

IL SISTEMA DI SORVEGLIANZA DI SARS-COV-2 NEI REFLUI

IL NETWORK DI SORVEGLIANZA AMBIENTALE SULLA PRESENZA DEL VIRUS DEL COVID-19 NELLE ACQUE REFLUE, AVVIATO CON IL PROGETTO SARI E OGGI ATTIVO IN QUASI TUTTO IL TERRITORIO NAZIONALE, CONTRIBUISCE A RAFFORZARE LA SORVEGLIANZA GENOMICA ED EPIDEMIOLOGICA. I RISULTATI CONSENTONO DI EVIDENZIARE L'EVOLUZIONE DELLE VARIANTI.

La sorveglianza ambientale per Sars-Cov-2 mediante l'analisi dei reflui urbani (*wastewater-based epidemiology*, Wbe) rappresenta uno strumento complementare alla sorveglianza epidemiologica, per il monitoraggio della circolazione del virus nella popolazione [1].

La principale prerogativa della Wbe è rappresentata dalla possibilità di rilevare nell'ambiente la circolazione del virus escreto sia da pazienti sintomatici sia da individui con infezioni asintomatiche o subcliniche, con la conseguente opportunità di poter monitorare aggregati di popolazione più o meno estesi. La sorveglianza dei reflui urbani, laddove effettuata in forma sistematizzata e in connessione con le reti di sorveglianza sanitaria territoriali, può essere inoltre utilizzata come sistema di allerta per evidenziare anticipatamente una eventuale comparsa o ricomparsa del virus, consentendo di riconoscere e circoscrivere più rapidamente eventuali nuovi focolai epidemici. Può inoltre essere utilizzata come strumento per studiare la variabilità del virus e la diffusione spazio-temporale delle diverse varianti.

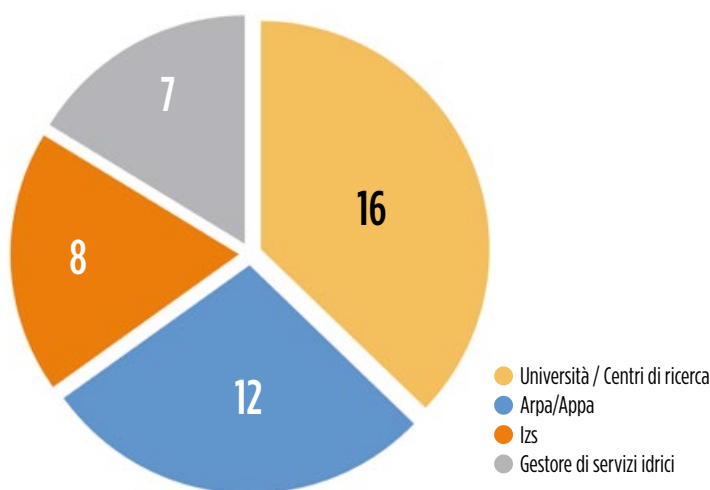


FIG. 1
RETE SARI

Laboratori partecipanti alla rete SARI.

Implementazione della sorveglianza ambientale del Sars-Cov-2 in Italia

I primi studi sulla presenza del genoma di Sars-Cov-2 in acque reflue urbane in Italia risalgono ai primi mesi della pandemia (febbraio/maggio 2020) [2,3]. Uno studio pilota, il progetto "Sari" (*Sorveglianza ambientale dei reflui in Italia - Sorveglianza epidemiologica per Sars-Cov-2 nelle acque*

reflue urbane), è stato avviato nel luglio del 2020, sul modello della *wastewater-based epidemiology*. Il progetto, coordinato dall'Istituto superiore di sanità (Iss), ha permesso la costruzione di una rete di strutture territoriali nazionali (Arpa, Asl, Izs, Università, centri di ricerca e gestori del servizio idrico integrato) partecipanti su base volontaria [4]. A marzo 2021 il progetto Sari è stato incardinato in un programma Ccm del Ministero della



FOTO: ARPA

Salute, della durata di 24 mesi, con la partecipazione formale di 14 Regioni e Province autonome e con capofila la Lombardia [5]. Successivamente alla pubblicazione della raccomandazione della Commissione (Ue) 2021/472 relativa “a un approccio comune per istituire una sorveglianza sistematica del Sars-Cov-2 e delle sue varianti nelle acque reflue”, le attività di ricerca del progetto Sari sono state convertite in un sistema di sorveglianza entrato in funzione il 1° ottobre 2021. Tale sorveglianza è coordinata dall'Iss, e si avvale per la sua attuazione del supporto delle Regioni e delle Province autonome; per la realizzazione degli obiettivi della raccomandazione UE 2021/472, il decreto legge n. 73 del 25/05/2021, art. 34 ha stabilito un finanziamento dedicato. La sorveglianza ambientale del Sars-Cov-2 si propone due principali obiettivi: 1) l'analisi degli andamenti delle concentrazioni del Sars-Cov-2 nelle acque reflue nel corso del tempo, come descrittore dell'escrezione virale con le feci umane, e quindi dell'andamento dell'infezione nella popolazione 2) l'analisi delle varianti di Sars-Cov-2 rilevate nei reflui, come esercizio efficace per tracciare la diffusione delle varianti nella popolazione e l'evoluzione del virus.

laboratori (Arpa/Appa, Izs, Università e centri di ricerca, gestori dei servizi idrici, figura 1).

