

I LABORATORI PER L'AMBIENTE

Esperienze e innovazione nelle Agenzie ambientali

I laboratori delle Agenzie ambientali negli ultimi anni, hanno attraversato un profondo cambiamento che ne ha trasformato l'organizzazione e le metodologie di indagine. Questa evoluzione non è solo un'ordinaria conseguenza del progresso tecnologico o dell'impulso normativo, ma è soprattutto una risposta urgente e mirata alle nuove, complesse sfide che minacciano la salute pubblica e i nostri ecosistemi. Ne consegue che anche la professionalità degli operatori impegnati nelle attività ha avuto un impulso alla crescita.

Oggi, i laboratori sono in prima linea su fronti critici come la sorveglianza dei virus e dei batteri antibiotico-resistenti, la mappatura delle molecole di antibiotici nelle acque superficiali e reflue, e l'analisi della crescente minaccia delle

microplastiche, l'analisi di nuove sostanze che la normativa inserisce tra quelle da monitorare.

Questo slancio innovativo è stato potenziato e accelerato grazie anche a progetti specifici finanziati dai fondi europei, in particolare quelli del Pnrr.

Nelle prossime pagine illustriamo alcune di queste trasformazioni in corso.

Si parte con un focus dettagliato sul Laboratorio multisito di Arpae, per comprendere come l'Agenzia dell'Emilia-Romagna abbia declinato il processo evolutivo.

Successivamente, riportiamo alcune esperienze significative attuate in altre regioni d'Italia, con i contributi delle Arpa Piemonte, Valle d'Aosta, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Liguria, Sardegna e di Appa Bolzano.

L'EVOLUZIONE DEL LABORATORIO MULTISITO ARPAE

I FREQUENTI AGGIORNAMENTI NORMATIVI RICHIEDONO UNA REVISIONE CONTINUA DELLE PROCEDURE ANALITICHE E UN RINNOVAMENTO COSTANTE DELLA STRUMENTAZIONE. NEGLI ULTIMI ANNI IL TURN-OVER DI STRUMENTI AVANZATI È STATO GARANTITO SOPRATTUTTO GRAZIE AI FINANZIAMENTI DEL PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA.

LABORATORI



Il Laboratorio multisito di Arpa, supportando con le proprie analisi chimiche, microbiologiche ed ecotossicologiche tutte le attività di monitoraggio e di vigilanza effettuate dagli organi di controllo sia in campo ambientale (la stessa Arpa, oltre che Carabinieri forestali e Noe ecc.) sia in ambito di sanità pubblica e prevenzione collettiva (Ausl), è di fatto tenuto a mettere a punto le procedure analitiche richieste per le determinazioni degli inquinanti e contaminanti indicati dalle varie normative sanitarie e ambientali. Inoltre, per il laboratorio multisito, è fatto obbligo conseguire (in particolare per alcune matrici quali alimenti di origine vegetale e acque potabili) l'accreditamento secondo la norma Iso/Iec 17025:2018 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura", che garantisce la produzione di risultati analitici tecnicamente validi e affidabili.

I frequenti aggiornamenti delle normative in campo ambientale e sanitario, non sempre coordinate e omogenee tra loro e che modificano il quadro delle possibili richieste analitiche in materia di controlli, sia come tipologia

di inquinanti sia di limiti di rilevabilità degli stessi (è il caso, ad esempio, della recente introduzione della ricerca di Pfas in acque potabili), impongono al laboratorio un'attenta valutazione e revisione delle proprie procedure analitiche per valutarne l'adeguatezza rispetto alle mutate richieste legislative. Particolare attenzione deve essere pertanto dedicata, oltre che alla formazione specifica degli operatori di laboratorio, anche all'aggiornamento continuativo del parco strumentale in dotazione.

Per garantire costantemente la qualità del servizio analitico fornito, il Laboratorio multisito di Arpa, in accordo con la Direzione tecnica, pianifica e presidia regolarmente gli investimenti e i noleggi operativi relativi alle apparecchiature scientifiche di analisi ambientale, aggiornando la dotazione tecnica presente all'interno dei laboratori, compatibilmente con le risorse economiche messe a disposizione. La dotazione tecnica del laboratorio multisito di Arpa consiste in apparecchiature specifiche per analisi biologiche e microbiologiche e in apparecchiature di complessità diversificata (bassa, media, alta e altissima

complessità) per le analisi chimiche ambientali e sanitarie di competenza tra cui, ad esempio: cromatografi ionici, Icp-Oes e Icp-Ms, microscopi ottici e microscopi elettronici a scansione (Sem), diffrattometri Rx, cromatografi liquidi (Hplc e Hplc/Ms) e gascromatografi (Gc/Ms e Gc/Ms/Ms) accoppiati a spettrometri di massa anche ad alta risoluzione, sistemi robotizzati di preparazione campioni e analisi.

Raramente le risorse economiche a disposizione consentono una completa pianificazione degli investimenti a lungo termine e per questo motivo, negli ultimi anni, il turn-over di alcune strumentazioni particolarmente costose è stato garantito attraverso la definizione di contratti di noleggio a lungo termine comprensivi di manutenzione *full-risk*. È il caso, ad esempio, degli Icp-Ms per la determinazione di metalli (installati nelle sedi di Bologna, Reggio Emilia e Ravenna ed è in previsione un'analoga procedura per acquisire Icp-ottici per le sedi di Bologna e Ravenna), di cromatografi ionici (sedi di Bologna e Ravenna), estrattore Spe (sede di Ravenna) e Lc-Ms/Ms (sedi di Ferrara, Bologna e Ravenna).

Fonte finanziamento	Strumentazioni acquisite
Pnrr 2022	1 Gc-Ms/Ms triplo con autocampionatore multifunzione (RE) 1 Gc-Ms con autocampionatore per liquidi e pirolizzatore (RE) 1 microscopio confocale con spettrometro Raman (RE) 1 titolatore automatico per determinazione ossidabilità (RE) 1 Hplc/Uv (RE) 3 cappe biohazard (RE, BO)
Pnrr 2023	6 cromatografi ionici di cui 3 per CrVI (RA-BO-RE) 8 Gc-Ms con autocampionatori (BO-RE-RA) 3 Gc-Ms-Ms con zutocampionatori (BO-FE-RA) 6 bilance tecniche/analitiche (a 2, 4 e 5 cifre decimali) (RA-FE-RE) 30 frigo/freezer per sportelli e laboratori (tutte le sedi) 1 congelatore -80° (BO) 4 lavavetreria (RE-BO-RA-FE) 13 cappe chimica/microbiologia (BO-RE-RA-PC) 8 sonde termometriche primarie 1 sistema unico di rilevazione in continuo t° frigo /freezer (tutte le sedi) 2 analizzatori per cianuri (BO-RE) 2 titolatori automatici: (BO-RA) 1 pressa per la preparazione di provini da analisi (RE) 3 mulini macinazione campioni solidi (BO-RE-RA) 1 microscopio elettronico a scansione Sem (RE) 1 diffrattometro Rx (RE) 1 analizzatore da banco Xrf (RA) 4 generatori gas (aria, azoto, idrogeno) (BO-RE-RA) 4 adeguamenti linee gas tecnici (RE-BO-RA-PC) 3 sistemi produzione acqua pura (RE-RA-FE) 5 microscopi ottici o stereomicroscopi (BO-RE-FE-RA) 1 sistema analitico completo Cov con Canister (RA) 3 robot per analisi acque con kit Hach Lange (RA-RE-BO) 1 analizzatore Ec/Oc (RA) 1 sistema automatico di estrazione Spe Dex (RA) 1 implementazione strumenti per analisi isotopica (PC) 13 conduttimetri e/o pHmetri (RE-BO-PC-RA-FE) 1 autoclave (RA) 1 sistema agitazione quechers (FE) 1 sistema macinazione prodotti vegetali (FE) 2 campionatori aria microbiologia (RA-FE) 1 cabina climatizzata per pesatura filtri (RE) 2 analizzatori Toc/In (RA-RE) 1 lettore Lonza (FE) 1 analizzatore microtox (RA) 3 spettrofotometri Uv e Ir (RA) 6 evaporatori manuali e automatici (BO-RE-RA-FE) 12 incubatori microbiologia (BO-RA-RE-FE) - refrigeratori, vasche e accessori fauna ittica (ecotossicologia FE) - lampade filtranti, pompe, imbuti (PC-RE-BO-RA-FE) - termostati, bagni ultrasuoni, centrifughe, agitatori, micropipette, mineralizzatori, turbidimetri, digestori, stufe (PC-RE-BO-RA-FE)
Altri progetti regionali e finanziamenti Arpae	1 spettrofotometro Uv-Vis a doppio raggio da banco (RA) 1 granulometro per suoli, fanghi, sedimenti e rifiuti (RA) 2 evaporatori manuali e automatici (RA) 1 liofilizzatore (RA) 1 estrattore Ase (RA); 1 Gc-Ms singolo quadrupolo (RA) 1 adeguamento Sw e Hw di linea analisi cationica (RA)

