTALE DI SARS-CoV-2 ATTRAVERSO I REFLUI URBANI IN ITALIA: INDICAZIONI SULL'ANDAMENTO EPIDEMICO E ALLERTA PRECOCE (SARI)".

La rete includerà strutture territoriali quali centri di ricerca e gestori idro-potabili, con il coordinamento e il controllo di qualità dell'ISS, verso il quale confluiranno i dati raccolti nei territori (con metodi armonizzati diffusi da ISS) che potrà anche svolgere approfondimenti analitici (sequenziamento, quantificazione) e curerà l'aggiornamento e l'elaborazione dati su piattaforma GIS per la condivisione con le Autorità Sanitarie centrali e regionali.

[www.regione.lombardia.it](http://www.regione.lombardia.it)

- campione concentrato a ST3-ST3R;
- ST Livello 3: Attività di ST2 + Estrazione degli acidi nucleici + Screening molecolare + Invio dati a ST3R;
- ST Livello 3R: Struttura di riferimento Regionale. Attività di ST3 + ricezione e analisi campioni da ST1/ST2. Ricezione dati da ST3 e invio dati regionali a ISS tramite apposita piattaforma.







ISTITUTO DI RICERCHE  
FARMACOLOGICHE  
MARIO NEGRI · IRCCS



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO  
SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA ROMAGNA  
"BRUNO UBERTINI"



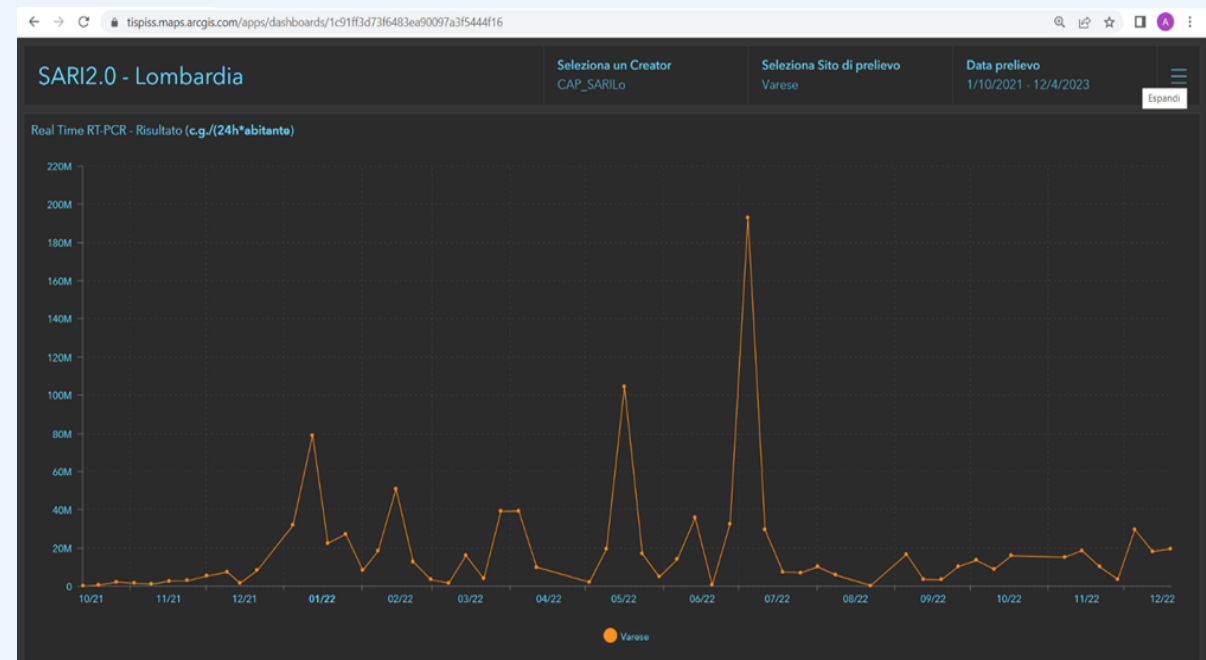
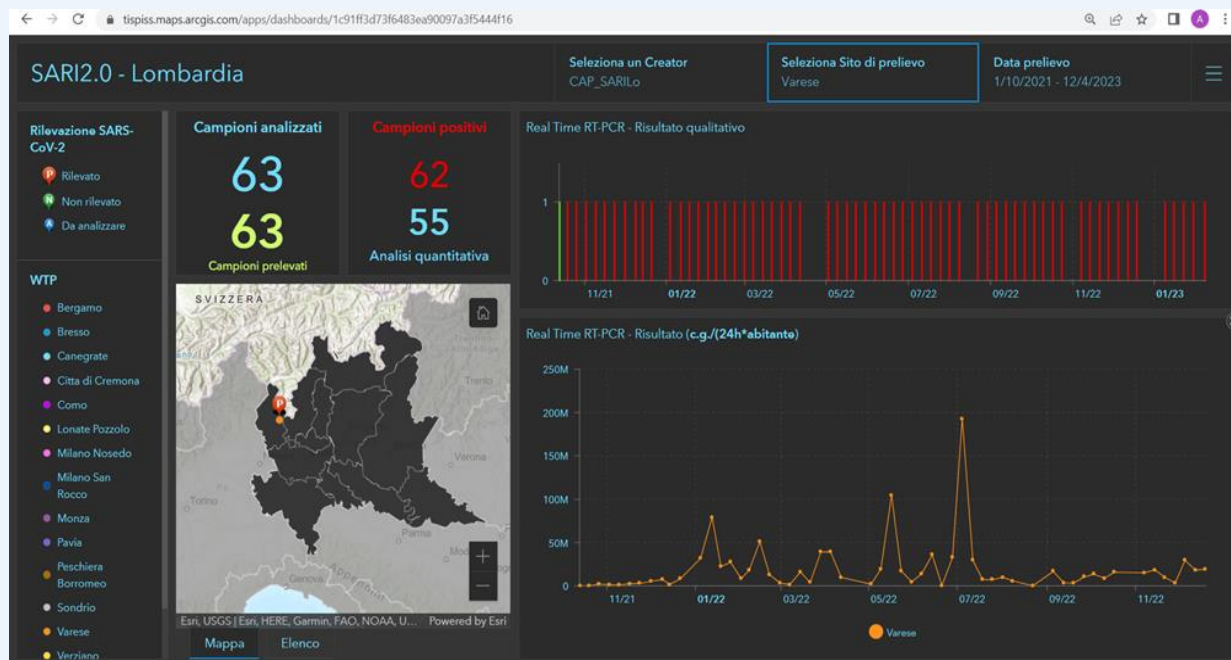
Regione  
Lombardia