La rete di sorveglianza è costituita da 167 impianti di depurazione dei reflui (figura 2 e tabella 1). In accordo con la Raccomandazione 2021/472, all'interno di tale elenco, sono compresi tutti gli impianti di depurazione localizzati in siti urbani con più di 150.000 abitanti. Inoltre, rispetto a tale requisito, per migliorare la copertura demografica e territoriale, sono stati aggiunti gli impianti presenti presso i centri urbani con una popolazione compresa tra 50.000 e 150.000 abitanti e alcuni ulteriori impianti che raccolgono le acque di comuni con meno di 50.000 abitanti, inclusi nella rete per la loro rilevanza turistica. La frequenza di campionamento presso i depuratori che servono centri urbani ≥ 150.000 abitanti è di due volte a settimana (come da raccomandazione Eu 2021/472), mentre è di un campionamento a settimana negli impianti presenti in centri con una popolazione tra 50.000 e 150.000 (come previsto dall'Allegato 3 del decreto ministeriale del 30/10/2021). Tale schema di campionamento consente la raccolta e l'analisi di circa 200 campioni a settimana.

armonizzati elaborati e condivisi da Iss [6]. I materiali di riferimento per l'implementazione dei protocolli sono stati prodotti dall'Iss e inviati a tutti i laboratori della rete per assicurare la comparabilità dei risultati. I campioni di reflui (medio composito delle 24 ore) sono raccolti all'ingresso degli impianti di depurazione e inviati refrigerati ai laboratori di riferimento regionali, dove sono concentrati attraverso una precipitazione con polietilene glicole mediante centrifugazione [7]. Dopo l'estrazione del genoma, gli Rna sono sottoposti a una *real time* Pcr quantitativa per determinare la concentrazione del Sars-Cov-2, che viene espressa in copie genomiche/litro di refluo. I dati quantitativi così ottenuti sono infine inviati dai referenti dei laboratori a un database centralizzato Gis, sviluppato da Iss, che elabora e visualizza i dati mediante apposite *dashboard*, a disposizione delle autorità sanitarie centrali e regionali. Il database include le strutture e i laboratori della rete, i dati associati ai depuratori (ubicazione, bacino di utenza, abitanti equivalenti, frequenza di campionamento ecc.) e gli Id unici dei campioni con le relative informazioni associate (data di raccolta, dati analitici, risultati). Le analisi sulle varianti del Sars-Cov-2 vengono effettuate mediante indagini mensili (*flash survey*) che forniscono una fotografia delle varianti circolanti in una

Network di sorveglianza ambientale

Attualmente nell'ambito del progetto di sorveglianza ambientale sono coinvolte 20 delle 21 Regioni e Province autonome italiane, con l'unica eccezione rappresentata dalla Regione Sardegna che non ha ancora fornito un piano operativo per l'attuazione della sorveglianza. Alle attività di sorveglianza contribuiscono 43

Metodi per le determinazioni quantitative e lo studio delle varianti

Le determinazioni quantitative sulle acque reflue (analisi del numero di particelle virali di Sars-Cov-2 per litro di refluo) vengono effettuate dai laboratori regionali partecipanti al network Sari (v. il box ringraziamenti) mediante protocolli

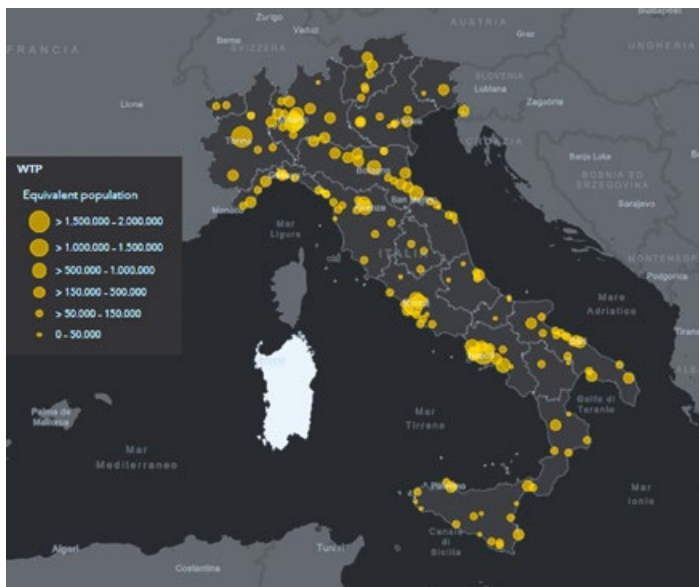


FIG. 2
RETE SARI

Siti di campionamento (impianti di depurazione dei reflui) in 20 regioni/province autonome.

