

REFLUI E MONITORAGGIO EPIDEMIOLOGICO

LA WASTERWATER-BASED EPIDEMIOLOGY ANALIZZA LA PRESENZA DI PATOGENI, FARMACI E SOSTANZE CHIMICHE PROVENIENTI DAI RESIDUI METABOLICI UMANI NELLE ACQUE REFLUE URBANE. L'EVENTUALE RILEVAZIONE DI PATOGENI PUÒ CONTRIBUIRE A RINTRACCIARE LA DIFFUSIONE DELLA PANDEMIA E A MAPPARE LA VARIABILITÀ GENETICA DEI VIRUS CIRCOLANTI.

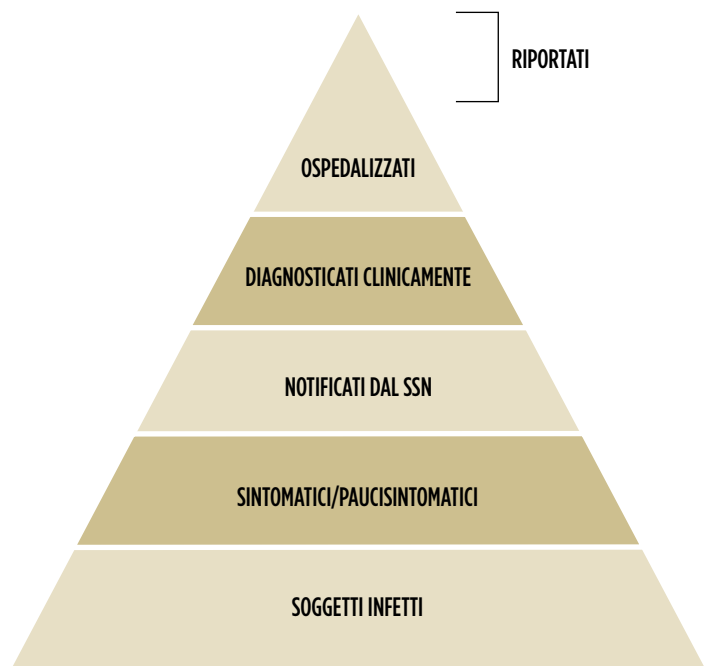
L'epidemiologia delle acque reflue, definita con il termine anglosassone *wastewater-based epidemiology* (Wbe), non è una novità di questo periodo, ma costituisce ormai da anni una scienza affermata che analizza non solo patogeni, ma anche farmaci e sostanze chimiche in questo tipo di matrice. I reflui urbani, infatti, raccolgono i residui metabolici umani dell'intera popolazione collegata a un collettore fognario e quindi a un depuratore cittadino. In particolare, la ricerca dei patogeni nelle acque reflue urbane risale alla seconda metà degli anni '40, quando vennero pubblicati i primi studi sulla presenza di enterovirus polio e non-polio (Sinclair et al., 2008).

La sorveglianza ambientale

L'Organizzazione mondiale della sanità (Oms), nell'ambito del programma mondiale di eradicazione della poliomielite (*Global Polio Eradication Initiative, Gpei*) raccomanda l'implementazione di sistemi di sorveglianza, per il mantenimento dello status "polio-free" che prevedono sia la sorveglianza attiva delle paralisi flaccide acute (Pfa) che la sorveglianza ambientale sui reflui urbani per la ricerca di enterovirus polio e non-polio. Il razionale di una sorveglianza ambientale si basa sul principio che i virus vengono escreti, principalmente mediante le feci, dai soggetti con infezione (sintomatici, paucisintomatici, asintomatici) e raggiungono gli impianti di trattamento e depurazione attraverso la rete fognaria. I virus che circolano in una determinata comunità (ad esempio aree metropolitane, quartieri cittadini) vengono così intercettati mediante analisi delle acque reflue urbane raccolte all'ingresso di un depuratore oppure su determinati nodi della rete fognaria. L'utilità di questo tipo di approccio appare evidente nella rappresentazione

FIG. 1
PIRAMIDE DELLA
SORVEGLIANZA

La sorveglianza clinica punta al vertice della piramide, la sorveglianza ambientale è alla sua base



della cosiddetta "piramide della sorveglianza" (figura 1): rispetto alle persone che hanno contratto 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 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.

Epidemiologia delle acque reflue

Da qui nasce l'epidemiologia basata sulle acque reflue, approccio che utilizza i reflui urbani come fonte di osservazione dinamica della circolazione dei patogeni

nella popolazione. Un singolo campione di refluo urbano rappresenta un *pool* di un numero elevato di individui, variabile sulla base della dimensione dell'impianto di depurazione. Secondo quanto specificato dall'Oms nelle linee guida per la sorveglianza ambientale del poliovirus, è possibile mediante l'analisi dei reflui urbani intercettare un individuo infetto tra 10.000 individui sani (Who, 2003). La presenza del virus in reflui urbani rappresenta, quindi, una "spia", un campanello di allarme che può evidenziare precocemente un'eventuale circolazione di un virus (*early warning*), consentendo quindi di riconoscere e circoscrivere più rapidamente eventuali nuovi focolai epidemici (Kaliner et al., 2013).