TAB. 1 STRUMENTI ACQUISITI E INSTALLATI DAL LABORATORIO MULTISITO DI ARP AE

Nell'ultimo quinquennio, a seguito dell'emergenza Covid-19 e la conseguente adozione del Piano nazionale di ripresa e resilienza (Pnrr) e del Piano nazionale complementare (Pnc), la Regione Emilia-Romagna ha messo a disposizione di Arpae consistenti finanziamenti per implementare e potenziare il sistema dei controlli ambientali, con particolare

riferimento al supporto analitico in tema di prevenzione ambientale e sanitaria, prevedendo una prima quota di finanziamenti di circa 640.000 euro nel 2022 e di circa 5,3 milioni di euro nel 2023. Tali finanziamenti sono serviti ad attivare circa 60 tra gare europee, procedure d'appalto e affidamenti diretti, da concludere in tempi contingentati

(pena il decadimento dei finanziamenti) e tutti portati a termine positivamente: essi hanno consentito di rinnovare buona parte del parco strumentale del Laboratorio multisito, generalmente datato e, in alcuni casi, non adeguato alle prestazioni richieste dalle nuove normative. La *tabella 1* riassume gli strumenti acquisiti e installati nelle diverse sedi del Laboratorio multisito.

L'evoluzione del Laboratorio multisito ha poi visto il completo trasferimento del laboratorio di Ravenna in una nuova sede più moderna e funzionale (trasloco concluso definitivamente a gennaio 2025, con la reinstallazione di tutta la strumentazione funzionante), caratterizzata da spazi adeguati e con impiantistica tecnica nuova, tra cui 48 nuove cappe, oltre a 11 cappe recuperate dalla vecchia sede.

Inoltre, nella sede di Reggio Emilia, sono stati fatti adeguamenti impiantistici che hanno consentito la creazione di un laboratorio da dedicare all'analisi di microplastiche.

Il consistente rinnovamento tecnologico determinato dai molteplici investimenti nel Laboratorio multisito ha consentito il generale consolidamento e l'implementazione delle attività analitiche realizzate nelle sedi laboratoristiche, sia quelle effettuate su più sedi (ad esempio: acque reflue e acque di monitoraggio, analizzate a Ravenna, Bologna e Reggio Emilia), sia quelle più specialistiche, concentrate su un numero limitato di sedi o su singoli laboratori: è il caso, ad esempio, delle analisi su matrici acquose sanitarie (Bologna e Reggio Emilia) o per la ricerca di amianto (Reggio Emilia), microinquinanti organici (Ravenna), ecotossicologia (Ravenna e Ferrara), residui di fitofarmaci (Ferrara) e analisi isotopiche (Piacenza).

Di seguito si descrivono le attività specialistiche di maggiore rilevanza realizzate nel Laboratorio multisito.

Acque potabili, minerali, termali, piscine (Bologna e Reggio Emilia)

I laboratori di Bologna e Reggio Emilia sono stati individuati per dare risposta alle strutture sanitarie relativamente alle richieste analitiche di tipo chimico e microbiologico su acque potabili, minerali, termali e piscine di tutto il territorio regionale. Tra le attività analitiche a supporto del controllo igienico sanitario delle acque, effettuato dalle Ausl della Regione, si inseriscono

anche (oltre alle analisi chimiche e microbiologiche consolidate e richieste dalle norme): il conteggio di fibre di amianto totali, la determinazione di microinquinanti organici persistenti (ad esempio diossine, Pcb, Ipa ecc.), la determinazione di residui di fitofarmaci e Pfas. I laboratori di Reggio Emilia e Bologna sono stati individuati dalla Regione (Dgr n. 828 del 2017) come laboratori di riferimento per la ricerca di legionella. Grazie al personale e alle strutture altamente qualificate vengono analizzati campioni sanitari e ambientali, operando in stretta collaborazione con il Laboratorio nazionale di riferimento al quale vengono inviati, quando richiesto, i ceppi di legionella isolati in caso di cluster o focolaio epidemico. Il laboratorio esegue inoltre le analisi su acque minerali e termali ai sensi del Dm 10/02/2015 e ai fini della verifica delle caratteristiche proprie dell'acqua minerale naturale.

Residui di fitofarmaci (Ferrara)

Il laboratorio di Ferrara è specializzato nella determinazione di residui di fitofarmaci in tutte le matrici ambientali solide (principalmente suoli e sedimenti), nelle acque di origine sanitaria e ambientale (superficiali, sotterranee, transizione, potabili, minerali, termali ecc.) e negli alimenti freschi e trasformati di origine vegetale. Inoltre svolge attività di controllo sui prodotti fitosanitari e biocidi destinati alla commercializzazione per la verifica del titolo della sostanza attiva in essi contenuta.

Analisi di ecotossicologia (Ravenna e Ferrara)

Nei laboratori di Ravenna e Ferrara, e in parte presso quello di Reggio Emilia, vengono eseguiti test ecotossicologici con differenti organismi test. La disponibilità di questi organismi, in forma di kit o di allevamento, consente di poter valutare l'ecotossicità di matrici sia solide sia liquide (ambienti di acqua dolce, di transizione e marini). Ai sensi della normativa vigente, vengono eseguiti i saggi ecotossicologici necessari alla classificazione HP14 dei rifiuti e quelli richiesti dalla normativa Reach e Clp per le sostanze e le miscele.

Presso il laboratorio di Ferrara è presente un impianto di stabulazione per i pesci, autorizzato dal Ministero della Salute, necessario all'esecuzione dei test



ecotossicologici con forme giovanili ed embrionali; allo stato attuale è uno dei pochi impianti di questo tipo che si trovano all'interno del Snpa.

Organizzazione di circuiti interlaboratorio (Ravenna e Ferrara)

Il laboratorio di Ferrara è accreditato secondo la norma Iso 17043 come organizzatore di circuiti interlaboratorio sulla matrice ortofrutta per la determinazione di residui di fitofarmaci. I circuiti interlaboratorio, noti anche come *proficiency test* (Pt), sono dei programmi in cui diversi laboratori partecipano in modo volontario analizzando gli stessi campioni e confrontando i risultati ottenuti al fine di verificare la loro affidabilità nel fornire risultati analitici e dimostrare la competenza tecnica in vista di richieste

da parte dell'ente accreditante o dei loro clienti.

Anche il laboratorio di Ravenna, dal 2007, organizza un Pt sui test ecotossicologici riguardante i principali saggi utilizzati in Italia. Inizialmente limitata alle sole Agenzie, la partecipazione è stata estesa anche a università, istituti di ricerca e laboratori privati, italiani ed esteri. Annualmente sono effettuate 1 o 2 sessioni, inserendo periodicamente nuovi saggi; è l'unico interconfronto in Italia che propone il test di immobilizzazione con *Daphnia magna* previsto dal Dlgs 152/2006. La partecipazione media annuale è di 60/70 laboratori. Nel 2024 è iniziata la fase preparatoria all'accreditamento Iso 17043 del Pt: questo percorso, che ha interessato differenti servizi dell'Agenzia, è proseguito con la visita ispettiva di ottobre 2025 da parte dell'ente certificatore.

Analisi microinquinanti (Ravenna)

L'Unità Microinquinanti organici del laboratorio di Ravenna rappresenta il riferimento regionale per la determinazione di una serie di composti chimici riconducibili a inquinanti organici persistenti (diossine, Pcb, Ipa), ritardanti di fiamma e altre sostanze che a causa della loro particolare tossicità rappresentano un pericolo per la salute anche a livelli di concentrazione estremamente bassi. Per la loro determinazione, in conformità ai limiti richiesti dalle normative, è necessaria una fase di preparazione e purificazione del campione particolarmente laboriosa seguita dall'analisi che richiede strumentazione complessa dedicata, come ad esempio la gascromatografia abbinata a spettrometria di massa ad alta risoluzione, e standard analitici particolarmente costosi, ad alta purezza o isotopicamente arricchiti.

Analisi amianto (Reggio Emilia)

Il laboratorio di Reggio Emilia accoglie il laboratorio di riferimento regionale per la determinazione dell'amianto, processando tutti i campioni su scala regionale per questa specifica analisi. Vengono analizzate matrici ambientali quali aria, suolo, rifiuti, materiali di varia tipologia (di natura cementizia, isolanti, guaine, colle, pavimentazioni, etc.) e acque di vario tipo (potabili,

sotterranee ecc). Il laboratorio dispone di strumentazione all'avanguardia e di ultima generazione per l'applicazione di tutte le tecniche analitiche previste dalle norme in vigore in materia di amianto (microscopio elettronico a scansione Sem Feg + Edx, microscopio elettronico a scansione Sem + Edx, diffrattometro a raggi X, stereomicroscopi con telecamera, microscopio ottico con contrasto di fase e luce polarizzata).