Regione/provincia autonoma	N. impianti depurazione reflui
Abruzzo	5
Basilicata	2
Calabria	6
Campania	10
Emilia-Romagna	14
Friuli Venezia Giulia	3
Lazio	13
Liguria	16
Lombardia	15
Marche	6
Molise	3
Piemonte	7
Puglia	16
Sicilia	17
Toscana	13
Umbria	3
Valle d'Aosta	2
Veneto	10
P.A. Bolzano	3
P.A. Trento	3
Totale	167

TAB. 1 RETE SARI
Impianti di depurazione selezionati per la sorveglianza in Italia.

specifica finestra temporale (solitamente di una settimana). Per tali indagini, gli Rna del virus nei campioni analizzati dai laboratori regionali vengono inviati all'Iss e sottoposti all'amplificazione di una regione genomica di circa 1.600 basi della proteina Spike. I prodotti dell'amplificazione sono quindi sottoposti a sequenziamento (convenzionale e NextGeneration) [8,9] per l'individuazione di mutazioni distintive delle diverse varianti (*variant of concern, VoC* e *variant of interest, VoI*) (figura 3).

Risultati

Analisi dei trend

Nell'arco di 7 mesi di sorveglianza (ottobre 2021-aprile 2022) sono stati analizzati circa 5.000 campioni da 20 regioni e province autonome (figura 4); da circa l'85% di questi campioni è stato possibile rilevare il genoma del virus. I risultati vengono rappresentati nel database sia come dati qualitativi di presenza/assenza del genoma virale (figura 5), sia in forma quantitativa

(figura 6), espressi come copie genomiche di Sars-Cov-2 per abitante nelle 24 ore.

Un approccio innovativo per lo studio dei trend, a partire dai dati grezzi illustrati in figura 6, è stato sviluppato utilizzando grafici Quiver per evidenziare l'andamento delle concentrazioni virali nel tempo e quantificare la direzione (aumento/stazionario/diminuzione) e l'intensità dei cambiamenti nelle concentrazioni settimanali, come di recente pubblicato [10]. Nell'arco dei primi sei mesi di sorveglianza, le concentrazioni

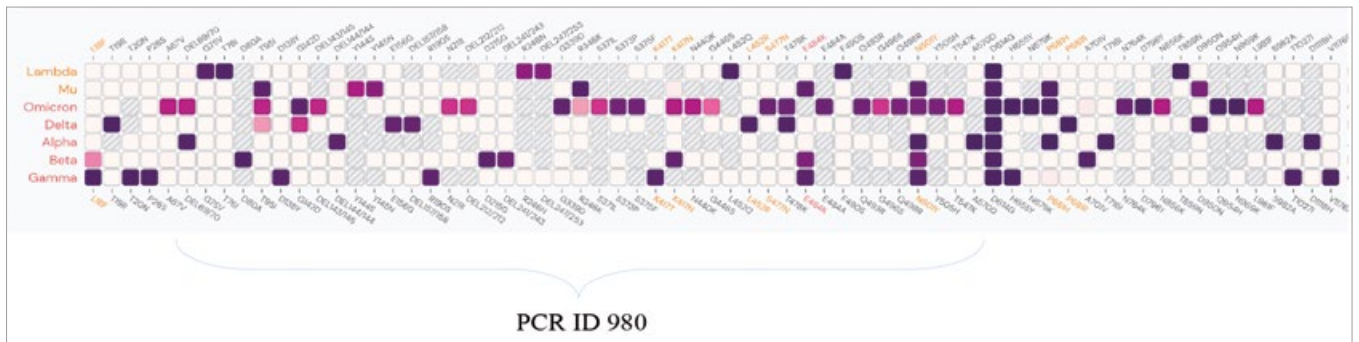


FIG. 3 MUTAZIONI
Mutazioni nella regione codificante per la proteina Spike, che permettono di discriminare le diverse varianti di Sars-Cov-2 (<https://outbreak.info>)

FIG. 4 CAMPIONAMENTI

Campionamenti effettuati da ottobre 2021 ad aprile 2022. Nel grafico i diversi colori rappresentano le diverse regioni/province autonome.