Variabilità genetica dei virus

La sorveglianza ambientale può inoltre essere utilizzata per lo studio della variabilità genetica dei virus circolanti nella popolazione (La Rosa et al., 2014;

Suffredini et al., 2018; Iaconelli et al., 2017), per lo studio di virus emergenti (Iaconelli et al., 2016; Bonanno Ferraro et al., 2018; Mancini et al., 2019; Mancini et al., 2020; Bonanno Ferraro et al., 2020) o anche per evidenziare trend in caso di epidemie (La Rosa et al., 2010).

Studi recenti hanno dimostrato che il Sars-Cov-2 può essere responsabile di sintomi di tipo gastroenterico (nausea, diarrea, dolori addominali) e può essere isolato dalle feci di pazienti con infezione, sia sintomatici che asintomatici. In questo ambito, sono state segnalate evidenze di escrezione del virus nelle feci di soggetti infetti, tanto che alcuni autori hanno posto l'interrogativo circa la possibilità di trasmissione per via fecale-orale del virus. Si sottolinea, però, che a oggi non vi sono evidenze di trasmissione idrica di Sars-Cov-2 e il virus non è stato a oggi mai rilevato in acque potabili. Infatti, il recente documento dell'Oms relativo alla gestione dell'acqua e dei servizi igienico-sanitari in riferimento al Covid-19 (Who & Unicef, 2020) afferma che non sono necessarie misure di prevenzione e controllo aggiuntive rispetto a quanto già indicato nelle linee guida della stessa Oms sulla qualità delle acque potabili. Tali conclusioni sono ribadite dall'Istituto superiore di sanità nel Rapporto Iss Covid-19 n. 10/2020 (Gruppo di lavoro Iss Ambiente-Rifiuti Covid-19, 2020) recante "Indicazioni ad interim su acqua e servizi igienici in relazione alla diffusione del virus Sars-Cov-2".

Numerosi studi hanno documentato la presenza del Sars-Cov-2 nelle feci di pazienti Covid-19 (Singer et al., 2020) in concentrazioni che possono raggiungere 10⁸ copie genomiche per grammo di feci (Lescure et al., 2020; Pan et al., 2020;

TAB. 1
POSITIVITÀ
DI SARS-COV-2

Positività rilevate in campioni di feci.

Riferimenti bibliografici	Campioni positivi per Sars-Cov-2 in feci	Totale pazienti	Paese
Cai et al., 2020	5	6	Cina
Chan et al., 2020	0	3	Cina
Chen et al., 2020a	13	19	Cina
Chen et al., 2020b	11	28	Cina
Holshue et al., 2020	1	1	Stati Uniti
Kam et al., 2020	1	1	Cina
Kujawski et al., 2020	7	10	Stati Uniti
Lescure et al., 2020	2	5	Francia
Ling et al., 2020	11	66	Cina
Pan et al., 2020	9	17	Cina
Tan et al., 2020	1	1	Cina
Wölfel et al., 2020	9	9	Germania
Wu et al., 2020b	8	10	Cina
Wu et al., 2020c	41	74	Cina
Xiao et al., 2020a	12	28	Cina
Xiao et al., 2020	39	71	Cina
Xing et al., 2020	3	3	Cina
Xu et al., 2020	8	10	Cina
Young et al., 2020	4	8	Singapore
Zhang et al., 2020a	5	14	Cina
Zhang et al., 2020b	10	12	Cina
Zhang et al., 2020c	9	16	Cina
Zhang et al., 2020c	4	15	Cina
Zheng et al.	55	93	Cina

Wölfel et al., 2020). Studi recenti hanno inoltre dimostrato che il Sars-Cov-2 può essere isolato dalle feci con metodi colturali e che pertanto il virus escreto può essere infettante (Wang et al., 2020b). La tabella 1 riassume gli studi principali a oggi pubblicati sulla presenza di Sars-Cov-2 in campioni fecali. Sulla base di queste evidenze, diversi gruppi di ricerca a livello mondiale hanno intrapreso la ricerca di Sars-Cov-2 in

acque reflue. I primi ad aver messo a punto una metodica per la determinazione di Sars-Cov-2 in reflui urbani sono stati i ricercatori del Kwr *Water Research Institute* nei Paesi Bassi (Medema et al., 2020). Successivamente, altri gruppi di ricerca in diversi paesi hanno identificato il virus nelle acque reflue come illustrato in tabella 2. Mediante questo approccio, frammenti di Rna sono stati riportati nel 41,4% dei reflui urbani di diversi paesi