Vengono inoltre effettuate analisi su fibre artificiali vetrose ai fini della caratterizzazione e della relativa pericolosità, e su polveri per la determinazione della silice libera cristallina. Oltre all'attività analitica, il laboratorio collabora con il Ministero della Salute per la qualificazione dei laboratori privati dell'Emilia Romagna che effettuano analisi sull'amianto e dei soggetti che si occupano del campionamento di fibre aerodisperse.

Analisi microplastiche (Reggio Emilia)

Il laboratorio di Reggio Emilia sta attivando una linea di ricerca analitica dedicata alla determinazione delle microplastiche nelle acque, dato il loro inserimento nell'elenco di controllo delle acque destinate al consumo umano. Considerate "inquinanti emergenti", questa categoria di molecole ha un notevole impatto sull'ambiente, anche se attualmente non sono incluse nei programmi di monitoraggio delle acque. La recente strumentazione acquisita dal

laboratorio è in linea con le più sensibili tecniche fino a ora studiate e indicate per la caratterizzazione delle microplastiche nelle acque (microscopio confocale Raman e Gc-MS con pirolizzatore). Il laboratorio è inserito nel gruppo di lavoro di esperti che sta ultimando i lavori sulla metodica ufficiale relativa alle acque potabili, che sarà pubblicata dall'ente di normazione internazionale (Iso).

Analisi Pfas (Ravenna e Ferrara)

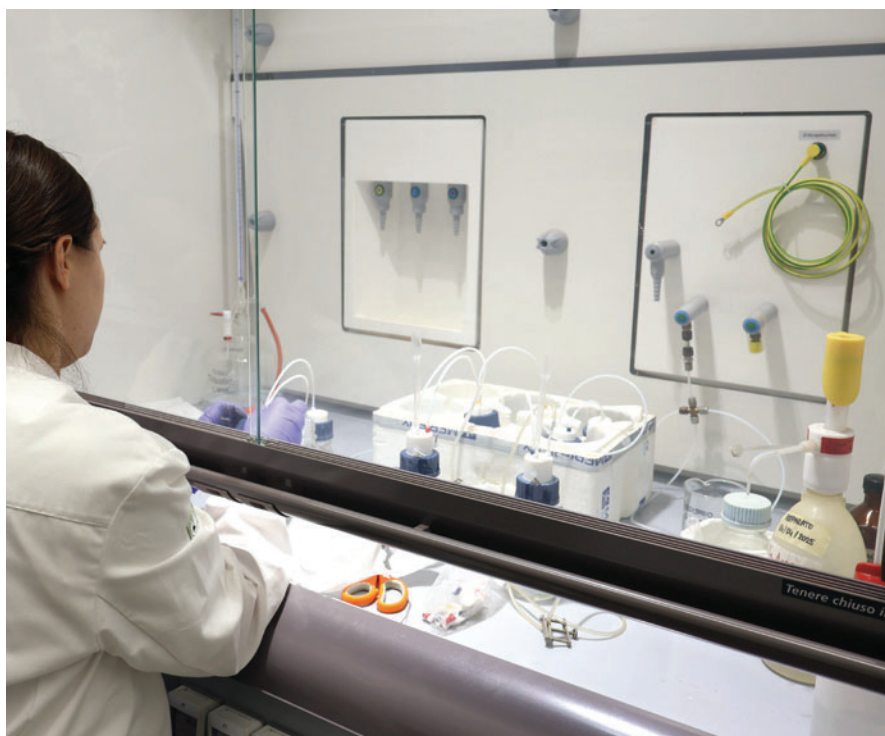
I laboratori di Ravenna e Ferrara eseguono analisi di Pfas (composti perfluoroalchilici, sostanze soprannominate *forever chemicals* a causa delle caratteristiche di notevole stabilità chimica e che rende praticamente impossibile la loro degradazione nell'ambiente) in matrici acquose e nel biota. Il controllo di tali sostanze viene svolto tramite l'analisi in spettrometria di massa abbinata alla cromatografia liquida. Questo tipo di strumentazione è largamente utilizzata presso il laboratorio di Ferrara che ha introdotto l'analisi dei Pfas specializzandosi sulle matrici liquide (acque ambientali e potabili), mentre il laboratorio di Ravenna, attraverso l'impiego della medesima tecnologia, è riferimento per le matrici solide, in particolare per il biota che a causa del bioaccumulo nei tessuti, rappresenta un indicatore della contaminazione nell'ambiente e il cui monitoraggio è previsto dal Testo unico ambientale.

Analisi isotopiche (Piacenza)

Presso la sede laboratoristica di Piacenza si eseguono analisi isotopiche per la determinazione del rapporto isotopico O^{18}/O^{16} e H^2/H^1 nelle acque sotterranee, allo scopo di ricostruirne l'origine (naturale, fertilizzanti inorganici o organici ecc.) e le variazioni nei siti di ricarica delle falde acquifere. Come ulteriore elemento di indagine, sempre nella matrice acquosa, è in corso lo sviluppo della metodologia per la determinazione del rapporto isotopico di azoto e di ossigeno nei nitrati.

Stefano Forti, Mario Polidoro, Michele De Gioia

Laboratorio multisito, Arpa Emilia-Romagna
1. Responsabile
2. Responsabile area laboratoristica Reggio Emilia-Bologna
3. Responsabile area laboratoristica Ravenna-Ferrara



LA STRUTTURA DEL LABORATORIO MULTISITO ARPAE

PRESENTE FIN DALL'AVVIO DELL'AGENZIA, IL LABORATORIO DI ARPAE È UN ELEMENTO ESSENZIALE PER LE ATTIVITÀ DI VIGILANZA E MONITORAGGIO AMBIENTALE. LA STRUTTURA SI È EVOLUTA NEL TEMPO PER ADEGUARSI AI CAMBIAMENTI TECNOLOGICI E ORGANIZZATIVI, POTENZIARE LE SEDI E CONSOLIDARE LE SPECIALIZZAZIONI.

Le analisi chimiche e microbiologiche di laboratorio da sempre costituiscono un supporto fondamentale per le attività di vigilanza e controllo sia in ambito ambientale sia sanitario. Fin dalla sua nascita con la Lr 44/1995, Arpa Emilia-Romagna (nel 1995 era Arpa Emilia-Romagna) è stata caratterizzata da una struttura laboratoristica solida e ben integrata sia con i servizi di vigilanza e di monitoraggio ambientale della stessa agenzia (Servizio territoriale - St e Servizio sistemi ambientali - Ssa), sia con i servizi delle Ausl dedicati alla salute pubblica, prevenzione collettiva e medicina del lavoro, sia con altri corpi di vigilanza che operano in campo ambientale (Carabinieri Forestali, Noe ecc.). La struttura del laboratorio Arpa ha subito nel tempo, a partire dalla sua nascita nel 1995, una serie di modifiche organizzative rese necessarie dal mutato contesto istituzionale e normativo, oltre che dalla ricerca continua di efficientamento delle attività e di sostenibilità economica. La struttura laboratoristica disegnata dalla L 44/95 prevedeva, infatti, una sede in ogni provincia, in linea con il passaggio automatico di tutte le strutture e il personale dei Presidi multizonali di prevenzione delle Ausl provinciali.

I successivi accordi regionali sulla suddivisione delle attività analitiche per campioni ambientali, sanitari e alimentari tra Arpa e Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna hanno portato a individuare un'ottimale organizzazione per Arpa che prevedeva un numero ridotto di sedi laboratoristiche e l'accentramento di attività analitiche specialistiche su alcune di esse. A seguito di tali accordi, le attività analitiche sui campioni per alimentazione umana e animale sono stati trasferiti ai laboratori dell'Istituto zooprofilattico sperimentale, mentre ad Arpa sono rimaste le



competenze analitiche relative agli altri campioni riferiti a controlli sulla prevenzione collettiva (acque, aria), medicina del lavoro (ambienti di lavoro), controlli in ambito Reach (regolamento europeo sulla registrazione e valutazione delle sostanze chimiche) e residui di fitofarmaci negli alimenti di origine vegetale freschi e trasformati. Il processo evolutivo ha avuto una durata di alcuni anni, nei quali si è operato per potenziare le sedi laboratoristiche da mantenere e consolidare le attività specialistiche, sia in termini di risorse umane sia strumentali. Nel maggio 2017, infine, è divenuta operativa l'attuale organizzazione del Laboratorio multisito di Arpa, in cui tutte le sedi operative fanno capo a una direzione unica, diversamente da prima in cui ogni sede aveva un proprio direttore.