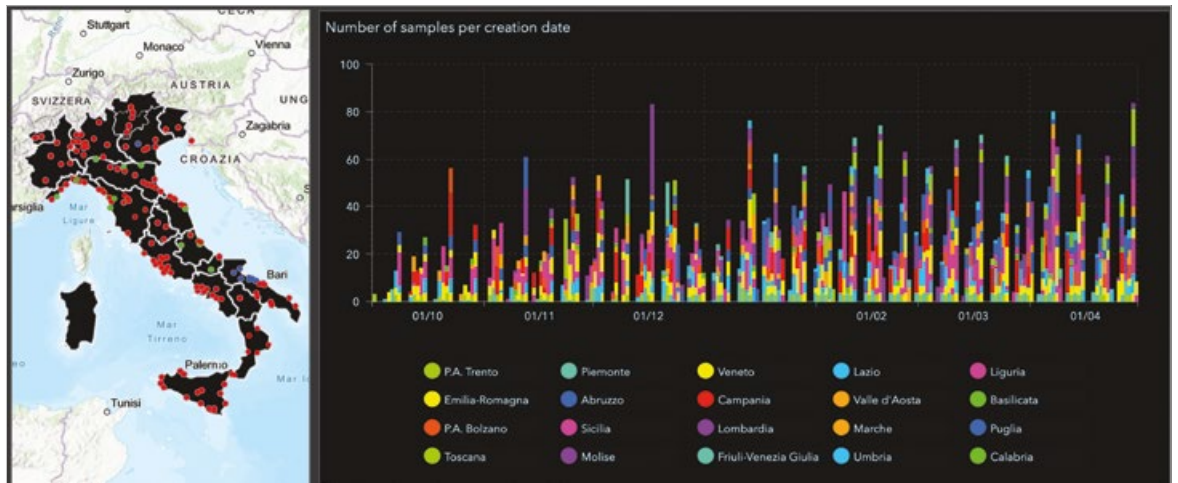
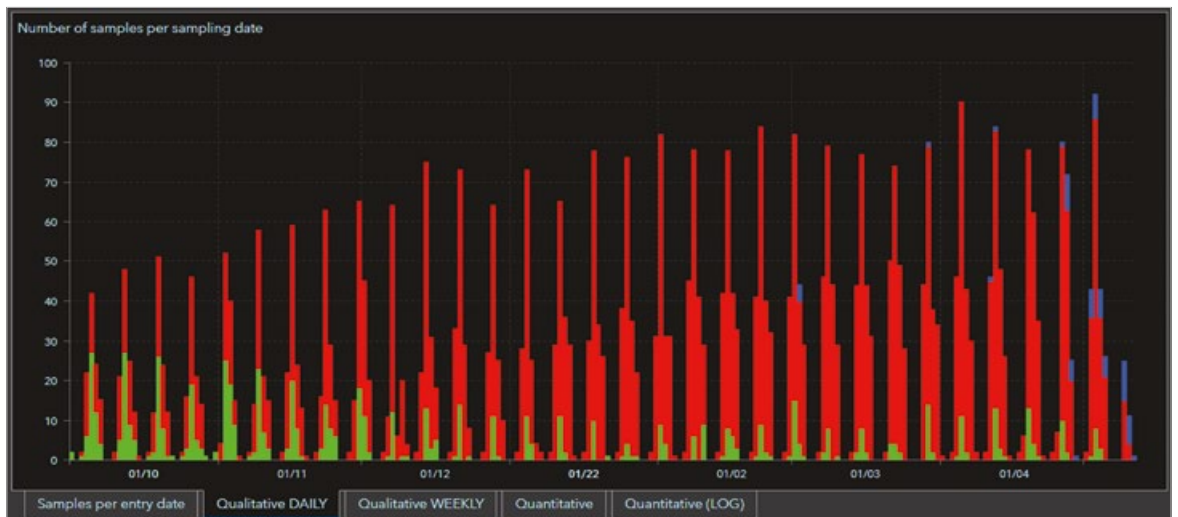


FIG. 5 CAMPIONAMENTI

Risultati qualitativi per giornata di campionamento. Rosso=campione positivo; verde=campione negativo; blu= non ancora analizzato



virali hanno subito variazioni come conseguenza dei cambiamenti del quadro epidemiologico. In particolare, sono stati osservati due incrementi, uno più rilevante con picco a gennaio 2022, e uno più lieve, con picco a marzo 2022, in corrispondenza delle due ondate legate alla variante Omicron, come mostrato nel grafico di figura 7.

Analisi delle varianti

Una prima *flash survey* pilota è stata effettuata a luglio 2021 per definire l'organizzazione logistica e per la messa a punto dei criteri di analisi. A decorrere da ottobre 2021 sono state effettuate *flash survey* mensili, i cui risultati sono pubblicati sul sito dell'Istituto superiore di sanità alla sezione "Sorveglianza ambientale" (www.iss.it/cov19-acque-reflue). È stata inoltre effettuata una *flash survey* straordinaria a dicembre 2021,

mirata alla ricerca della variante Omicron nei reflui.

Nell'arco di 7 mesi sono stati analizzati, per la ricerca delle varianti di Sars-Cov-2, un totale di 1.251 campioni (tabella 2). Mutazioni caratteristiche di diverse varianti sono state documentate a decorrere da luglio 2021, in sostanziale accordo con quanto rilevato dalla sorveglianza epidemiologica. In particolare, a luglio 2021 è stata osservata una predominanza della variante Delta, ma sono state rilevate anche le varianti Alfa e Beta, seppure in percentuale minore. Da ottobre 2021 a inizio dicembre 2021 è stata identificata esclusivamente la variante Delta, associata a notevole variabilità genetica. Nel mese di dicembre è stato poi osservato un incremento consistente della variante Omicron in tutto il Paese [9,11], diventando predominante a

gennaio 2022, con la variante Delta che ha mostrato, da allora, una più bassa circolazione. A decorrere da febbraio 2022, nei reflui, è stata infine osservata esclusivamente la variante Omicron (BA.1, BA.1.1 e BA.2) con prevalenza del *sublineage* BA.2 dal mese di marzo.

Conclusioni e prospettive future

Dopo una fase iniziale caratterizzata da un graduale aumento del numero delle regioni italiane coinvolte e dei punti di campionamento considerati, oltre che da un potenziamento delle capacità analitiche dei laboratori, la rete di sorveglianza ambientale nazionale è a oggi pienamente operativa. Le concentrazioni di Sars-Cov-2 rilevate nei reflui hanno rispecchiato gli andamenti osservati nei casi clinici nella

FIG. 6
DETERMINAZIONI
QUANTITATIVE

Risultati quantitativi espressi come copie genomiche di Sars-Cov-2 per abitante nelle 24 ore. Ciascun punto del grafico rappresenta una singola determinazione quantitativa.