a livello globale (Singer et al., 2020). In Italia, Rna di Sars-Cov-2 è stato rilevato per la prima volta in uno studio dell'Istituto superiore di sanità (Iss) in campioni di reflui urbani delle città di Roma e Milano raccolti tra febbraio e aprile 2020 (La Rosa et al., 2020). Un dato significativo emerso da questa indagine riguarda la positività rilevata nei reflui di Milano risalente a campioni raccolti il 24 e il 28 febbraio 2020, quando i casi notificati in Italia erano ancora poco numerosi (il primo caso autoctono è stato notificato il 21 febbraio 2020). Questo risultato mette in evidenza l'importanza e la sensibilità della sorveglianza ambientale nella rilevazione della presenza e della circolazione del virus nella popolazione spostando l'attenzione dal singolo individuo alla comunità. Le positività rilevate nel depuratore di Roma, invece, risalivano a fine marzo-inizio aprile 2020, in pieno periodo epidemico; in quelle date oltre 3.000 casi erano stati confermati nella regione Lazio, dei quali oltre 2.000 nell'area metropolitana di Roma. Un secondo studio dei ricercatori dell'Iss, effettuato su campioni di archivio raccolti nel nord Italia (nelle città di Milano, Torino e Bologna) in periodo pre-epidemico, ha rilevato la presenza di Rna di Sars-Cov-2 già nel mese di dicembre 2019 a Milano e Torino, e a gennaio 2020 a Bologna. In particolare, lo studio ha analizzato 40 campioni di acque reflue prelevati da ottobre 2019 a febbraio 2020, e 24 campioni di controllo ("bianchi") sicuramente raccolti in un periodo antecedente all'epidemia (settembre 2018-giugno 2019). I risultati sono stati confermati da due diversi laboratori all'interno dell'Iss con due differenti metodiche (una *nested* Rt-Pcr e una *real-time* Rt-qPcr), evidenziando la presenza di Rna di Sars-Cov-2 nei campioni prelevati a Milano e Torino il 18/12/2019 e a Bologna il 29/1/2020. Nelle stesse città sono stati trovati campioni positivi anche nei mesi successivi di gennaio e febbraio 2020. I campioni di ottobre e novembre 2019, come pure tutti i campioni "bianchi", hanno dato esito negativo (La Rosa et al., 2020b). Questo significa che nelle acque di scarico di Torino e Milano il virus era già presente settimane prima dei casi notificati. Uno studio è stato condotto in Francia su campioni clinici (tamponi oro-faringei, espettorato ecc.) di archivio di pazienti ospedalizzati, e tra essi un campione risalente alla fine di dicembre 2019 è risultato positivo al Sars-Cov-2 (Deslandes et al., 2020). Un'altra indagine, in Spagna, ha rilevato Rna di Sars-Cov-2 in campioni di acque

TAB. 2
POSITIVITÀ
DI SARS-COV-2

Positività rilevate in campioni di acque reflue.

Referenze bibliografiche	Positivi	Data campione	Tipologia campione	Paese
Ahmed et al., 2020	2/9	27/03/2020 01/04/2020	refluo grezzo	Australia
Bar Or, et al., 2020	3/17 1/2	dal 10/03/2020 al 21/04/2020	refluo grezzo refluo ospedaliero	Israele
Chavarria-Mirò et al., 2020	-	gennaio-marzo 2018 gen-mar-sett-dic-2019 gennaio-marzo 2020 dal 13/4/2020 al 25/5/2020	refluo grezzo	Spagna
Hata et al., 2020	7/27	dal 19/2/2020 al 20/5/2020	refluo grezzo	Giappone
Kocameni, 2020a	5/7	21/4/2020 25/4/2020	refluo grezzo	Turchia
Kocameni, 2020b	2/2 7/7	7/5/2020	fanghi primari fanghi attivi	Turchia
La Rosa, 2020a	6/12	dal 3/2/2020 al 2/4/2020	refluo grezzo	Italia
La Rosa et al., 2020b	15/40	dal 12/9/2018 al 19/6/2019 dal 9/10/2019 al 28/2/2020	refluo grezzo	Italia
Medema, 2020	10/13	da febbraio 2020 a marzo 2020	refluo grezzo	Paesi Bassi
Nemudryi, 2020	5/5 2/2	dal 30/3/2020 al 8/4/2020	refluo grezzo	Stati Uniti
Peccia, 2020	36/36	dal 19/3/2020 al 1/5/2020	fanghi primari	Stati Uniti
Randazzo, 2020	36/42 0/42	dal 12/3/2020 al 14/4/2020	refluo grezzo refluo trattato	Spagna
Rimoldi, 2020	4/6 0/6	14/4/2020 22/4/2020	refluo grezzo refluo trattato	Italia
Wu, 2020a	10/14	20/3/2020 25/3/2020	refluo grezzo	Cina
Wurtzer, 2020	23/23 6/8	dal 5/3/2020 al 7/4/2020	refluo grezzo refluo trattato	Francia

reflue raccolte nella metà di gennaio a Barcellona, circa 40 giorni prima della notifica del loro primo caso autoctono di Covid-19 (Chavarria-Mirò et al., 2020). Lo stesso studio, attualmente in *preprint*, pertanto ancora da valutare da parte di revisori esperti, avrebbe trovato una positività in un campione di archivio risalente al 12 marzo 2019.