water4  
SEMINAR

A partire da settembre 2021, nell'ambito della sorveglianza prevista dal "Progetto SARI", l'ISS ha richiesto l'attivazione del Protocollo analitico "Sorveglianza di SARS-CoV-2 in reflui urbani per la determinazione quantitativa delle coppie genomiche". Tale progetto prevede il campionamento e l'analisi in coerenza con la raccomandazione europea 2021/472 del 17/03/2021 e la registrazione dei risultati nella dashboard dell'ISS entro 48 ore dal campionamento.

Il laboratorio del Centro Ricerche di CAP Holding di Segrate nella prima parte del 2021 ha messo a punto il metodo analitico proposto da ISS e i successivi aggiornamenti, partecipando ai diversi *Proficiency Test* organizzato dall'ISS a partire dal 2021. I campionamenti sono stati effettuati come medi compositi delle 24h, con frequenza settimanale e il trasporto presso il laboratorio di CAP Holding è stato a carico di ATS Milano.

I campioni sono stati concentrati secondo protocollo ISS Rev.3 ed analizzati in Real-Time PCR, per quantificare l'RNA di SARS-Cov-2 presente. I dati ottenuti sono stati inseriti nella dashboard nazionale e nella dashboard regionale



# Protocollo del Progetto SARI (rev.3 ISS):

## 1. Raccolta e trasporto campione:

- Un campione medio composito delle 24h viene raccolto all'ingresso del depuratore;
- Il campione viene trasportato refrigerato al Laboratorio di riferimento che lo analizzerà;
- Il Laboratorio registra il campione con i relativi dati, assegnandogli un ID numerico;

## 2. Concentrazione ed estrazione:

- Dopo la denaturazione del campione (56°C per 30 min), per inattivare eventuali patogeni, un' aliquota dello stesso (45 mL) viene sottoposta ad una fase di concentrazione, attraverso miscelazione con PEG8000 ed NaCl e centrifugazione, ottenendo alla fine un pellet (il surnatante verrà scartato); il campione viene addizionato di uno spike (Norovirus murino), per misurare, alla fine del processo, la percentuale di recupero del genoma di Sars-Cov2;
- Il pellet ottenuto, contenente il virus o resti del suo genoma, viene sottoposto ad un'estrazione degli acidi nucleici (DNA ed RNA) per la successiva quantificazione; l'estrazione viene effettuata mediante un sistema semi-automatico (Egene-Up Biomerieux) che sfrutta l'affinità degli acidi nucleici con una silice magnetica;