Il Laboratorio multisito propriamente detto comprende:

- le sedi di laboratorio principali di Reggio Emilia, Bologna, Ferrara e Ravenna e la sede decentrata di Piacenza, raggruppate in due aree laboratoristiche (la prima con i laboratori di Ravenna e Ferrara e la seconda con i laboratori di Bologna, Reggio Emilia e Piacenza) ognuna delle quali fa capo a un unico dirigente responsabile
 - 9 sportelli di accettazione e refertazione campioni, confluiti sotto la direzione del Laboratorio multisito, localizzati presso le sedi di Piacenza, Parma, Reggio Emilia, Modena, Bologna, Ferrara, Ravenna, Forlì, Rimini, ognuno con un proprio referente.
- La rete laboratoristica di Arpa, in realtà, comprende anche altre strutture dotate di laboratori dedicati, che sono però

alle dipendenze di servizi diversi dal Laboratorio multisito:

- il Centro tematico regionale agenti fisici, localizzato presso la sede di Piacenza
- il laboratorio olfattometrico del Presidio tematico regionale (Ptr) delle emissioni industriali localizzato presso la sede di Modena
- la Struttura oceanografica Daphne localizzata a Cesenatico, dotata di un proprio sportello accettazione
- la Struttura tematica ambiente prevenzione e salute, localizzata presso la sede del Laboratorio multisito di Bologna.

Ogni sede di Laboratorio multisito si articola, di norma, in più unità analitiche definite in base alle matrici/analisi di competenza e presidia su scala regionale o pluriprovinciale le diverse fasi del processo analitico, dall'accettazione del campione fino all'emissione del rapporto di prova, operando nel rispetto delle norme tecniche di settore e in conformità alla norma Uni Cei En Iso 17025:2018 oltre che ai sensi della norma Uni Cei En Iso 17043:2023 (laboratorio di Ferrara e di Ravenna).

Ogni sede, inoltre, presidia il buon funzionamento delle apparecchiature in dotazione e gestisce le chiamate relative alle manutenzioni necessarie.

La gestione complessiva del Laboratorio multisito è attuata mediante una struttura dirigenziale che prevede, alle dipendenze del direttore del laboratorio, i dirigenti responsabili delle due aree laboratoristiche e quattro dirigenti tecnici (chimici e biologi) per il presidio delle attività analitiche delle sedi. I dirigenti tecnici sono poi supportati da 15 collaboratori con incarico di funzione, ognuno dei quali presidia l'attività di una specifica unità operativa.

Dal punto di vista operativo, il numero di campioni conferito annualmente dagli organi di controllo e monitoraggio di Arpae, Ausl e altri organi di vigilanza, alla rete laboratoristica di Arpae, si è attestata da qualche anno, successivamente alla emergenza Covid-19 del 2020, su circa 50.000-55.000 campioni. Poiché, come vedremo di seguito, alcune determinazioni analitiche specifiche vengono eseguite solo in determinati laboratori, è relativamente frequente il caso in cui un campione generi attività analitica per più laboratori, il che si traduce in un numero di aliquote che arrivano ai laboratori superiore al numero di campioni e generalmente comprese tra 60.000 e 65.000.

Per razionalizzare le risorse e concentrare competenze tecniche e dotazioni

strumentali sulle sedi più coinvolte nelle specifiche analisi chimiche e microbiologiche, alcune delle attività analitiche vengono effettuate su più sedi mentre altre (più specialistiche) solo su un numero limitato di sedi o su singoli laboratori: è il caso, ad esempio, delle analisi su matrici acquose sanitarie (Bologna e Reggio Emilia) o per la ricerca di amianto (Reggio Emilia), microinquinanti organici (Ravenna), ecotossicologia (Ravenna e Ferrara), residui di fitofarmaci (Ferrara) e analisi isotopiche (Piacenza).

Nell'organizzazione di una ragionevole suddivisione dei campioni tra le sedi laboratoristiche, si è considerata la

numerosità e la provenienza territoriale dei campioni su cui svolgere le attività analitiche, la presenza o meno di consulenti di parte ad assistere alle analisi (che implica un maggiore impegno di risorse umane), la logistica ottimale dei trasporti e la necessità di garantire i tempi di analisi previsti per legge oltre alla corretta conservazione dei campioni fino all'inizio dei procedimenti analitici.

Stefano Forti

Responsabile Laboratorio multisito, Arpae Emilia-Romagna

Campioni di	Prelevati da	Sede di Laboratorio che esegue l'attività analitica
Acque potabili, minerali, termali, piscine, acque sanitarie, dialisi	Ausl e altri servizi sanitari regionali	Bologna: campioni da Mo - Bo - Fc - Ra - Fe - Rn Reggio Emilia: campioni da Pc - Pr - Re - Mo
Alimenti di origine vegetale per analisi fitofarmaci	Ausl e altri enti di vigilanza	Ferrara: campioni da tutta la regione
Matrici ambientali e sanitarie per analisi fitofarmaci	Arpae, Ausl e altri enti di vigilanza	Ferrara: campioni da tutta la regione
Ambienti di vita e di lavoro, Immissioni (composti organici volatili)	Ausl e altri servizi sanitari regionali	Ravenna: campioni da Fc - Ra - Rn Reggio Emilia: campioni da altre province
Materiali e prodotti per verifiche di conformità al Regolamento Reach	Ausl, Ministero, uffici doganali	Ravenna: ricerca di ftalati e punto di infiammabilità Reggio Emilia: ricerca di amianto, Cov, nicotina, benzene, alcoli in prodotti biocidi
Ambienti di vita e di lavoro, acque e altre matrici ambientali per ricerca amianto	Arpae, Ausl e altri enti di vigilanza	Reggio Emilia: campioni da tutta la regione
Materiali e rifiuti per analisi di ecotossicologia	Arpae, Ausl e altri enti di vigilanza	Ravenna e Ferrara: campioni da tutta la regione
Matrici ambientali e sanitarie per analisi microinquinanti organici	Arpae, Ausl e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da tutta la regione
Acque e biota per analisi Pfas	Arpae, Ausl e altri enti di vigilanza	Ravenna (biota) e Ferrara (acque): campioni da tutta la regione
Acque di scarico e depuratori	Arpae e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da Fc - Ra - Rn Reggio Emilia: campioni da Pc - Pr - Re - Mo Bologna: campioni da Bo - Fe
Acque di monitoraggio: sotterranee e superficiali	Arpae e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da Fc - Ra - Rn Reggio Emilia: campioni da Pc - Pr - Re - Mo Bologna: campioni da Bo - Fe
Acque di transizione	Arpae e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da tutta la regione
Acque di controllo discariche	Arpae e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da Fe - Fc - Ra - Rn Reggio Emilia: campioni da altre province
Acque da siti contaminati	Arpae e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da Fe - Fc - Ra - Rn Bologna: campioni da altre province
Suoli, siti contaminati (terreni), fanghi, sedimenti, rifiuti	Arpae e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da tutta la regione
Emissioni in atmosfera	Arpae e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da inceneritori e grandi impianti combustione da tutta la regione Reggio Emilia: altri impianti, campioni da tutte le province
Qualità dell'aria per ricerca metalli e lpa	Arpae e altri enti di vigilanza	Ravenna: campioni da tutta la regione

TAB. 1 LABORATORIO MULTISITO ARPAE

Principali attività analitiche svolte dalle diverse sedi del Laboratorio multisito di Arpae Emilia-Romagna.

I LABORATORI A SUPPORTO DELLE STRUTTURE SANITARIE

IL LABORATORIO MULTISITO ARPAE È UNA STRUTTURA FONDAMENTALE PER COMPLETARE LE ATTIVITÀ DI CONTROLLO E VIGILANZA IN TEMA DI PREVENZIONE COLLETTIVA E MEDICINA DEL LAVORO DEL SERVIZIO SANITARIO. LE ANALISI SONO EFFETTUATE IN DIVERSE SEDI, CHE GARANTISCONO LA MIGLIORE INTEGRAZIONE OPERATIVA IN CAMPO AMBIENTALE E SANITARIO.

La legge regionale 44/1995 “Riorganizzazione dei controlli ambientali e istituzione dell’Agenzia regionale prevenzione e ambiente (Arpa) dell’Emilia-Romagna”, nonché i successivi accordi di programma (ai sensi dell’art. 3 della L 44/95), definiscono nel dettaglio funzioni, le attività e i compiti assegnati all’Agenzia (oggi Arpa Emilia-Romagna). In particolare, l’art. 5 comma 1 lettera d) impone ad Arpa di garantire, attraverso le proprie strutture, l’esecuzione delle attività analitiche e l’erogazione di ogni altra prestazione in materia di prevenzione e di controllo ambientale richieste dai Comuni, dalle Province, dalle Aziende Usl e da altre amministrazioni pubbliche per lo svolgimento dei rispettivi compiti di istituto. Inoltre, l’art. 17 comma 1 esplicita che l’Agenzia e i Dipartimenti di prevenzione delle Aziende Usl esercitano in modo integrato e coordinato le funzioni e le attività di controllo ambientale e di prevenzione collettiva che rivestono valenza sia ambientale sia sanitaria, assegnando all’Agenzia la gestione della rete laboratoristica per la tutela dell’ambiente e per l’esercizio delle funzioni di sanità pubblica (Allegato 1 L 44/1995).

