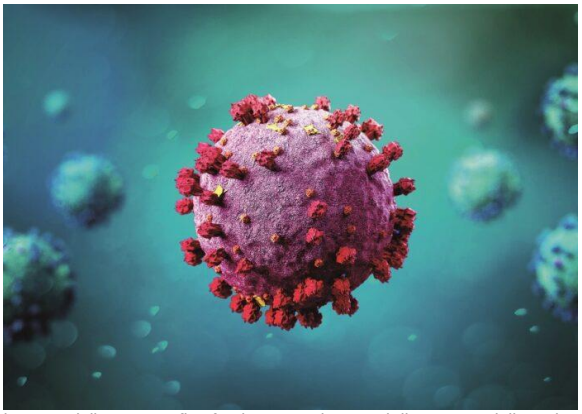
Articolo tradotto e adattato in italiano dalla rivista “The Source 2022”. “The hunt for Omicron in wastewater. April 29, 2022”

(https://www.thesourcemagazine.org/the-hunt-for-omicron-in-wastewater/)

Traduzione e adattamento:

Francesca Cutrupi, Michela Langone

La caccia ad Omicron nelle acque reflue - SARS-CoV-2 e WBE



Il settore delle acque reflue fornisce esperienza nel rilevamento della variante Omicron. © iStock / -1300948439

1. Introduzione

Ad oltre due anni dall'inizio della pandemia da COVID-19, il virus SARS-CoV-2 *continua a sconvolgere vite e creare incertezze, specialmente a causa delle sue varianti.* ***La rivista dell'International Water Association (IWA), "The Source",*** *ha recentemente proposto una sintesi di un webinar del 2021, che illustrava come il settore delle acque reflue abbia risposto a questa situazione in continua evoluzione (IWA, 2021).*

Nell'agosto 2021, *The Source* ha trattato i progressi tecnologici sviluppati per rilevare e monitorare la presenza del virus e delle varianti emergenti all'interno delle acque reflue (*The Source, 2021*). Gli esperti di tutto il mondo continuano ad ampliare le proprie conoscenze sul virus, ottenendo nuove informazioni sulla sua trasmissibilità, sull'efficacia dei vaccini e sulle diverse sintomatologie connesse alla malattia. *The Source* ha inoltre evidenziato come l'intero settore delle acque reflue stia svolgendo un importante ruolo di sorveglianza aiutando a monitorare la circolazione del virus SARS-CoV-2 nelle comunità, tenendo traccia della velocità di trasmissione e della transizione da una variante all'altra.

Data la complessità dell'argomento, il contributo si dettaglia nelle seguenti sottosezioni: l'epidemiologia basata sulle acque reflue, la presenza ed il monitoraggio delle varianti del virus, la sanificazione degli aerei, la presenza nei fanghi di depurazione. Infine si farà un focus sulla situazione Italiana e sugli ultimi aggiornamenti disponibili, di modo da fornire una panoramica completa sull'argomento.

2. L' epidemiologia basata sulle acque reflue

Lo studio dell'epidemiologia basata su informazioni tratte dalle acque reflue (*Wastewater Based Epidemiology*, WBE) è uno strumento utilizzato per supportare il processo decisionale nell'ambito del sistema pubblico-sanitario. Durante il webinar organizzato dall'IWA *(IWA, 2021)*, presieduto dalla professoressa Joan Rose, dell'Università dello stato del Michigan, la Task Force IWA COVID-19 ha convocato microbiologi ed epidemiologi per discutere i progressi compiuti nel monitoraggio del SARS-CoV-2 ed i possibili ulteriori sviluppi. Il webinar ha messo in luce come le acque reflue siano una preziosa fonte di informazioni nelle campagne di gestione della pandemia. I campioni di acque reflue consentono, infatti, di

rilevare frammenti di codice genetico provenienti da migliaia di persone, fornendo l'opportunità di studiare e tenere traccia delle combinazioni di mutazioni che definiscono ogni variante.

3. Varianti –come scoprire le diverse mutazioni

L'obiettivo principale nella sorveglianza del SARS-CoV-2 è l'identificazione delle varianti presenti, e la loro classificazione in emergenti, dominanti o in declino. La principale difficoltà si riscontra nella natura delle varianti e nella loro definizione da parte della completa combinazione delle mutazioni che le caratterizzano. Ciò comporta che l'individuazione di una sola o poche mutazioni non prova automaticamente la presenza della variante di interesse.