### **3. Analisi quantitativa:**

- L'RNA presente nell'estratto viene quantificato mediante una PCR Real-Time che permette di misurare le copie genomiche del target sull' unità di volume di estratto (u.g./uL estratto);
- Il risultato viene interpretato dal tecnico e, mediante un foglio di calcolo prestabilito, viene convertito in copie genomiche sul volume di refluo (u.g./L refluo);
- Analizzando, oltre al Sars-Cov2, anche l'RNA del Norovirus murino (spike aggiunto all'inizio della concentrazione), è possibile calcolare le percentuale di recupero/percentuale persa del genoma del Sars-Cov2 mediante tutto il processo analitico;

### **4. Inserimento risultati in dashboard:**

- I dati ed I risultati del campione vengono inseriti sulla dashboard del Progetto SARI messa a punto dall'ISS;
- In dashboard sono presenti le anagrafiche di ogni depuratore (come il numero di abitanti equivalenti, a.e.) ed automaticamente verranno quindi calcolate le copie genomiche per abitante in 24h;
- In dashboard è possibile monitorare l'andamento dei risultati di un depuratore o di più depuratori nel tempo.







COMMISSIONE  
EUROPEA

Proposta di

**DIRETTIVA DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO**

**concernente il trattamento delle acque reflue urbane (rifusione)**

**Articolo 17 – Sorveglianza delle acque reflue urbane (nuovo)**

Questo nuovo articolo istituisce un nuovo sistema nazionale di sorveglianza delle acque reflue urbane per monitorare i parametri rilevanti per la salute pubblica nelle acque reflue urbane. A tale proposito, gli Stati membri dovranno istituire, entro e non oltre il 1° gennaio 2025, una struttura di coordinamento tra le autorità competenti per la salute pubblica e il trattamento delle acque reflue urbane. Tale struttura stabilirà i parametri da monitorare e con quale frequenza e il metodo da applicare.

Inoltre finché le autorità competenti per la salute pubblica non stabiliranno che la pandemia di SARS-CoV-2 non rappresenta un rischio per la popolazione, le acque reflue urbane saranno monitorate almeno per il 70 % della popolazione nazionale.

Per tutti gli agglomerati con 100 000 a.e. o più, gli Stati membri infine saranno tenuti anche a monitorare regolarmente la resistenza agli antimicrobici allo sbocco degli impianti di trattamento delle acque reflue urbane.

1. Gli Stati membri monitorano la presenza nelle acque reflue urbane dei seguenti parametri rilevanti per la salute pubblica:

- a) virus SARS-CoV-2 e sue varianti;
- b) poliovirus;
- c) virus dell'influenza;
- d) agenti patogeni emergenti;
- e) contaminanti che destano nuove preoccupazioni;

f) qualsiasi altro parametro rilevante per la salute pubblica ritenuto d'interesse ai fini del monitoraggio dalle autorità competenti dello Stato membro.



# Cosa abbiamo imparato in qualità di gestori del SII

- ❖ I nostri laboratori possono essere facilmente attrezzati per gestire analisi molto complesse come le analisi genomiche ed il nostro personale può accrescere di molto le sue competenze grazie alla proficua collaborazione con strutture di rete come quelle che sono state create da ISS e dalla Regione Lombardia
- ❖ Il nostro lavoro può dare un contributo significativo nell'individuazione di parametri rilevanti per la salute pubblica
- ❖ Data la complessità della matrice delle acque reflue, la presenza di solidi sospesi, la variabilità della concentrazione delle sostanze inquinanti a causa di forti variazioni di portata per esempio causata da forti piogge, la sola analisi della concentrazione non è sufficiente per gestire il dato dal punto di vista epidemiologico
- ❖ Alcuni dati di processo sono fondamentali per il trattamento del dato ( ad esempio portata in ingresso al depuratore, SST, abitanti gestiti dal depuratore)
- ❖ La georeferenziazione della fognatura ed i sistemi GIS in generale sono indispensabile per individuare eventuali cluster e focolai di infezione

## Il contributo che possiamo dare come gestori SII

- ❖ Raccolta dei campioni dagli impianti di depurazione e laddove fosse necessario lungo le aste fognarie
- ❖ Analisi dei campioni
- ❖ Analisi dei dati di processo