Di fatto, quindi, il Laboratorio multisito Arpa è una struttura fondamentale per completare le attività di controllo e vigilanza in tema di prevenzione collettiva e medicina del lavoro delle Ausl del Servizio sanitario regionale. L’attività analitica di supporto alle strutture sanitarie è effettuata in diverse sedi di laboratorio, scelte considerando la migliore integrazione operativa possibile tra richieste analitiche in campo ambientale e in campo sanitario. Rispetto al numero totale di campioni analizzati annualmente dal Laboratorio multisito (circa 50.000 - 55.000 all’anno), i campioni conferiti dalle strutture sanitarie rappresentano circa il 65%-70% del totale. Tra di essi troviamo acque



potabili, minerali, termali, piscine, dialisi, alimenti di origine vegetale (freschi e trasformati), sostanze e miscele (regolamenti Reach e Clp) e campioni inerenti ambienti di vita e di lavoro (amianto, sostanze organiche aerodisperse ecc.)

Ai campioni istituzionali si aggiungono poi anche le analisi di campioni a pagamento in convenzione con le strutture sanitarie di Ausl e aziende ospedaliere per i controlli di acque di dialisi, ricerca legionelle, controlli acque di lavaggio endoscopi e monitoraggi ambienti indoor.

Il supporto analitico specialistico del Laboratorio multisito, a supporto della vigilanza attuata dagli organi del servizio sanitario regionale in tema di salute pubblica e medicina del lavoro, si esplica nei seguenti ambiti.

Acque potabili, di piscina, di dialisi, minerali e termali

I campioni istituzionali conferiti dalle Ausl e altre strutture sanitarie

dell’intera Emilia-Romagna, in accordo con i piani regionali e in attuazione dei protocolli analitici previsti dalle normative e concordati con la Regione, sono processati nei laboratori di Reggio Emilia e Bologna. Il numero di campioni conferiti ogni anno è di circa 16.500 campioni (dato 2024), di cui il 50% è costituito da acque destinate al consumo umano (potabili).

In particolare, per le acque potabili, a seguito dell’emanazione del Dlgs 18/23 e del recente aggiornamento, ad Arpa è stata richiesta la messa a punto di metodi analitici chimici per la determinazione di nuovi inquinanti e interferenti endocrini previsti dalla normativa.

La sede di Bologna ha già sviluppato metodi in Lc/Ms–Ms per la rilevazione di microcistine (tossine prodotte da cianobatteri che possono danneggiare fegato e sistema nervoso) e acrilammide (sostanza potenzialmente cancerogena presente in alcune acque a seguito di processi industriali o di trattamento). Con tecniche in Gc/Ms, invece, è stato

completato lo sviluppo del metodo per il nonilfenolo, interferente endocrino che può alterare il normale funzionamento ormonale.

Sono attualmente in corso le attività di messa a punto in Gc/Ms per epicloridrina e in Lc/Ms–Ms per il bisfenolo A e il 17-beta estradiolo, noti interferenti endocrini che possono influenzare lo sviluppo, il metabolismo e il sistema riproduttivo, e per gli acidi aloacetici, sottoprodotti della disinfezione dell'acqua potenzialmente tossici e sospettati cancerogeni.

Per le analisi microbiologiche delle acque potabili, le richieste principali riguardano *Escherichia coli* ed enterococchi intestinali: i parametri indicatori includono i batteri coliformi, il conteggio delle colonie a 22 °C e il *Clostridium perfringens*. Il decreto indica metodiche di riferimento per la ricerca di queste parametri e impone che i laboratori siano accreditati secondo la norma Uni En Iso/Iec 17025. A differenza della normativa precedente, il nuovo decreto richiede la ricerca degli enterococchi intestinali in tutti i profili analitici, il che ha portato a un aumento del numero di analisi per questo parametro già dal 2024. Vengono inoltre introdotti nuovi parametri per la valutazione e la gestione del rischio nei sistemi di distribuzione idrica interna e in particolare, per il parametro legionella, si definisce un limite di legge di <1000 Ufc/l prevedendo però azioni per la gestione del rischio anche per valori inferiori a questo limite in caso di infezioni o focolai. I laboratori di Reggio Emilia e Bologna, così come richiesto dal decreto, hanno conseguito da tempo l'accreditamento previsto per tali parametri.

Tra le attività analitiche a supporto del monitoraggio delle acque potabili effettuato dalle Ausl della regione si inseriscono anche:

- il conteggio di fibre di amianto totali; sebbene non esista un limite di legge di riferimento, tale parametro è inserito nel piano di monitoraggio delle acque di rete per tenere sotto controllo lo stato di usura degli impianti idrici (l'analisi è svolta presso la sede di Reggio Emilia)
- la determinazione di microinquinanti organici persistenti (ad esempio diossine, Pcb, Ipa ecc.) effettuata nel laboratorio di Ravenna

- la determinazione di residui di fitofarmaci e Pfas nelle acque potabili, effettuato nel laboratorio di Ferrara.

In particolare, per la ricerca dei composti perfluoroalchilici, meglio noti con l'acronimo inglese di Pfas, le recenti modifiche al Dlgs 18/2023 ne

hanno previsto la ricerca ai livelli di concentrazione estremamente bassi.

Ambienti bonificati da amianto ed esposizione dei lavoratori

Il laboratorio Arpa Emilia Regio svolge un'attività di supporto alle strutture sanitarie per l'esecuzione delle analisi di amianto aerodisperso. Effettua, infatti, analisi di filtri di policarbonato prelevati dalle Ausl della regione, in ambienti indoor, in seguito alla rimozione di amianto.

Il conteggio delle fibre di amianto aerodisperse rappresenta un parametro chiave sia per attestare l'efficacia della bonifica da amianto, operata dalle ditte specializzate, sia per la protezione dei lavoratori contro i rischi connessi all'esposizione a fibre di amianto durante il lavoro.

Anche rispetto all'ultimo aggiornamento normativo su questa tematica che ha visto una diminuzione del valore limite di esposizione e quindi una conseguente modifica della metodica di riferimento, il laboratorio di Reggio Emilia, disponendo di strumentazione basata su microscopia elettronica a scansione, si conferma laboratorio competente di riferimento per le Ausl della regione, servizio di medicina del lavoro.

Piano regionale delle attività di controllo sui prodotti chimici

Nell'ambito del piano regionale dei controlli sui prodotti chimici, Arpa Emilia – come parte della rete nazionale dei laboratori – è l'autorità incaricata dei controlli analitici sui prodotti immessi sul mercato in applicazione delle principali normative europee:

- Reg. 1907/2006 (Reach) sulla registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche
- Reg. 1272/2008 (Clp) sulla classificazione, etichettatura e imballaggio di sostanze e miscele
- Reg. 528/2012 sulla messa a disposizione sul mercato e uso dei biocidi
- Reg. 648/2004 sull'immissione sul mercato di detergenti e tensioattivi
- Reg. 1107/2009 sull'immissione sul mercato di prodotti fitosanitari.

Le attività riguardano sia la verifica della corretta etichettatura e delle schede di sicurezza sia il rispetto delle restrizioni previste per sostanze pericolose. Tra i controlli più rilevanti: solventi organici volatili (Sov) in colle, vernici, detergenti, deodoranti, liquidi lavaggio parabrezza, prodotti per wc, profumi e liquidi per sigarette elettroniche; fibre di amianto nei cosmetici (talco) e in materiali vari (assi da stiro); cromo VI nel cemento;

formaldeide nei prodotti fitosanitari; nicotina nei liquidi di ricarica e-cig. Questi controlli garantiscono la tutela della salute dei consumatori e la sicurezza ambientale, assicurando che i prodotti chimici sul mercato rispettino le normative europee e regionali. Le attività analitiche vengono eseguite presso le sedi di Ravenna e Reggio Emilia.

Residui di fitofarmaci in alimenti vegetali e su prodotti fitosanitari

Il laboratorio di Ferrara è da anni il polo specialistico regionale per il controllo e la ricerca dei residui dei prodotti fitosanitari in campo ambientale e alimentare, su matrici di origine vegetale. In questa sede vengono analizzati i campioni prelevati dalle aziende sanitarie relativamente ai prodotti ortofrutticoli, inclusi i prodotti per l'infanzia e i trasformati, e all'acqua potabile. Inoltre, nell'ambito delle attività di sicurezza chimica a garanzia degli utilizzatori, sono svolti anche i controlli sui prodotti fitosanitari in commercio e sui biocidi.

Tali attività richiedono personale qualificato, strumentazioni dedicate e un flusso analitico costantemente monitorato per rispondere ai piani di controllo regionali e ministeriali, come previsto peraltro dalle normative nazionali e comunitarie in rapida e continua evoluzione. Nel corso degli anni, non sono mancati gli sforzi analitici per affrontare sfide particolarmente impegnative come, ad esempio, la ricerca di glifosate, un erbicida largamente utilizzato ma difficilmente determinabile a causa delle caratteristiche di elevata mobilità e solubilità in acqua (il cui controllo ha richiesto un forte investimento su strumentazione complessa e altamente efficiente) oppure la ricerca dei Pfas nelle acque potabili.