Il prof. Gertjan Medema, principale microbiologo del rinomato centro di ricerca KWR- Water Research Institute di Utrecht in Olanda, è un sostenitore della tecnica "Digital Droplet PCR" (ddPCR) per un monitoraggio veloce del SARS-CoV-2 nei Paesi Bassi. Durante il webinar, egli ha spiegato come la variante Alpha, emersa nel Regno Unito nel dicembre del 2020, contenesse le mutazioni identificate con le sigle N501Y, E484K e K417. Tuttavia, la mutazione N501Y non era presente nella variante Delta, e infatti tracce del gene N501Y hanno iniziato a scomparire dai campioni di acque reflue man mano che la variante Delta assumeva caratteri di dominanza.

Mentre il profilo di mutazione di Omicron (variante identificata con il codice B.1.1.529) con 50 mutazioni prova che Omicron è la variante più mutata finora, è interessante notare che la mutazione N501Y è stata nuovamente riscontrata. Questo gene "mutato" permette quindi di discernere più facilmente la presenza della variante Omicron dalla variante Delta nelle acque reflue.

4. Monitorare le varianti nelle acque reflue

I ricercatori di tutto il mondo stanno sviluppando strumenti e tecniche per definire chiaramente quando una variante è presente in un campione. Un approccio (tra gli altri) è quello di sviluppare saggi specifici di RT-PCR identificativi delle sequenze mutate delle varianti. Una volta che il dato clinico conferma il codice genetico di una variante, tramite l'approccio del sequenziamento, vengono identificate le mutazioni target, e viene sviluppato e testato un saggio biologico specifico. Utilizzare questo metodo per l'identificazione delle varianti offre un alto livello di accuratezza ed è relativamente economico, con un tempo di produzione breve (in confronto ai saggi clinici). Tuttavia, questo approccio dipende dallo studio dei casi clinici, ed inoltre va considerato che la catena di produzione per i kit diagnostici è complessa e caratterizzata da ritardi nelle consegne.

Un metodo alternativo è il sequenziamento utilizzando la tecnica "Digital Droplet PCR". In questo caso l'insieme dei geni di SARS-CoV-2 individuato nei reflui viene esaminato alla ricerca di inserzione e delezione nei geni mutanti. Ciò indica la possibile presenza di una nuova variante in confronto a quella dominante esistente. Questo approccio può essere utilizzato in combinazione con il precedente, ad esempio durante l'attesa della consegna degli specifici saggi di PCR sviluppati per la variante da ricercare.

Con la comparsa della variante Alpha alla fine del 2020, sono iniziati immediatamente progetti per monitorare tali mutazioni ad Amsterdam e Utrecht. Il ruolo della sorveglianza delle acque reflue è stato riconosciuto dalla Commissione Europea come uno strumento in grado di fornire risultati rapidi e con una

risoluzione maggiore rispetto ai dati clinici. Questo approccio è stato raccomandato agli Stati membri dell'UE, sottolineando l'importanza di impegnarsi nella sorveglianza delle acque reflue.

L'edizione di agosto 2021 di *The Source* ha evidenziato l'efficacia dei piani di sorveglianza nazionali dei diversi Stati (*The Source, 2021*). Un approccio interessante è stato applicato in Danimarca, dove unità mobili sono state inviate in aree che mostravano una crescita esponenziale dei tassi di infezione, per tenere traccia della velocità di trasmissione del virus. Tuttavia, secondo quanto dichiarato da Jesper Gamst, di Eurofins Environment Testing (fornitore di test diagnostici), la velocità di trasmissione della variante Omicron, senza precedenti, ha presto escluso questo approccio e le autorità hanno dovuto riconoscere la necessità di costruire laboratori centralizzati e con catene di approvvigionamento più brevi.

5. Sanificazione degli aerei: la chiave per i viaggi internazionali?

In un mondo globalizzato come quello attuale, assume particolare importanza mantenere un adeguato grado di sanificazione sui mezzi di trasporto a lunga distanza, come ad esempio gli aerei. Un progetto rivolto a quattro dei principali aeroporti internazionali dell'Australia sta mostrando dei progressi interessanti relativi all'uso delle acque reflue per il monitoraggio in tempo reale del SARS-CoV-2. Warish Ahmed, ricercatore senior nel programma di mitigazione dei contaminanti ambientali e biotecnologie presso il CSIRO in Australia, sta conducendo un progetto pionieristico per scoprire se l'analisi dei campioni di acque di scarico degli aerei può ridurre i tempi di quarantena dei passeggeri ed aumentare la fiducia verso i voli internazionali. I campioni del progetto pilota provengono dai servizi igienici dei singoli sistemi sanitari degli aerei ed aggiungono un ulteriore tassello all'analisi dei dati di monitoraggio del virus (Ahmed et al., 2021).