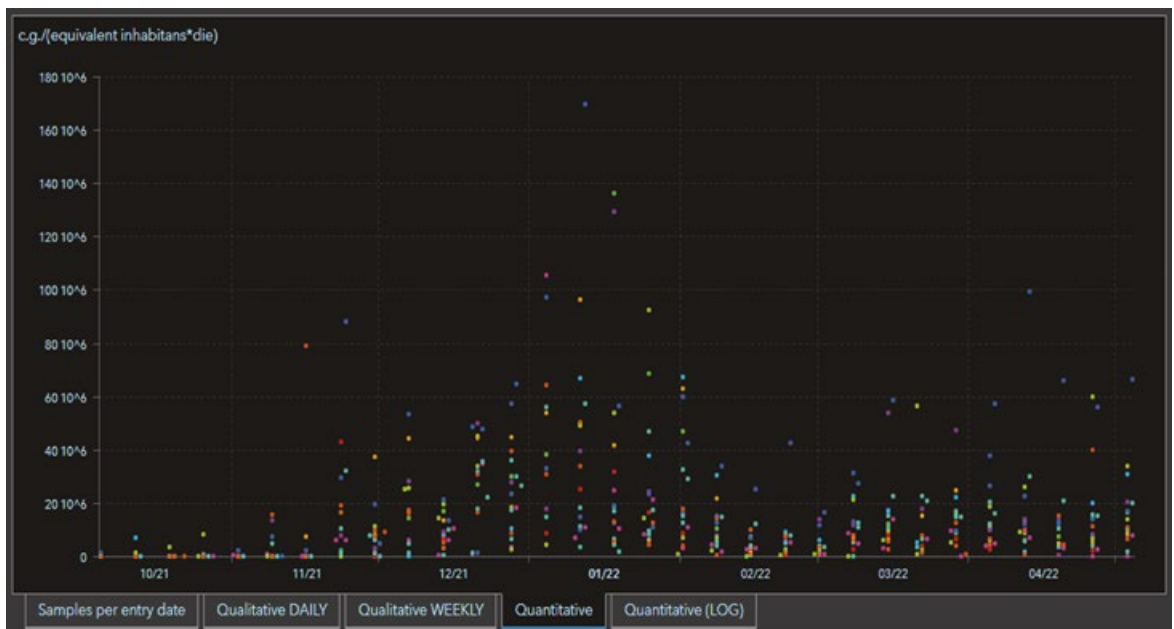
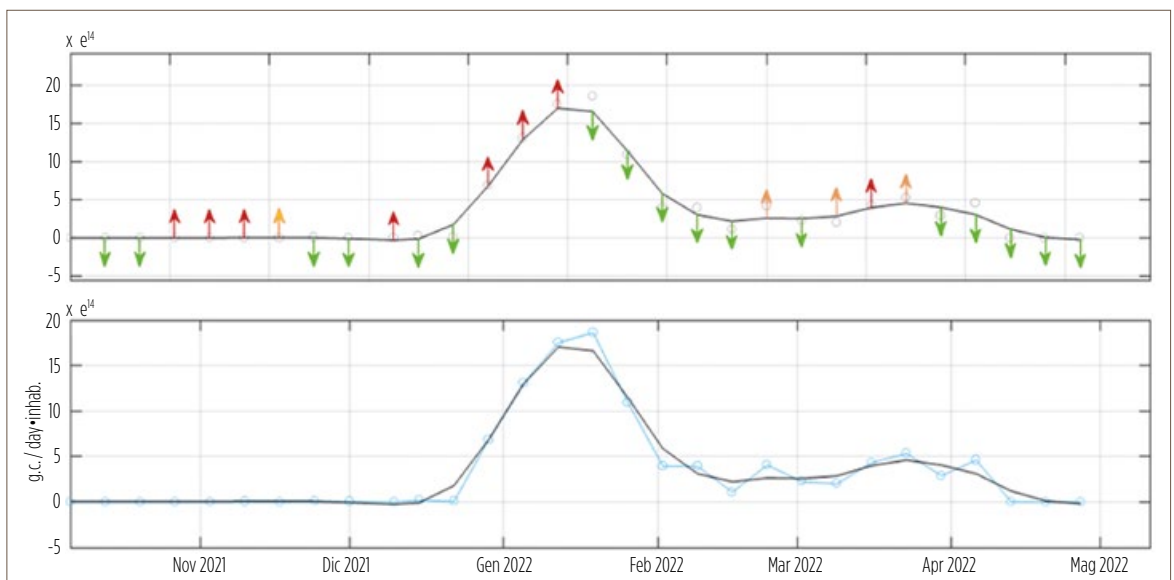


FIG. 7
ANDAMENTO
CONCENTRAZIONI

Grafico Quiver che illustra andamenti delle concentrazioni del Sars-Cov-2 da ottobre 2021.