La sorveglianza ambientale applicata nel periodo epidemico e post-epidemico

In questo contesto la sorveglianza ambientale per Sars-Cov-2 mediante l'analisi dei reflui urbani (figura 2) può rappresentare un utile strumento a integrazione della sorveglianza epidemiologica, per monitorarne la circolazione, anche in forma asintomatica, nella popolazione ed evidenziare precocemente una eventuale futura

ricomparsa del virus, consentendo di riconoscere e circoscrivere più rapidamente eventuali nuovi focolai epidemici. Questa sorveglianza nasce sul modello della Wbe fornendo informazioni su diversi ambiti durante il periodo epidemico e post epidemico. In particolare, una sorveglianza di Sars-Cov-2 durante il periodo epidemico è in grado di fornire informazioni sulla circolazione spaziale e temporale del virus nella popolazione che può dare importanti indicazioni sull'evoluzione dell'andamento epidemico (fase di crescita, fase stazionaria, fase di decrescita, esaurimento). È importante la produzione di dati sia di tipo qualitativo (presenza/assenza del virus e sequenze genetiche dei campioni positivi), come pure di tipo quantitativo (dati di concentrazione del virus nel refluo, espresso come copie genomiche per unità di volume). Inoltre, dati di sequenziamento, sia di tipo classico che *Next Generation Sequencing* sono di grande utilità ai fini del monitoraggio

delle possibili mutazioni nel genoma virale e per successivi studi filogenetici. È anche opportuno ricordare che mediante le analisi quantitative sulla presenza di Sars-Cov-2 in reflui urbani è possibile calcolare stime indirette sul numero di individui che escretano il virus. Alcuni studi su virus enterici hanno dimostrato che è possibile correlare la quantità di Rna virale sulla base del numero di infetti mediante algoritmi appositi che tengono in considerazione una serie di fattori (concentrazione del virus nelle feci dei pazienti con infezione, volume di feci eliminate/giorno, numero di persone allacciate alla fognatura, portata che perviene all'impianto di depurazione ecc.). A questo proposito, studi di questo tipo sono già stati condotti per diversi virus enterici come norovirus, virus dell'epatite A e dell'epatite E (Hellmér et al., 2014 Miura et al., 2016). Anche per Sars-Cov-2, in Australia, sono state effettuate stime dei soggetti escretori utilizzando dati quantitativi provenienti da reflui urbani, utilizzando modelli previsionali con simulazione Monte Carlo (Ahmed et al., 2020). Il monitoraggio durante il periodo post-epidemico rappresenta, diversamente, un vero e proprio sistema di allerta precoce (sul modello della sorveglianza ambientale poliovirus) consentendo, una volta segnalata la presenza del virus nel refluo urbano, non soltanto di rilevare una eventuale ricomparsa del virus, ma anche di circoscrivere tempestivamente il focolaio epidemico che ne potrebbe derivare.

La creazione di una rete stabile di sorveglianza ambientale post Covid-19, da mantenere attiva nel lungo periodo, garantirebbe la disponibilità di un sistema di *early-warning* in caso di nuove epidemie in un contesto di generale sostenibilità. Nell'ambito della Wbe sono nate reti di collegamento atte a consentire uno scambio di informazioni in tempo reale fra ricercatori di tutto il mondo, come ad esempio "Covid-19 Wbe Collaborative", alla quale partecipa anche l'Iss. Tale rete ha come obiettivo primario quello di facilitare una collaborazione multidisciplinare su scala globale, secondo un'ottica *One Health*, che include ingegneri, epidemiologi, matematici, modellisti e agenzie di sanità pubblica, per ottenere in modo tempestivo risultati che abbiano un elevato impatto ai fini della salvaguardia della salute pubblica (Aaron et al., 2020). La sfida per la ricerca di virus patogeni nelle acque di scarico urbane è da anni al centro della missione del Dipartimento ambiente e salute dell'Iss, che raccoglie reflui urbani per la ricerca di virus enterici nell'ambito di diversi progetti dal 2007. Lo sviluppo di un sistema per la ricerca di Rna di Sars-Cov-2 in reflui urbani (La Rosa et al, 2020a, La Rosa et al 2020b), e la disponibilità di molte strutture di controllo sanitario e ambientale, tra le quali le Agenzie di protezione ambientale, ha consentito di proporre di recente al ministero della Salute una azione dal titolo "*Sorveglianza ambientale di Sars-Cov-2 attraverso i reflui urbani in*

Italia: indicazioni sull'andamento epidemico e allerta precoce (acronimo: Sari)". Al fine di non perdere informazioni preziose durante i mesi estivi, è stato avviato in data 30/6/2020 con un *webinar* dedicato organizzato da Iss, un progetto pilota trimestrale (luglio-settembre), mediante la partecipazione su base volontaria di Arpa, Asl, Izs, Università e gestori idro-potabili, per la ricerca di Sars-Cov-2 in reflui urbani in siti prioritari (località turistiche), con il coordinamento di Iss. In questo ambito, è di fondamentale importanza che i metodi per la ricerca del virus siano armonizzati per assicurare la comparabilità dei dati ottenuti da laboratori diversi. L'obiettivo più ambizioso è una rete nazionale di sorveglianza strutturata che, a partire dall'autunno 2020, potrebbe essere utilizzata per integrare gli strumenti clinici di controllo sul territorio (*screening* con tamponi e i test sierologici) con il controllo ambientale.