Nell'ambito di questo progetto, sono stati campionati 37 voli di rientro in Australia dall'India, dal Regno Unito e dalla Francia, con 6570 passeggeri risultati negativi prima dell'imbarco. Durante i 14 giorni di quarantena, tutti i passeggeri sono stati sottoposti più volte a screening clinico mediante PCR. I dati clinici sono stati quindi confrontati con i risultati dei sistemi di sanificazione dell'aereo.

Più di 100 passeggeri sono risultati positivi durante la quarantena, tutti provenienti da voli dove il SARS-CoV-2 era stato riscontrato anche nelle acque reflue. La gran parte dei voli in cui non era stato riscontrato il virus nei reflui non ha, invece, segnalato casi di positività. Solo un numero molto ridotto di passeggeri è risultato positivo anche nei voli in cui il SARS-CoV-2 non è stato rilevato nelle acque reflue dell'aeromobile.

Fino ad aprile 2022, sono stati campionati e analizzati altri 240 aerei in arrivo in Australia. Tuttavia, il progetto ha portato alla luce alcune limitazioni, inclusa la presenza di materiale a base salivare nel sistema sanitario (proveniente, ad esempio, dal lavaggio dei denti) ed il rischio per la salute e la sicurezza del personale esposto a SARS-CoV-2 o altri virus che potrebbero essere presenti in questa tipologia di campionamento decentralizzato. Per migliorare le performance di questo progetto, il gruppo di ricerca sta provando a realizzare analisi rapide *in-situ* piuttosto che trasferire i campioni in laboratori centralizzati, che possono richiedere fino a cinque giorni per l'esecuzione dell'analisi. Mentre il gruppo lavora per eliminare questi rischi, i risultati ottenuti dimostrano il valore dell'utilizzo della sorveglianza delle acque reflue insieme a quella dei dati clinici per fornire molteplici linee di evidenza della presenza del virus.

6. Rilevamento sui fanghi della depurazione

È importante ricordare, quando si valuta il successo del progetto pilota di Ahmed relativo alle acque reflue degli aeromobili, che le acque reflue degli aerei sono molto più concentrate delle normali acque reflue, a causa della mancanza di diluizione che si osserva negli scarichi in fognatura. Tuttavia, oltre alle acque reflue, anche i fanghi di depurazione, come principale sottoprodotto della filiera di depurazione, rappresentano una matrice su cui indagare la possibile presenza di SARS-CoV-2.

Uno studio condotto da Alexandra Boehm, del Woods Institute for the Environment presso la Stanford University, si concentra, perciò, sulla possibilità di rilevare il SARS-CoV-2 (e le varianti definite preoccupanti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità) su diverse matrici connesse ai reflui, come ad esempio i fanghi, piuttosto che sulle acque reflue diluite in ingresso agli impianti. Lo studio ha monitorato 12 impianti di depurazione in California, dai quali sono stati raccolti dati giornalieri sui fanghi raccolti da sedimentatori primari e reflui in ingresso. Utilizzando l'approccio mirato dei saggi RT-PCR, i ricercatori hanno scoperto che l'RNA di SARS-CoV-2 è più concentrato di diversi ordini di grandezza nei fanghi rispetto al refluo. I confronti con i dati clinici locali mostrano forti correlazioni nelle concentrazioni di singole mutazioni, caratteristiche di specifiche varianti, con le varianti diffuse tra la popolazione locale. Il gruppo che collabora al progetto è fiducioso al tal punto da considerare che il metodo sia capace di rilevare varianti di SARS-CoV-2 nelle fognature in un rapporto di 1 a 100.000 casi nella popolazione.

7. Un virus che continua a stupire

La pandemia da SARS-CoV-2 ha mostrato una fortissima capacità del virus di modificarsi e mutare per aumentare la sua capacità di diffusione, e garantirne quindi la sopravvivenza a lungo termine. Il progetto californiano, di cui al precedente paragrafo, ha utilizzato saggi specifici per identificare le varianti nei fanghi. Attraverso il monitoraggio giornaliero, il team ha avuto modo di identificare la transizione di una variante all'altra attraverso i dati derivanti dalle fognature. Nel caso di altre tipologie di virus, le varianti tendono a essere completamente sostituite durante l'evoluzione del virus, e questo porterebbe a pensare che anche le varianti del SARS-CoV-2 possano scomparire. SARS-CoV-2, invece, continua a sorprendere, dato che i risultati provenienti dalla California, Danimarca e Paesi Bassi mostrano che le varianti precedenti in realtà persistono nell'ambiente, piuttosto che scomparire completamente (anche se in proporzioni davvero piccole, circa lo 0,1%).