- Dati reali
- ▲ Aumento
- ▲ Forte aumento
- ▲ Pericoloso aumento
- Stazionario
- ▼ Diminuzione



maggior parte delle regioni e province autonome, confermando l'utilità della sorveglianza ambientale come strumento complementare per seguire gli andamenti della circolazione virale nella popolazione. La sorveglianza ha inoltre permesso di descrivere il susseguirsi delle diverse varianti nell'arco del tempo, con Omicron ormai virtualmente unica variante di Sars-Cov-2 circolante nel nostro Paese, come confermato dall'indagine rapida del 4 aprile 2022, condotta dall'Istituto superiore di sanità e dal Ministero della Salute [12]. Tuttavia, i limiti nel rilevamento e nella quantificazione del Sars-Cov-2 nell'ambiente (falsi negativi o da sottostima della concentrazione dovuti alla complessità della matrice ambientale, differenze strutturali delle reti fognarie e degli impianti, tempistiche di inserimento dati ecc.) devono essere ulteriormente approfonditi. Il miglioramento dei punti sopra citati, insieme al raggiungimento di una copertura geografica uniforme, restano tra gli obiettivi primari della rete Sari affinché la sorveglianza ambientale possa essere utilizzata come strumento di supporto per i processi decisionali di salute pubblica, per aiutare a indirizzare le risposte e gli interventi mirati all'epidemia. Infine, si sottolinea che la rete di sorveglianza ambientale nazionale potrà

Periodo di campionamento	N. campioni analizzati	Varianti di Sars-Cov-2 rilevate
4-12 luglio 2021	35	Predominanza della variante Delta, rilevate anche le varianti Alfa e Beta
4-8 ottobre 2021	92	Rilevata soltanto la variante Delta, incluse le mutazioni caratteristiche del sublineage AY.4.2
01-05 novembre 2021	98	Predominanza e significativa variabilità della variante Delta. Non sono state rilevate altre VOC o VOI
30 novembre-3 dicembre 2021	123	Predominanza e significativa variabilità della variante Delta. Non sono state rilevate altre VOC o VOI
5-25 dicembre 2021 (flash survey straordinaria "Omicron")	282	Forte incremento della circolazione della variante Omicron nel periodo 05-25 dicembre: - 5-11 dicembre: 1 campione positivo su 74 (1 regione) - 12-18 dicembre: 15 campioni positivi su 108 (7 regioni) - 19-25 dicembre: 64 campioni positivi su 100 (14 regioni)
10-14 gennaio 2022	154	Predominanza e significativa variabilità della variante Omicron (con predominanza di lineage BA.1). Le mutazioni caratteristiche della variante Delta sono state rilevate soltanto in tre regioni/province autonome
7-11 febbraio 2022	153	Predominanza del sublineage BA.1; rilevato il sublineage BA.2 in quattro regioni. Le mutazioni caratteristiche della variante Delta sono state rilevate soltanto in quattro regioni
7-11 marzo 2022	153	Rilevata soltanto la variante Omicron. Le mutazioni tipiche dei sublineage BA.2, BA.1 e BA.1.1 sono state rilevate rispettivamente nel 64%, nel 4% e nel 32% dei campioni
4-8 aprile 2022	161	Rilevata soltanto la variante Omicron. Le mutazioni tipiche del sublineage BA.2 sono state rilevate nel 98% delle sequenze; le mutazioni tipiche del sublineage BA.1 sono state rilevate in un solo campione.

TAB. 2 FLASH SURVEY
Risultati delle flash survey condotte da luglio 2021.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

[1] Bonanno Ferraro G., Veneri C., Mancini P., Iaconelli M., Suffredini E., Bonadonna L., Lucentini L., Bowo-Ngandji A., Kengne-Nde C., Mbagi D.S., Mahamat G., Tazokong H.R., Ebogo-Belobo J.T., Njoum R., Kenmoe S., La Rosa G.A., 2021, "State-of-the-art scoping review on Sars-Cov-2 in sewage focusing on the potential of wastewater surveillance for the monitoring of the Covid-19 pandemic", *Food Environ Virol.*, Nov 2:1-40. doi: 10.1007/s12560-021-09498-6. Epub ahead of print. PMID: 34727334; PMCID: PMC8561373.

[2] La Rosa G., Iaconelli M., Mancini P., Bonanno Ferraro G., Veneri C., Bonadonna L., Lucentini L., Suffredini E., 2020, "First detection of Sars-Cov-2 in untreated wastewaters in Italy", *Sci Total Environ.*, Sep 20;736:139652. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139652. Epub 2020 May 23. PMID: 32464333; PMCID: PMC7245320.

[3] La Rosa G., Mancini P., Bonanno Ferraro G., Veneri C., Iaconelli M., Bonadonna L., Lucentini L., Suffredini E., 2021, "Sars-Cov-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring", *Sci Total Environ.*, Jan 1;750:141711. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141711. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32835962; PMCID: PMC7428442.

[4] "Iss, al via la rete 'sentinella' di sorveglianza epidemiologica del coronavirus nelle acque reflue", salute.gov.it.

[5] Progetto Ccm "Epidemiologia delle acque reflue: implementazione del sistema di sorveglianza per l'identificazione precoce di agenti patogeni, con particolare riferimento al Sars-Cov-2", Programma Ccm 2020, Ccm - Network.

[6] *Protocollo della sorveglianza di Sars-Cov-2 in reflui urbani (Sari)*, rev. 3, <https://doi.org/10.5281/zenodo.5758725>.