Giuseppina La Rosa¹, Giusy Bonanno Ferraro¹, Marcello Iaconelli¹, Pamela Mancini¹, Carolina Veneri¹, Lucia Bonadonna¹, Luca Lucentini¹, Elisabetta Suffredini²

Istituto superiore di sanità
 1. Dipartimento ambiente e salute
 2. Dipartimento di sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria

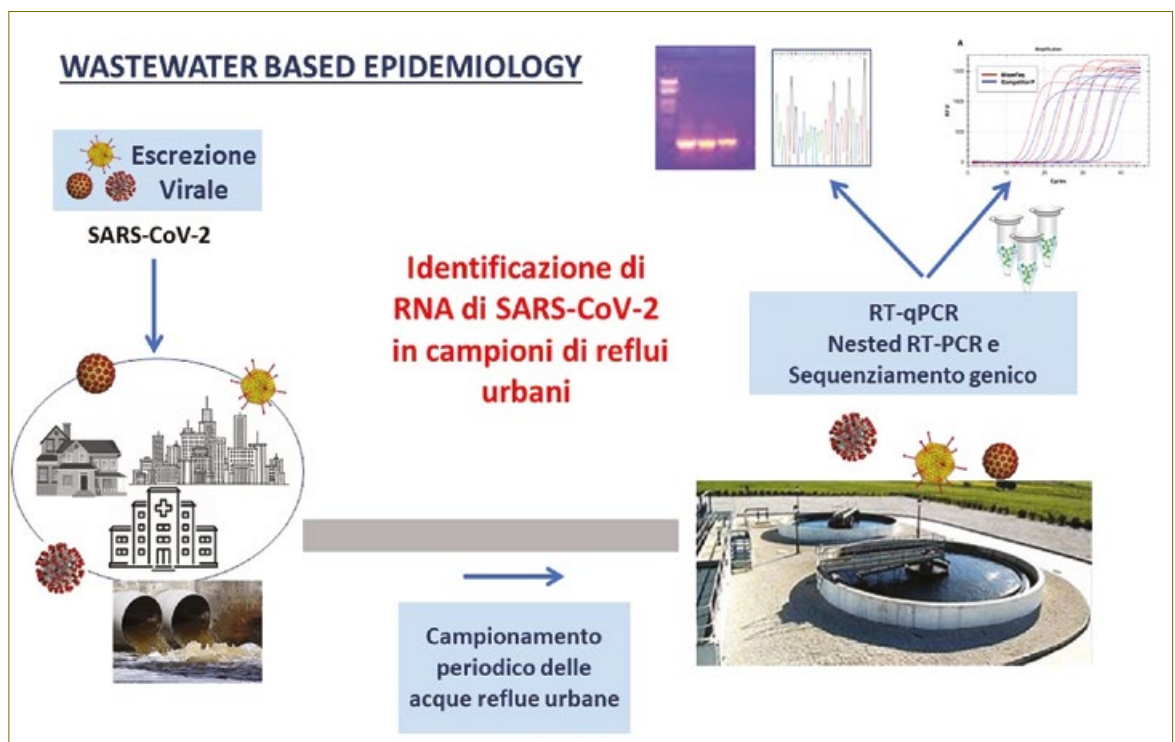


FIG. 2
 WASTEWATER-BASED
 EPIDEMIOLOGY

Dall'escrezione virale
 alla identificazione/
 quantificazione del virus.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] Bivins A., North D., Ahmad A., Ahmed W., Alm E., Been F., Bhattacharya P., Bijlsma L., et al., "Wastewater-Based Epidemiology: Global Collaborative to Maximize Contributions in the Fight Against COVID-19", *Environmental Science & Technology*, 2020, Article ASAP. DOI:10.1021/acs.est.0c02388.
- [2] Ahmed W., Angel N., Edson J., et al., "First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community" (published online ahead of print, 2020 Apr 18), *Sci Total Environ.*, 2020;728:138764. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138764.
- [3] Bar Or I., Yaniv K., Shagan M., Ozer E., Erster O., Mendelson E., Mannasse B., Shirazi R., Kramarsky-Winter E., Nir O., et al., (2020), "Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance", *medRxiv*. doi:10.1101/2020.04.26.20073569.
- [4] Bonanno Ferraro G., Mancini P., Divizia M., Suffredini E., Della Libera S., Iaconelli M., La Rosa G., "Occurrence and Genetic Diversity of Human Coronavirus in Sewage in Italy", *Food Environ Virol.*, 2018 Dec;10(4):386-390. doi: 10.1007/s12560-018-9356-2.
- [5] Bonanno Ferraro G., Mancini P., Veneri C., et al., "Evidence of Saffold virus circulation in Italy provided through environmental surveillance", *Lett Appl Microbiol.*, 2020;70(2):102-108. doi:10.1111/lam.13249.
- [6] Cai J., Xu J., Lin D., Yang Z., Xu L., Qu Z., Zhang Y., Zhang H., Jia R., Liu P., et al., 2020, "A Case Series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features", *Clin. Infect. Dis.*, doi:10.1093/cid/ciaa198.
- [7] Chan J. F.-W., Yuan S., Kok K.-H., To K. K.-W., Chu H., Yang J., Xing F., Liu J., Yip C. C.-Y., Poon R. W.-S., et al. (2020), "A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster", *Lancet*, 395, 514-523. doi:10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
- [8] Chavarria-Mirò G., Anfruns-Estrada E., Guix S., Paraira M., Galofrè B., Sánchez G., Pintò R., Bosch A., 2020, "Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases", *medRxiv preprint*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.13.20129627>.
- [9] Chen C., Gao G., Xu Y., Pu L., Wang Q., Wang L., Wang W., Song Y., Chen M., Wang L., et al. (2020a), "SARS-CoV-2-Positive Sputum and Feces After Conversion of Pharyngeal Samples in Patients With COVID-19", *Ann. Intern. Med.*, doi:10.7326/M200991.
- [10] Chen C., Gao G., Xu Y., Pu L., Wang Q., Wang L., Wang W., Song Y., Chen M., Wang L., et al. (2020a), "SARS-CoV-2-Positive Sputum and Feces After Conversion of Pharyngeal Samples in Patients With COVID-19", *Ann. Intern. Med.*, doi:10.7326/M200991.
- [11] Deslandes A., Berti V., Tandjaoui-Lambotte Y., et al. "SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019", *Int J Antimicrob Agents*, 2020; 55(6):106006. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106006.
- [12] Lescure F.X., Bouadma L., Nguyen D., Parisey M., Wicky P.H., Behillil S., et al., "Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series", *Lancet Infect. Dis.*, 2020, 10.1016/S1473-3099(20)30200-0 S1473-3099(20)30200-0.
- [13] Gruppo di Lavoro Iss Ambiente-Rifiuti, "COVID-19. Indicazioni ad interim su acqua e servizi igienici in relazione alla diffusione del virus SARS-CoV-2 Versione del 7 aprile 2020", Roma, Istituto Superiore di Sanità, 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 10/2020).