Se da un lato le norme si orientano verso una tutela sempre maggiore del cittadino, la sfida analitica che ne consegue comporta un notevole investimento di risorse strumentali, umane ed economiche.

La maggior parte delle determinazioni svolte dal laboratorio di Ferrara, come richiesto anche a livello normativo, sono svolte con metodiche analitiche accreditate secondo la norma Iso 17025 al fine di fornire un dato estremamente affidabile a supporto delle aziende sanitarie incaricate dei controlli.

**Marco Prete, Marco Ballabeni,
Manuela Di Giovanni**

Laboratorio multisito, Arpa Emilia-Romagna

L'ACCREDITAMENTO DEI LABORATORI ARPAE

ARPAE È ACCREDITATA DA ACCREDIA (ISO 17025 CON ACCREDITAMENTO FISSO E FLESSIBILE E ISO 17043), GARANZIA DI AFFIDABILITÀ E COMPETENZA. OFFRE 63 METODI ACCREDITATI (AMBIENTALI E SANITARI) COME LABORATORIO MULTISITO E DUE SCHEMI DI PROFICIENCY TESTING SU FITOFARMACI E NITRATI COME ORGANIZZATORE PT.

L'accreditamento è il riconoscimento da parte di un ente esterno super partes (Accredia, ente unico di accreditamento designato a livello nazionale dal regolamento europeo CE 765/2008) delle competenze tecniche dei laboratori nello svolgere le attività analitiche in conformità ai requisiti della norma 17025 e, della capacità dell'organizzatore di *proficiency testing* (Pt) di progettare e gestire i circuiti di confronto interlaboratorio secondo i requisiti della norma 17043.

Citando una frase di Accredia, l'accreditamento è "una garanzia che dà fiducia". Conferisce, infatti, senso di sicurezza e tranquillità nei confronti degli stakeholder, che vedono soddisfatte le aspettative per le proprie richieste, e in particolare assicura che il laboratorio fornisca dati tecnicamente validi e affidabili. Pur essendo a carattere volontario, l'accreditamento è pertanto utile a garantire l'imparzialità, la riservatezza, l'affidabilità e la competenza dei laboratori di prova e degli organizzatori di prove interlaboratorio. Questa descrizione può sembrare in una prima lettura un po' riduttiva, ma in realtà contempla diversi aspetti: personale qualificato, strumentazione

adeguata e tarata, dati analitici accurati. Ma non solo, entrando più nel dettaglio della norma 17025, anche validazione e verifica delle metodiche e del controllo qualità del dato, mentre per la 17043 anche verifica di omogeneità e stabilità del materiale, analisi statistica dei dati e definizione del report. L'attestazione di competenza e imparzialità, rilasciata attraverso il processo di valutazione di Accredia, rafforza pertanto l'immagine di Arpae sia come laboratorio accreditato sia come organizzatore di Pt, dando una maggiore garanzia di qualità e sicurezza dei servizi offerti.

Il percorso di accreditamento di Arpa Emilia-Romagna (diventa Arpae nel 2016) iniziò nel 1998, quando l'Agenzia era costituita da 9 laboratori "gemelli" delle Sezioni provinciali (ereditati dai Presidi multizonali di prevenzione delle Ausl), operanti trasversalmente su tutte le matrici di competenza provinciale, prima in conformità a quanto previsto dalla norma Uni Cei En 45001 (fino al 2001) e successivamente sostituita dalla norma Uni Cei En Iso/Iec 17025. I 9 laboratori dell'Agenzia vennero accreditati nel 1999 come laboratori singoli e a sé stanti fino al 2004. Da quel momento in poi, una progressiva

ridefinizione e riorganizzazione dell'attività per poli geografici (ovest, centro, est) ha portato allo sviluppo di laboratori che processavano più matrici per diverse sedi provinciali, di laboratori tematici e di aree di riferimento analitico (attività specialistica per tutta la regione). Contestualmente, a partire dal 2015, è stata istituita l'area laboratoristica della Direzione tecnica con funzioni di sede primaria e di coordinamento delle attività di metrologia. Questa nuova organizzazione ha spostato l'accreditamento da 9 realtà singole a un sistema di Laboratorio multisito regionale (secondo il modello previsto da Accredia) con una sede centrale rappresentata dalla Direzione generale/Direzione tecnica e da 5 sedi secondarie di laboratorio (Piacenza, Reggio Emilia, Bologna, Ravenna e Ferrara) a cui vennero aggiunte successivamente (nel 2019) anche 4 sedi di sportelli senza laboratorio (Parma, Modena, Forlì-Cesena e Rimini), e infine, nel 2022, la sede di laboratorio della Struttura oceanografica Daphne (Sod). Dal 2005 Arpae ha inoltre un sistema di gestione certificato Iso 9001 a cui il Laboratorio multisito fa riferimento.

"L'effettuazione di attività analitica di laboratorio per la prevenzione collettiva e la tutela ambientale" è una delle *mission* della rete laboratoristica regionale che si esplicita nei seguenti ambiti: chimico, microbiologico, ecotossicologico, biologico e fisico, verificando il rispetto delle normative cogenti. Il laboratorio effettua analisi su acque (potabili e sanitarie, superficiali e sotterranee, di balneazione, di scarico), alimenti, aria, suoli/terreni/fanghi, spaziando in generale dalla ricerca di contaminanti ambientali fino ad amianto, fitofarmaci e radioattività; a questi si aggiungono test di tossicità e di microrganismi, e prove sullo stato ecologico degli habitat. A oggi il numero totale di metodi accreditati è 63 di cui 34 in ambito ambientale e 29 in ambito sanitario.



Il contesto di riferimento in continua evoluzione ha spinto il laboratorio ad adeguare la propria offerta in termini di prove accreditate alle richieste dei clienti istituzionali interni ed esterni (Ausl, punti di ingresso frontalieri - Pif, Regione Emilia-Romagna, Sistema nazionale per la protezione dell'ambiente - Snpa). A fronte di ciò Arpae ha intrapreso il percorso di accreditamento flessibile per rispondere in maniera adeguata alle esigenze del cliente, in particolare nell'ambito delle attività di controllo di competenza dell'agenzia, per le quali l'accREDITamento delle prove è cogente o comunque raccomandato. L'accREDITamento in campo flessibile riconosce al laboratorio maggiore responsabilità e autonomia nel dimostrare di operare in maniera valida, adatta allo scopo e con competenza, coerenza e imparzialità.

Il controllo dei fitofarmaci nelle acque di monitoraggio (superficiali e sotterranee) e il controllo ufficiale dei fitofarmaci negli alimenti di origine vegetale, alimenti di prima infanzia e nelle acque potabili e minerali, è l'ambito per il quale si ha maggiore esigenza di tempestività sul mercato. Dal 2021 Arpae ha ottenuto l'accREDITamento con scopo flessibile per la sede di Ferrara, permettendo in questo modo al laboratorio di gestire sia i tempi di modifica delle prove correlate al campo flessibile, sia di inserire nuovi principi attivi da analizzare, riducendo la tempistica connessa alla valutazione e alla formalizzazione delle prove da parte di Accredia. Tale accREDITamento è stato possibile in quanto la tecnica di prova era già accREDITata, da oltre 2 anni, con scopo fisso, che è il percorso da effettuare per ottenere l'accREDITamento Iso 17025.

Parallelamente al percorso per l'accREDITamento 17025, nel 2019 Arpae ha intrapreso, con la sede del laboratorio di Ferrara, l'accREDITamento secondo la norma Iso 17043 come organizzatore di Pt per la ricerca di residui di fitofarmaci su matrici alimentari vegetali e la determinazione del tenore di nitrati su matrici alimentari vegetali a foglia. I motivi trainanti che hanno spinto l'Agenzia a investire su questo ambito, ritenuto molto importante, sono stati soprattutto l'esperienza pluriennale in questo campo (dal 1997) e la necessità di sopperire alla mancanza di Pt sul mercato nazionale. In Italia sono 19 le organizzazioni che hanno conseguito l'accREDITamento alla norma Iso 17043, 7 sono strutture pubbliche, e fra queste figurano Ispra e Arpae. Arpae è stata la prima Agenzia del Snpa a ottenere tale riconoscimento.



Cosa significa e a cosa serve un *proficiency test*? È una prova che permette ai laboratori di valutare la propria competenza e la qualità dei risultati attraverso un confronto con altri laboratori che analizzano campioni identici organizzati e gestiti preferibilmente da un ente accREDITato. Queste prove servono al laboratorio, inoltre, a valutare e monitorare le proprie prestazioni, a identificare i problemi e ad attuare azioni di miglioramento. Gli oggetti dei Pt sono campioni che rispecchiano, il più possibile, le matrici che vengono processate abitualmente dai partecipanti. Per garantire che i laboratori analizzino oggetti statisticamente equivalenti, il *proficiency testing provider* (Ptp) di Arpae valuta la stabilità e l'omogeneità dei campioni distribuiti, così come richiesto dalla norma. Lo scorso anno Arpae, con il Ptp di Ferrara, è entrato a far parte del database dell'Eptis (*European proficiency testing information system*, sistema europeo di informazione sui Pt), che raccoglie a livello internazionale tutti gli schemi accREDITati di prove interlaboratorio presenti sul mercato.