[7] Wu F., Zhang J., Xiao A., Gu X., Lee W.L., Armas F., Kauffman K., Hanage W., Matus M., Ghaeli N., Endo N., Duvallet C., Poyet M., Moniz K., Washburne A.D., Erickson T.B., Chai P.R., Thompson J., Alm E.J., 2020, "Sars-Cov-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases", *mSystems*, Jul 21;5(4): e00614-20. doi: 10.1128/mSystems.00614-20. PMID: 32694130; PMCID: PMC7566278.

[8] La Rosa G., Mancini P., Bonanno Ferraro G., Veneri C., Iaconelli M., Lucentini L., Bonadonna L., Brusaferrero S., Brandtner D., Fasanella A., Pace L., Parisi A., Galante D., Suffredini E., 2021, "Rapid screening for Sars-Cov-2 variants of concern in clinical and environmental samples using nested Rt-Pcr assays targeting key mutations of the spike protein", *Water Res.*, Jun 1;197:117104. doi: 10.1016/j.watres.2021.117104. Epub 2021 Apr 2. PMID: 33857895; PMCID: PMC8018700.

[9] La Rosa G., Iaconelli M., Veneri C., Mancini P., Ferraro G.B., Brandtner D., Lucentini L., Bonadonna L., Rossi M., Grigioni M., Sari network, Suffredini E., 2022, "The rapid spread of Sars-Cov-2 Omicron variant in Italy reflected early through wastewater surveillance", *Sci Total Environ.*, May 6:155767. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155767. Epub ahead of print. PMID: 35533857.

[10] "Covid-19: i primi 6 mesi di sorveglianza ambientale del Sars-Cov-2 raccontano l'evolversi dell'epidemia in Italia", www.iss.it.

[11] "Covid-19: analisi acque reflue conferma forte incremento Omicron tra il 5 e il 25 dicembre", www.iss.it.

[12] "Stima della prevalenza delle varianti Voc (variant of concern) e di altre varianti di Sars-Cov-2 in Italia. Prevalenza delle tre varianti Sars-Cov-2: lineage B.1.1.7, P1, in Italia", www.iss.it.

essere utilizzata per future applicazioni di sorveglianza a largo spettro, per fornire dati che considerino una vasta gamma di *marker* biologici e chimici della salute umana.

**Giuseppina La Rosa¹, Luca Lucentini¹,
Lucia Bonadonna¹, Mario Cerroni¹,
Federica Simonetti¹, Marcello Iaconelli¹,
Giusy Bonanno Ferraro¹,
Pamela Mancini¹, Carolina Veneri¹,
Lidia Orlandi¹, Claudia Del Giudice¹,
David Brandtner², Mauro Grigioni¹,
Mirko Rossi², Elisabetta Suffredini¹**

1. Istituto superiore di sanità
2. Ricercatore indipendente



FOTO: REGIONE LOMBARDA

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i partecipanti del network Sari:

- **Abruzzo:** Giuseppe Bucciarelli, Paolo Torlontano (Regione Abruzzo); Giuseppe Aprea, Silvia Scattolini, Ilaria Rosa, Daniela D'Angelantonio, Giacomo Migliorati (Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale")
- **Basilicata:** Michele La Bianca (Regione Basilicata); Rosa Anna Cifarelli, Achille Palma, Giovanna La Vecchia e Giuseppe Lauria (Arpab); Rosanna Brienza e Patrizia Montenegro (Acquedotto Lucano-Aql)
- **Calabria:** Eduardo Malacaria (Regione Calabria), Giuseppe Folino (Arpaca)
- **Campania:** Angelo D'Argenzio (Regione Campania); Luigi Cossentino, Renato Olivares (Arpac); Antonio Pizzolante, Giovanna Fusco (Istituto zooprofilattico sperimentale del Mezzogiorno); Alessandra Tosco, Amalia Porta (Università degli studi di Salerno); Francesca Pennino, Triassi Maria (Università degli studi di Napoli "Federico II")
- **Emilia-Romagna:** Paola Angelini, Lisa Gentili (Regione Emilia-Romagna); Laura De Lellis, Daniele Nasci (HeraTech); Giovanni Alborali; Nicoletta Formenti, Flavia Guarneri (Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna); Nadia Fontani, Giulia Nani, Franca Palumbo, Gianluca Borlone, Marco Guercio (Iren)
- **Friuli Venezia Giulia:** Marika Mariuz, Gabriella Trani (Direzione centrale Salute Fvg); Anna Pariani (Laboratorio HertaTech di Sasso Marconi, BO)
- **Lazio:** Carla Ancona (Dep Lazio, Dipartimento di epidemiologia del Servizio sanitario regionale, Regione Lazio); Alessandra Barca, Flavia Serio (Regione Lazio); Doriana Antonella Giorgi, Irene Ferrante, Monica Monfrinotti, Silvia Riosa, Valeria Capparuccini (Arpa Lazio); Maria Teresa Scicluna, Antonella Cersini (Izslt, Istituto zooprofilattico sperimentale del Lazio e della Toscana); Mariaconcetta Arizzi, Giancarlo Cecchini, Claudio Ottaviano (Acea Elabori)
- **Liguria:** Elena Nicosia (Regione Liguria, settore tutela della salute negli ambienti di vita e di lavoro); Nadia Fontani, Giulia Nani, Franca Palumbo, Gianluca Borlone, Marco Guercio (Iren); Elena Grasselli; Giorgia Allaria, Lorenzo Dondero, Francesca Rispo (Unige, Distav); Alberto Izzotti (Unige, Dimes); Rosa Maria Bertolotto, Elena Nicosia, Stefano Rosatto, Marta Bellisomi, Irene Tomesani (Arpal); Micaela Tiso (Micamo srl)
- **Lombardia:** Emanuela Ammoni, Danilo Cereda (Regione Lombardia); Marina Nadia Losio, Barbara Bertasi (Izslser, Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna); Desdemona Oliva, Maria Giovanna Guiso, Fabio Ferrari, Maria Mundo, Antonino Martines (Cap Holding); Sara Castiglioni, Silvia Schiarea, Ettore Zuccato (Istituto Mario Negri Irccs); Manuela Antonelli, Arianna Azzellino, Francesca Malpei, Andrea Turolla (Polimi); Sandro Binda, Pellegrinelli Laura, Valeria Primache (Università degli studi di Milano, Dipartimento di Scienze biomediche per la salute), Clementina Cocuzza, Andrea Franzetti, Rosario Musumeci, Marianna Martinelli (Università di Milano-Bicocca); Giorgio Bertanza (Università di Brescia), Maria Luisa Callegari (Università Cattolica del Sacro Cuore)
- **Marche:** Luigi Bolognini, Fabio Filippetti (Regione Marche);