- [14] Hata A., Honda R., Hara-Yamamura H., Meuchi Y., 2020, "Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan by multiple molecular assays-implication for wastewater-based epidemiology (WBE)". *medRxiv preprint*, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.20126417>.
- [15] Hellmér M., Paxéus N., Magnius L., et al., "Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks". *Appl Environ Microbiol.*, 2014;80(21):6771-6781. doi:10.1128/AEM.01981-14.
- [16] Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., Spitters C., Ericson K., Wilkerson S., Tural A., et al. (2020). "First case of 2019 novel coronavirus in the united states". *N. Engl. J. Med.*, 382, 929-936. doi:10.1056/NEJMoa2001191.
- [17] Iaconelli M., Bonanno Ferraro G., Mancini P., et al. "Nine-Year Nationwide Environmental Surveillance of Hepatitis E Virus in Urban Wastewaters in Italy (2011-2019)". *Int J Environ Res Public Health*, 2020;17(6):E2059. Published 2020 Mar 20. doi:10.3390/ijerph17062059.
- [18] Iaconelli M., Divizia M., Della Libera S., Di Bonito P., La Rosa G. "Frequent Detection and Genetic Diversity of Human Bocavirus in Urban Sewage Samples". *Food Environ Virol.*, 2016;8(4):289-295. doi:10.1007/s12560-016-9251-7.
- [19] Iaconelli M., Valdazo-González B., Equestre M., et al. "Molecular characterization of human adenoviruses in urban wastewaters using next generation and Sanger sequencing". *Water Res.* 2017;121:240-247. doi:10.1016/j.watres.2017.05.039.
- [20] Kaliner E., Moran-Gilad J., Grotto I., Somekh E., Kopel E., Gdalevich M., Shimron E., Amikam Y., Leventhal A., Lev B., Gamzu R., "Silent reintroduction of wild-type poliovirus to Israel, 2013 - risk communication challenges in an argumentative atmosphere". *Euro Surveill.* 2014;19(7):pii=20703. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.7.20703>
- [21] Kam K.-Q., Yung C. F., Cui L., Lin Tzer Pin R., Mak T. M., Maiwald M., Li J., Chong C. Y., Nadua K., Tan N. W. H., et al. (2020). "A Well Infant with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) with High Viral Load". *Clin. Infect. Dis.* doi:10.1093/cid/ciaa201.
- [22] Kocamemi B. A., Kurt H., Sait A., Sarac F., Saatci A. M. and Pakdemirli, B. (2020b). "SARS-CoV-2 Detection in Istanbul Wastewater Treatment Plant Sludges". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.05.12.20099358.
- [23] Kocamemi B. A., Kurt H., Hacıoğlu S., Yarılcı C., Saatci A.M., Pakdemirli B., 2020. "First Data-Set on SARS-CoV-2 Detection for Istanbul Wastewaters in Turkey". *medRxiv preprint*.
- [24] Kujawski S. A., Wong K. K., Collins J. P., Epstein L., Killerby M. E., Midgley C. M., Abedi G. R., Ahmed N. S., Almendares O., Alvarez F. N., et al. (2020). "First 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States". *medRxiv*.
- [25] La Rosa G., Iaconelli M., Pourshaban M., Fratini M., Muscillo M., "Molecular detection and genetic diversity of norovirus genogroup IV: a yearlong monitoring of sewage throughout Italy". *Arch Virol.* 2010;155(4):589-593. doi:10.1007/s00705-010-0619-y.
- [26] La Rosa G., Libera S.D., Iaconelli M., et al. "Surveillance of hepatitis A virus in urban sewages and comparison with cases notified in the course of an outbreak", Italy 2013. *BMC Infect Dis.* 2014;14:419. Published 2014 Jul 29. doi:10.1186/1471-2334-14-419.
- [27] La Rosa G., Iaconelli M., Mancini P., Bonanno Ferraro G., Veneri et al. "First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy". *Sci. Total Environ.* 2020; 736:139652. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>.
- [28] La Rosa G., Mancini P., Bonanno Ferraro G., Veneri C., Iaconelli M., Bonadonna L., Lucentini L., Suffredini E., 2020b. "SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: evidence from environmental monitoring". *medRxiv*. doi:
- [29] Lescure F.X., Bouadma L., Nguyen D., Parisey M., Wicky P.H., Behillil S., et al. "Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series", *Lancet Infect. Dis.* (2020), 10.1016/S1473-3099(20)30200-0 S1473-3099(20)30200-0.