Per le medesime motivazioni che hanno portato all'accREDITamento del Ptp di Ferrara, Arpae sta inoltre perseguendo l'obiettivo di estendere il proprio accREDITamento 17043 anche per il Ptp di Ravenna, che da anni organizza Pt sui saggi ecotossicologici, utilizzando differenti organismi test, quali ad esempio *Daphnia magna*, batteri luminescenti, alga verde ed embrioni di *Danio rerio*.



I partecipanti che aderiscono ai circuiti dei Ptp di Arpae sono di livello nazionale, europeo ed extra-europeo. La trasparenza e la condivisione di regole hanno portato Arpae a credere in questo obiettivo di accREDITamento e per continuare a conferire fiducia e garanzia ai clienti e alle autorità, persegue tale scopo estendendo ogni anno l'accREDITamento a nuove matrici e parametri (per la 17025) e a nuovi schemi di Pt (per la 17043) mantenendo sempre il focus di razionalizzare e uniformare le attività nelle diverse sedi laboratoristiche.

**Marta Ranieri¹, Caterina Guidetti²,
Alessandro Tieghi²**

Arpae Emilia-Romagna

1. Servizio Pianificazione, progetti europei, qualità, ecomanagement, formazione
2. Laboratorio multisito

UN LABORATORIO SUL MARE ADRIATICO PER ARPAE

LA DAPHNE II È UN BATTELLO OCEANOGRAPHICO ATTREZZATO PER COMPIERE CONTROLLI E STUDI SULL'ECOSISTEMA MARINO E SULLA QUALITÀ DELLE ACQUE, COLLEGATO CON UN SISTEMA DI LABORATORI A TERRA CHE ACCOGLIE I CAMPIONI PROVENIENTI DALLA MOTONAVE PER LE ANALISI CHIMICHE E BIOLOGICHE SU MATRICI DI ACQUA, SEDIMENTO E BIOTA.

“**A** una signora non si chiede l'età”. Così di solito recita un modo di dire comune che invita a mostrare rispetto e cortesia su domande personali e potenzialmente imbarazzanti a una donna che ha superato un certo tempo, come l'età. Ma mettiamo da parte il principio di galateo e, chiedendo alla motonave Daphne II di Arpa Emilia-Romagna la sua età, scopriamo che nel 1988 ha visto la luce nel cantiere Tecnomatic di Ancona. A onor del vero il primo battello oceanografico Daphne della regione Emilia-Romagna fu varato nell'agosto del 1977. Le caratteristiche della costa emiliano-romagnola suggerirono allora ai progettisti di costruire un'imbarcazione di medie dimensioni: il progetto venne eseguito dalla società Dagh Watson di

Milano e la costruzione venne affidata alla Nord Cantieri di Avigliana (TO). L'installazione della strumentazione scientifica fu fatta dalla Philips della sede di Monza (MI).

Ma torniamo alla motonave Daphne II, un battello oceanografico attrezzato per compiere controlli e studi sull'ecosistema marino e sulla qualità delle acque. La struttura dello scafo, dotato di una carena adatta ai bassi fondali, è in vetroresina e kevlar rinforzata con elementi longitudinali e trasversali. Sul ponte è installato un verricello idraulico con 200 metri di cavo di acciaio e a poppavia un arco, adeguatamente strutturato per il recupero e la posa di strumenti oceanografici. Tale struttura è inoltre dotata di due bracci laterali e

Daphne II - Dati tecnici

Lunghezza fuori tutto	17,25 m
Lunghezza al galleggiamento	13,50 m
Larghezza fuori tutto	4,70 m
Altezza di costruzione	2,35 m
Immersione a pieno carico	1,30 m
Dislocamento	26,42 t
Potenza apparato motore	2x243 cv
Velocità di crociera	20 nodi
Capacità serbatoio nafta	4.000 litri
Capacità serbatoio acqua	700 litri
Equipaggio	n. 2
Imbarco tecnici	n. 6





2

uno centrale. La sovrastruttura, costruita in vetroresina, con pavimentazione in gomma, comprende la timoniera e il locale laboratorio.

Nel locale timoniera è collocata la plancia di comando con i relativi comandi e le utenze con la ruota timone (foto 2). L'unità è equipaggiata di 2 radar (foto 3): gli apparati sono stati rinnovati nel 2024 con i fondi Pnc, linea di investimento P3. Si tratta di 2 radar marini: il primo a scala 72 NM con display di 12.1 inch (risoluzione 1024x768 pixel), il secondo a scala 32 NM con display di 8.4 inch (risoluzione 480x640 pixel). Entrambi adottano la tecnologia *solid state* per abbassare le emissioni elettromagnetiche dei radar tradizionali.

Sempre nel locale plancia sono installati un pilota automatico, un ecoscandaglio, un *chartplotter* e una stazione Gmdss. La stazione Gmdss (foto 4) è composta da Vhf per chiamate in fonia e Dsc,



3



4

- 1 Il battello oceanografico Daphne II.
- 2 Plancia di comando.
- 3 Antenne radar e relativi monitor.
- 4 Sistema di sicurezza Gmdss.

Navtex, Gps interfacciato con apparato *chartplotter*, trasmettitori di localizzazione d'emergenza Sart e Epirb. La timoniera è munita di due uscite laterali e una posteriore che la mette in collegamento con il laboratorio.

La sala laboratorio (foto 6) è costituita da una tuga finestrata collegata con la sala comando e con il ponte coperta a poppa. In essa sono sistemati in senso longitudinale appositi tavoli da laboratorio e scaffalature portanti la strumentazione scientifica. Il laboratorio è anche dotato di congelatore e di lavello. Nel laboratorio sono installati la strumentazione scientifica e i mezzi adibiti al pretrattamento (filtrazione e fissazione) e alla refrigerazione dei campioni raccolti.

La strumentazione scientifica è composta da una sonda multiparametrica Idronaut modello Ocean Seven 316 Plus per analisi lungo la verticale (dalla superficie al fondo) dotata di elettrodi per la determinazione dei valori di temperatura, salinità, pH, ossigeno disciolto, clorofilla "a", torbidità e Par. La sonda trasmette via cavo le informazioni acquisite a una centralina comprendente il sistema di visualizzazione dei profili verticali, di registrazione e di tabulazione dati. Gli stessi possono essere immediatamente visualizzati come elaborati grafici dal computer di bordo.

Nel laboratorio è presente anche un fluorimetro Turner 10 Au predisposto per la misura della clorofilla "a" per misure dirette sull'acqua di mare senza trattamento preventivo. Sono inoltre disponibili delle rampe di filtrazione per la preparativa campioni in particolare per le analisi chimiche dei nutrienti di azoto, fosforo e silicati.

Oltre ai sistemi di base elencati, che hanno una collocazione fissa nella sala laboratorio, il battello è dotato di altri mezzi che possono essere utilizzati in funzione di particolari programmi di ricerca e di controllo:

- correntometri a registrazione per misure a medio e lungo periodo
- carotiere per campionamenti di sedimento
- bottiglie Niskin per prelievi di acqua alle diverse profondità
- rete, sorbona e draga per il campionamento di organismi bentonici
- campionatore boxcorer a gravità
- Adcp

- telecamera e macchine fotografiche predisposte alla fotodocumentazione in ambienti subacquei.