- Marta Paniccià, Francesca Ciuti, Sara Briscolini (Izsum, Istituto zooprofilattico sperimentale Umbria e Marche); Silvia Magi (Arpam)
- **Molise:** Michele Colitti (Regione Molise); Carmen Montanaro (Asrem); Giuseppe Aprea, Silvia Scattolini, Ilaria Rosa, Daniela D'Angelantonio, Giacomo Migliorati (Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"); Maria Grazia Cerroni (Arpa Molise);
- **Piemonte:** Bartolomeo Griglio, Renza Berruti, Mauro Cravero, Angela Costa (Regione Piemonte); Manila Bianchi, Lucia Decastelli; Angelo Romano; Clara Tramuta (Izsto, Istituto zooprofilattico sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, SC Sicurezza e qualità degli alimenti); Elisabetta Carraro, Cristina Pignata (Dipartimento di Scienze della sanità pubblica e pediatriche, Università di Torino), Silvia Bonetta, Lisa Richiardi (Dipartimento di Scienze della vita e biologia dei sistemi, Università di Torino)
- **Puglia:** Giuseppe Di Vittorio, Onofrio Mongelli (Regione Puglia); Osvalda De Giglio, Francesca Apollonio, Francesco Triggiano, Maria Teresa Montagna (Università degli studi di Bari Aldo Moro, Dipartimento interdisciplinare di Medicina); Nicola Ungaro (Arpa Puglia)
- **Sicilia:** Mario Palermo (Regione Sicilia); Carmelo Massimo Maida, Walter Mazucco (Università degli studi di Palermo, Dipartimento Promise, sezione di Igiene); Simona De Grazia, Giovanni Giammanco (Centro di riferimento regionale per la sorveglianza delle paralisi flaccide acute (PFA) e ambientale della circolazione di poliovirus in Sicilia, Aoup Palermo); Giuseppa Purpari (Izs, Istituto zooprofilattico sperimentale della Sicilia); Margherita Ferrante; Antonella Agodi, Martina Barchitta (Università degli studi di Catania, Dipartimento "G.F. Ingrassia");
- **Toscana:** Piergiuseppe Calà (Regione Toscana); Annalaura Carducci, Marco Verani, Ileana Federigi, Giulia Lauretani, Sara Muzio (Laboratorio di igiene e virologia ambientale, Dipartimento di Biologia, Università di Pisa); Matteo Ramazzotti (Dipartimento di Scienze biomediche sperimentali e cliniche, Università degli studi di Firenze), Alberto Antonelli (Sod microbiologia e virologia, Azienda ospedaliera universitaria Careggi, Firenze)
- **Umbria:** Giovanni Santoro (Regione Umbria), Ermanno Federici, Maya Petricciuolo, Sofia Barigelli (Laboratorio Microbiologia applicata e ambientale, Dcbb Università di Perugia)
- **Valle d'Aosta:** Mauro Ruffier (Regione Valle d'Aosta); Francesca Borney, Eric Grange, Florida Damasco (Laboratorio chimico biologico microbiologico Arpa Valle d'Aosta)
- **Veneto:** Francesca Russo, Gisella Pitter, Vanessa Groppi (Regione Veneto); Franco Rigoli, Marco Zampini (Arpav); Tatjana Baldovin, Irene Amoroso (Università di Padova)
- **Provincia autonoma di Bolzano:** Lorella Zago (P.A. Bolzano); Alberta Stenico, Anna-Maria Prast (Appa Bolzano, Laboratorio biologico)
- **Provincia autonoma di Trento:** Francesco Pizzo; Alessandra Schiavuzzi, Elena Mengon (P.A. Trento); Maria Cadonna, Mattia Postinghel (Adep Sgi Pat), Francesca Cutrupi, Paola Foladori, Serena Manara (Università di Trento).

Si ringrazia inoltre **Giuseppe Bortone**, direttore generale di Arpae Emilia-Romagna, per il supporto alle attività della sorveglianza.