- [30] Ling Y., Xu S.-B., Lin Y.-X., Tian D., Zhu Z.-Q., Dai F.-H., Wu F., Song Z.-G., Huang W., Chen J., et al. (2020). "Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients". *Chin. Med. J.* doi:10.1097/CM9.0000000000000774.
- [31] Lo I. L., Lio C. F., Cheong H. H., Lei C. I., Cheong T. H., Zhong X., Tian Y., and Sin N. N. (2020). "Evaluation of SARS-CoV-2 RNA shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau". *Int. J. Biol. Sci.* 16, 1698-1707. doi:10.7150/ijbs.45357.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [32] Mancini P, Bonanno Ferraro G, Iaconelli M, Suffredini E, Valdazo-González B, Della Libera S, Divizia M, La Rosa G. "Molecular characterization of human Sapovirus in untreated sewage in Italy by amplicon-based Sanger and next-generation sequencing". *J Appl Microbiol*. 2019 Jan;126(1):324-331. doi:10.1111/jam.14129.
- [33] Mancini P, Bonanno Ferraro G, Suffredini E, et al. "Molecular Detection of Human Salivirus in Italy Through Monitoring of Urban Sewages". *Food Environ Virol*. 2020;12(1):68-74. doi:10.1007/s12560-019-09409-w.
- [34] Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, and Brouwer A. (2020). "Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands". *Environ. Sci. Technol. Lett*. doi:10.1021/acs.estlett.0c00357.
- [35] Miura T, Lhomme S, Le Saux J.C., et al. "Detection of Hepatitis E Virus in Sewage After an Outbreak on a French Island". *Food Environ Virol*. 2016;8(3):194-199. doi:10.1007/s12560-016-9241-9.
- [36] Nemudryi A, Nemudraia A, Surya K, Wiegand T, Buyukyork M, Wilkinson R, and Wiedenheft B. (2020). "Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV2 in municipal wastewater". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.04.15.20066746.
- [37] Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon L.L.M., Wang Q. "Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples". *Lancet Infect. Dis*. 20, 411-412. 2020. doi: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30113-4).
- [38] Peccia J, Zulli A, Brackney D. E., Grubaugh N. D., Kaplan E. H., Casanovas-Massana A., Ko A. I., Malik A. A., Wang D., Wang M., et al. (2020). "SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.05.19.20105999.
- [39] Randazzo W, Truchado P, Ferrando E. C., Simon P, Allende A., and Sanchez G. (2020). "SARS-CoV-2 RNA titers in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.04.22.200752004.
- [40] Randazzo W, Truchado P, Ferrando E. C., Simon P, Allende A., and Sanchez G. (2020). "SARS-CoV-2 RNA titers in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.04.22.20075200.
- [41] Rimoldi S. G., Stefani F, Gigantiello A., Polesello S., Comandatore F., Mileto D., Maresca M., Longobardi C., Mancon A., Romeri F., et al. (2020). "Presence and vitality of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.05.01.20086009.
- [42] Sinclair R.G., Choi C.Y., Riley M.R., Gerba C.P. "Pathogen surveillance through monitoring of sewer systems". *Adv Appl Microbiol*. 2008;65:249-269. doi:10.1016/S00652164(08)00609-6.
- [43] Singer A. C. & Wray R. "Detection and survival of SARS-coronavirus in human stool, urine, wastewater and sludge". *Preprints 2020*, 2020060216 (doi:10.20944/preprints202006.0216.v1).
- [44] Suffredini E, Iaconelli M, Equestre M, et al. "Genetic Diversity Among Genogroup II Noroviruses and Progressive Emergence of GII.17 in Wastewaters in Italy (2011-2016)" Revealed by Next-Generation and Sanger Sequencing (published correction appears in *Food Environ Virol*. 2018 May 4;). *Food Environ Virol*. 2018;10(2):141-150. doi:10.1007/s12560-017-9328-y.
- [45] Tang A, Tong Z, Wang H, Dai Y, Li K, Liu J, et al. "Detection of Novel Coronavirus by RT-PCR in Stool Specimen from Asymptomatic Child", China. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(6):1337-1339. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2606.200301>.