Questi risultati confermano l'evidenza del valore e del ruolo della sorveglianza delle acque reflue (in combinazione con il sequenziamento dei dati clinici), per identificare e tenere traccia delle varianti SARS-CoV-2, con il proposito di supportate il processo decisionale locale, nazionale e internazionale. Per continuare ad ampliare le conoscenze attuali, l'intero settore delle acque reflue è chiamato a fornire dati e informazioni riguardo a metodi e protocollo alla rete mondiale attraverso il Wastewater SARS Public Health Environmental REsponse (W-SPHERE), sphere.waterpathogens.org.

8. La situazione in Italia

Anche in Italia si è lavorato intensamente per il monitoraggio del virus nelle acque reflue, in linea con quanto svolto a livello europeo. Più in dettaglio, a luglio 2020 ha preso il via il progetto SARI, acronimo di **"Sorveglianza Ambientale di Sars-CoV-2 attraverso i Reflui urbani in Italia: indicazioni sull'andamento epidemico e allerta precoce.** Il progetto, promosso e coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), e condiviso dalla Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome, coinvolge SNPA

(Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente), ASL (Azienda Sanitaria Locale), IZS (Istituto Zooprofilattico Sperimentale), Università, centri di ricerca e attraverso UTILITALIA, oltre 50 gestori del SII. Tale progetto aderisce alla più vasta iniziativa paneuropea," The EU Sewage Sentinel System for SARS-CoV-2 (EU4S)", promosso e coordinato dal JRC della Commissione europea.

Dopo una prima fase, durata alcuni mesi, condotta su base volontaria e autofinanziata dai partecipanti al progetto, focalizzata su una rete pilota di siti prioritari come le località turistiche (circa 100 punti di campionamento), il progetto SARI ha visto la realizzazione di una rete di sorveglianza estesa a livello nazionale. A tale iniziativa partecipano oltre 100 laboratori sul territorio nazionale, che operano con lo stesso protocollo per la concentrazione, l'estrazione e l'amplificazione del materiale virale. I dati sono raccolti e inseriti in un sistema GIS, in cui sono riportati i punti di campionamento ed i risultati delle analisi, che vengono messi a confronto con i dati epidemiologici.

Successivamente, a seguito della raccomandazione europea C/2021/472 del 17 marzo 2021, sono state progettate ed implementate **flash survey nazionali (indagini lampo),** ovvero delle iniziative all'interno del sistema di sorveglianza, realizzate sottoponendo a sequenziamento un numero di campioni di acque reflue statisticamente significativo raccolti in una settimana (di solito la prima settimana di ogni mese), con l'obiettivo di dare informazioni sulla **diversità genetica del SARS-CoV-2 (varianti).**

Dall'elaborazione dei risultati è possibile evincere una forte correlazione tra il monitoraggio del virus nelle acque reflue ed i dati epidemiologici. Tuttavia, in alcuni casi, sequenziando i campioni di acque reflue si sono osservate varianti in circolazione non riportate dal sistema di sorveglianza nazionale condotto sui tamponi naso-faringei. Inoltre, grazie a tale progetto e ad alcune indagini retrospettive su campioni di archivio, è stato possibile scoprire che la circolazione del SARS-CoV-2 in alcune aree del Nord Italia era già attiva in periodi antecedenti l'inizio ufficiale della pandemia.

Nel quinto report dell'ISS sul monitoraggio nazionale del virus nelle acque reflue, relativo al periodo 27 giugno - 10 luglio 2022, emerge chiaramente che l'incremento delle concentrazioni virali nelle acque reflue è in linea con l'aumento dei contagi tra la popolazione ed è legato alla diffusione delle sotto-varianti di Omicron BA.4 e BA.5 (ISS, luglio 2022).
Anche i risultati sulla presenza delle varianti, ottenuti tramite flash survey, sono completamente in linea con i dati pubblicati dalla sorveglianza clinica sulla piattaforma italiana I-Co-Gen ottenuti tramite i tamponi naso-faringei. Ad oggi sono state effettuate 10 flash survey, i cui risultati sono sintetizzati in Tabella 1. I risultati della decima flash survey su SARS-CoV-2 in acque reflue, effettuata su 167 campioni prelevati dalle acque reflue fra il 6 e il 10 giugno 2022 in 20 Regioni/Province Autonome confermavano la presenza esclusiva, nel territorio italiano, della variante Omicron, sottovarianti BA.2 e BA.4/BA.5, con prevalenza delle sottovarianti BA.4/BA.5 (ISS, giugno 2022). L'ultima flash survey (undicesima) relativa al periodo 4 – 8 luglio 2022, effettuata su 165 campioni, continua a confermare la presenza esclusiva della variante Omicron, con sottovariante BA.5 preponderante e una residua circolazione di BA.2 (ISS, agosto 2022).