- [46] Wang W, Xu Y, Gao R, et al. "Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens". *Jama* 2020b; 323(18):1843-1844. doi:10.1001/jama.2020.3786.
- [47] Wölfel R, Corman V.M., Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Mueller M.A., Niemeyer D, Vollmar P, Rothe C., Hoelsche M, Bleicker T, Bruenink S, Schneider J, Ehmann R, Zwirgmaier K, Drosten C., Wendtner C., 2020. "Virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease". *Nature*. 2019.doi.
- [48] World Health Organization & United Nations Children's Fund (Unicef). (2020). "Water, sanitation, hygiene, and waste management for the COVID-19 virus: interim guidance", 23 April 2020. *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331846>
- [49] World Health Organization. (2003). "Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation". *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67854>
- [50] Wu F, Xiao A, Zhang J, Gu X., Lee W. L., Kauffman K., Hanage W, Matus M., Ghaeli N., Endo N., et al. (2020a). "SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.04.05.200515408.
- [51] Wu Q, Xing Y, Shi L, Li W, Gao Y, Pan S, Wang Y, Wang W, and Xing Q. (2020b). "Clinical Characteristics of 74 Children with Coronavirus Disease 2019". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.03.19.20027078.
- [52] Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, Yin H, Xiao Q, Tang Y, Qu X, et al. (2020c). "Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples". *Lancet Gastroenterol. Hepatol*. 5, 434-435. doi:10.1016/S2468-1253(20)30083-2.
- [53] Wurtzer, Marechal V, Mouchel J.M., Moulin L., "Time Course Quantitative Detection of SARS-CoV-2 in Parisian Wastewaters Correlates With COVID-19 Confirmed Cases", *medRxiv prep* (2020), 10.1101/2020.04.12.20062679.
- [54] Xiao F, Sun J, Xu Y, Li F, Huang X, Li H, Zhao J, Huang J, and Zhao J. (2020a). "Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19." *Emerging Infectious Disease* 26 (8). <https://doi.org/10.3201/eid2608.200681>.
- [55] Xiao F, Tang M, Zheng X., Liu Y, Li X. and Shan H. (2020b). "Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2". *Gastroenterology* 158, 1831-1833.e3. doi:10.1053/j.gastro.2020.02.055.
- [56] Xing Y, Ni W, Wu Q, Li W, Li G, Tong J, Song X. and Xing Q. (2020). "Prolonged presence of SARS-CoV-2 in feces of pediatric patients during the convalescent phase". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.03.11.20033159.
- [57] Xu Y, Li X, Zhu B, Liang H, Fang C, Gong Y, Guo Q, Sun X, Zhao D, Shen J, et al. (2020). "Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding". *Nat. Med*. 26, 502-505. doi:10.1038/s41591-020-0817-4.
- [58] Young B. E., Ong S. W. X., Kalimuddin S., Low J. G., Tan S. Y., Loh J., Ng O.-T., Marimuthu K., Ang L. W., Mak T. M., et al. (2020). "Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore". *JAMA*. doi:10.1001/jama.2020.3204
- [59] Zhang Y, Chen C, Zhu S. et al. "Isolation of 2019nCoV from a stool specimen of a laboratory confirmed case of the coronavirus disease 2019 (COVID-19)". *China CDC Weekly*. 2020;2(8):123-4.
- [60] Zhang J, Wang S, and Xue Y. (2020a). "Fecal specimen diagnosis 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia". *J. Med. Virol*. doi:10.1002/jmv.25742.
- [61] Zhang N, Gon, Y., Meng F, Bi Y, Yang P, and Wang F. (2020b). "Virus shedding patterns in nasopharyngeal and fecal specimens of COVID-19 patients". *medRxiv*. doi:10.1101/2020.03.28.20043059.
- [62] Zhang W, Du R.-H., Li B., Zheng X.-S., Yang X.-L., Hu B., Wang Y.-Y., Xiao G.-F., Yan B., Shi Z.-L., et al. (2020c). "Molecular and serological investigation of 2019nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes". *Emerg. Microbes Infect*. 9, 386-389. doi:10.1080/22221751.2020.1729071.
- [63] Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, Xie G, Lin S, Wang R, Yang X, et al. (2020). "Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study.