Tabella 1. Sintesi dati Flash survay (Fonte ISS)

Periodo flash survey	Campioni acque reflue	Campioni positivi al SARS-CoV-2	Campioni a sequenziamento	Variante predominante	Variante minore
4-12 luglio 2021 (pilot)	35	13 (40.6%)	5/13	**Delta** (4) e Alpha (1)	Beta
4-8 ottobre 2021	92	55 (60%)	23/55	**Delta** (19) (e presenza di mutazioni Delta Plus)	no

1-5 novembre 2021	103	-	32	**Delta** (e presenza di mutazioni Delta Plus)	no
30 nov – 3 dic 2021	123	86 (69.9%)	66	**Delta** (e presenza di mutazioni Delta Plus	no
19-25 dicembre 2021	100	64 (64%)	-	**Omicron**	Delta
10-14 gennaio 2022	154	142 (92%)	-	**Omicron** (BA.1)	**Omicron** (BA.2, Delta)
7-11 marzo 2022	153	143 (93%)	56	**Omicron** (BA.2, BA.1.1)	**Omicron** (BA.1)
4-8 aprile 2022	161	148 (92%)	70	**Omicron** (BA.2)	**Omicron** (BA.1.1)
2-6 maggio 2022	158	149 (94%)	55	**Omicron** (BA.2)	no
6-10 giugno 2022	167	146 (87%)	38	**Omicron** (BA.4/BA.5)	**Omicron** (BA.2)
4-8 luglio 2022	165	161 (97.5%)	60	**Omicron** (BA.5)	**Omicron** (BA.2/ BA.4)

9. Gli ultimi aggiornamenti e conclusioni

Al momento della redazione di questo articolo, nell'agosto 2022, l'incidenza dei contagi a livello italiano risulta in calo mentre a livello mondiale, secondo i dati presentati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, il numero di nuovi casi resta stabile rispetto alle settimane precedenti (6,9 milioni di nuovi casi riportati) (OMS, agosto 2022). La variante Omicron è diffusa globalmente, con il 99% di presenza nei campioni sequenziati, e la sotto variante BA.5 è dominante. Gli altri *sub lineages* (BA.4, BA.2.12.1 e BA.2) invece calano diffusamente. Resta di profondo interesse la sorveglianza delle nuove mutazioni, sia nella proteina *spike* che in altre, delle varianti discendenti dalla sotto variante BA.5, che proprio a causa della notevole diffusione presenta un alto tasso di diversità.

Mentre la situazione emergenziale legata al Covid-19 sembra divenire con il tempo più gestibile, nuove minacce si presentano ad oggi (come il virus del vaiolo delle scimmie) e, si presume, anche nei prossimi anni. La rete mondiale di monitoraggio delle acque reflue e l'approccio epidemiologico legato ad esse, dunque, potranno essere nel prossimo futuro un valido strumento per la sorveglianza e la pronta risposta a simili crisi.

10. Bibliografia

Ahmed W., Bivins A., Simpson SL., Bertsch PM., Ehret J., Hosegood I., Metcalfe SS., Smith WJM., Thomas KV., Tynan J., Mueller JF., 2021. Environment International, Wastewater surveillance demonstrates high predictive value for COVID-19 infection on repatriation flights to Australia, , doi.org/ 10.1016/j.envint.2021.106938

C/ 2021/472. Commission Recommendation (EU) 2021/472 of 17 March 2021 on a common approach to establish a systematic surveillance of SARS-CoV-2 and its variants in wastewaters in the EU

ISS, giugno 2022. Flash survey on SARS-CoV-2 variants in urban wastewater in Italy 10th Report (Study period: 6 – 10 June 2022

ISS, luglio 2022. Surveillance of SARS-CoV-2 in urban wastewater in Italy 5th Report Update to week 27 of 2022 (10.07.2022)

IWA, 2021. WEBINAR "Early detection of Omicron variant with wastewater surveillance" iwa-network.org/learn/early-detection-of-omicron-variant-with-wastewater-surveillance

OMS, agosto 2022. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. Edition 104 published 10 August 2022

The Source 2022. Detecting COVID-19 variants in wastewater. August 23, 2021 (https://www.thesourcemagazine.org/detecting-covid-19-variants-in-wastewater/)

Maggiori informazioni

Per ulteriori dettagli, si rimanda al webinar IWA all'indirizzo: iwa-network.org/learn/early-detection-of-omicron-variant-with-wastewater-surveillance