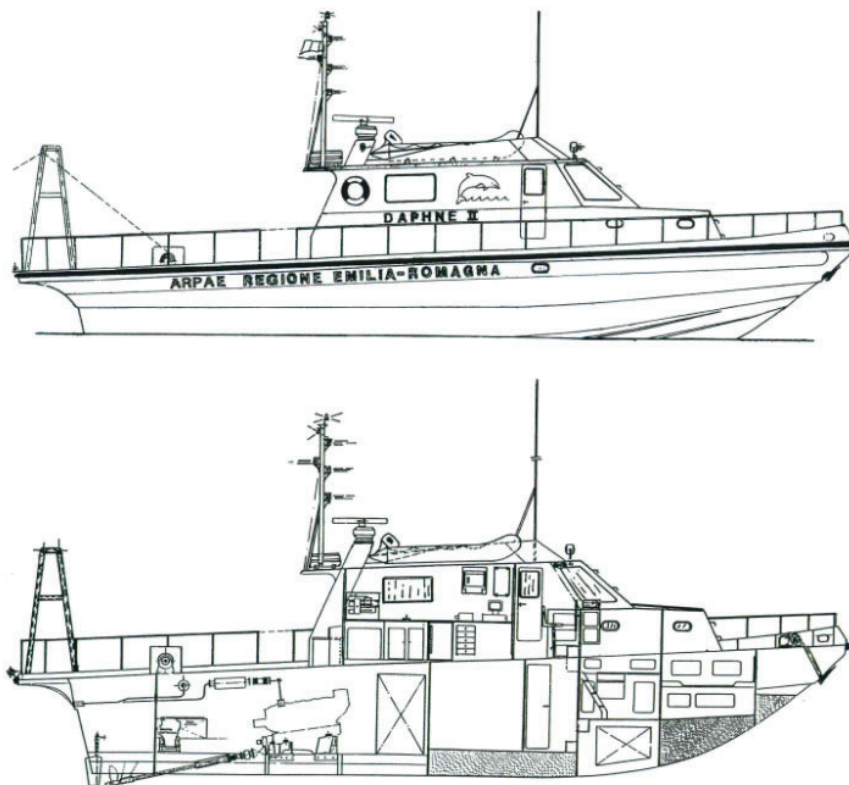
Sempre con finanziamento Pnc fase 3, è in programma entro dicembre 2025 la sostituzione dell'apparato motore della motonave, dei suoi principali componenti e del gruppo elettrogeno.

Un sistema attrezzato di laboratori a terra accoglie poi i campioni provenienti

dalla motonave Daphne II per le analisi chimiche e biologiche su matrici di acqua, sedimento e biota.

Cristina Mazziotti

Responsabile Struttura tematica oceanografica Daphne, Arpa Emilia-Romagna



5



6

5 Schemi tecnici della nave Daphne II.

6 Locale laboratorio.

EPIDEMIOLOGIA BASATA SULLE ACQUE REFLUE A BOLZANO

IL LABORATORIO BIOLOGICO DI APPA BOLZANO, LE VARIE FASI ANALITICHE BASATE SU TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE, DALLA PRODUZIONE ALL'INTERPRETAZIONE DEI DATI E UNA BREVE PANORAMICA SULLE PROSPETTIVE FUTURE DEL MONITORAGGIO AMBIENTALE DI PATOGENI IN RELAZIONE AL CONCETTO DI WASTEWATER BASED EPIDEMIOLOGY.

Il laboratorio biologico di Appa Bolzano partecipa dal 2021 al progetto Sari (Sorveglianza ambientale dei reflui in Italia). Settimanalmente analizza le acque reflue in ingresso ai maggiori depuratori altoatesini alla ricerca del virus Sars-cov-2. In seguito alla pandemia da coronavirus si è nuovamente affermato il metodo innovativo per il monitoraggio della circolazione di patogeni e altre sostanze nelle acque reflue: la cosiddetta epidemiologia basata sulle acque reflue (*wastewater based epidemiology*, Wbe) (Singer et al., 2023).

La Wbe si basa sul concetto, già consolidato nel mondo scientifico, che ciò che viene espulso dal corpo umano attraverso le defezioni (feci e urine) può essere rilevato nelle acque reflue. Analizzando quindi le acque reflue all'ingresso di un depuratore è possibile ottenere dati utili rispetto all'andamento e alla diffusione di patogeni (per esempio il Sars-cov-2 e i virus influenzali) indipendentemente dal ricorso a test clinici (La Rosa et al., 2020). Lo strumento della Wbe è quindi un monitoraggio di tipo ambientale, a costo relativamente ridotto, non invasivo della privacy e implementabile su larga scala, utile come supporto decisionale per programmare futuri interventi di salute pubblica. Il contributo della Wbe alla tutela della salute umana è evidenziato nell'articolo 17 (sorveglianza delle acque reflue urbane) della direttiva europea Ue 3019/2024 sul trattamento delle acque reflue urbane.

L'Italia ha applicato la Wbe allo scopo di sorvegliare la circolazione di virus nelle acque reflue avviando già nel 2021 la rete di sorveglianza Sari con l'obiettivo di monitorare la concentrazione e la variabilità genetica del virus Sars-cov-2 (La Rosa et al., 2022). Dall'avvio dell'iniziativa, il laboratorio biologico di Appa Bolzano partecipa alla rete Sari. Il valore predittivo della Wbe, nei confronti della diffusione di patogeni

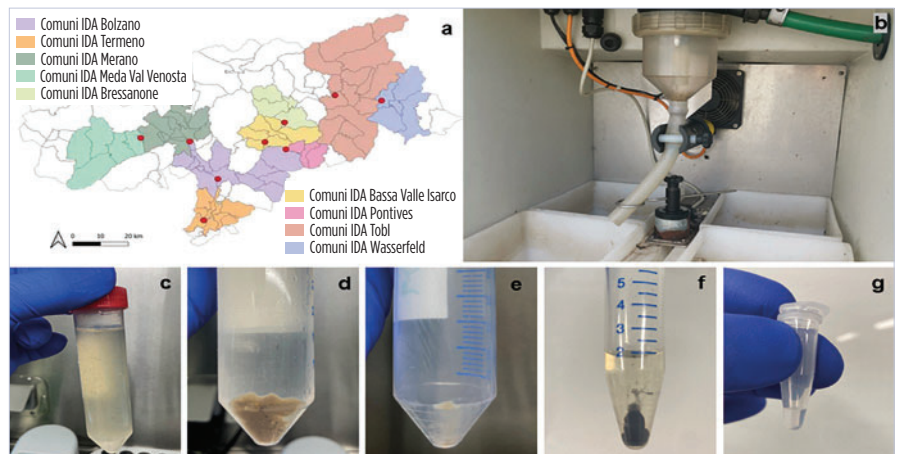


FIG. 1 PUNTI CHIAVE DI MONITORAGGIO WBE

I punti chiave di monitoraggio Wbe, operato da Appa Bolzano, dalla fase di campionamento a quella di estrazione e purificazione dell'RNA di Sars-cov-2. a) Disposizione territoriale dei depuratori inclusi nel monitoraggio. b) Campionatore automatico per la raccolta del refluo nell'arco delle 24 ore. c) Campione di refluo al momento della ricezione in laboratorio. d) Pellet di solidi sospesi ottenuto dopo la prima centrifugazione. e) Pellet concentrato contenente le particelle virali, il materiale genetico e le impurità. f) Silice magnetizzata utilizzata per l'estrazione del materiale genetico aggiunta nel buffer di lisi al fine di recuperare l'RNA virale. g) Prodotto di estrazione finale contenente l'RNA virale ottenuto in seguito all'eluizione dalle particelle di silice.

Foto 1a, 1c, 1d, 1e, 1f e 1g: Appa Bolzano - Foto 1b: Eco center Spa

nella popolazione, è sempre più considerato, tanto da essere utilizzato anche in grandi eventi, come ad esempio durante i giochi olimpici di Parigi nel 2024. In quell'occasione sono stati monitorati 6 patogeni nelle acque reflue: poliovirus, influenza A e B virus, mpox virus, Sars-cov-2 e virus del morbillo (Toro et al., 2024).

La tecnica della reazione a catena della polimerasi (qPcr)

La determinazione quantitativa della presenza di Sars-cov-2 (espressa in copie genomiche) nelle acque reflue operata dai laboratori aderenti alla rete Sari segue un protocollo sviluppato dall'Istituto superiore di sanità (Iss), armonizzato e condiviso a livello nazionale (La Rosa et al., 2021). L'adesione a una metodologia unificata e condivisa tra i laboratori regionali e provinciali incaricati alle analisi è fondamentale in quanto permette di produrre dati tra loro confrontabili.

Il protocollo si suddivide in quattro fasi: campionamento; concentrazione; estrazione e purificazione; quantificazione della concentrazione mediante Rt-qPcr¹.

Fase 1 - campionamento

La fase di prelievo deve soddisfare il criterio di rappresentatività del campione e rientrare in una logica di costi benefici. Nel caso di Appa Bolzano, il campionamento viene svolto in collaborazione con i gestori degli impianti di depurazione prelevando un campione di refluo due volte alla settimana all'ingresso di 9 depuratori altoatesini (Bolzano, Merano e Termeno – afferenti alla rete Sari – e Pontives, Media Val Venosta, Bressanone, Tobl, Wasserfeld e Bassa Valle Isarco – scelti per avere una maggiore rappresentatività dell'intero territorio provinciale) (figura 1a). I campioni (in totale 18 a settimana) sono prelevati utilizzando dei campionatori automatici che ne integrano la raccolta nell'arco delle 24 ore (figura 1b), ciò permette di esprimere i dati come valore composito giornaliero e

ridurre la variabilità temporale intrinseca del contenuto delle acque reflue.

Fase 2 - concentrazione del campione

La fase di concentrazione del campione di acqua reflua è necessaria in quanto le particelle virali e il materiale genetico virale libero in soluzione (Rna nel caso di Sars-cov-2) sono molto diluiti (figura 1c-e). I campioni vengono quindi sottoposti a una prima centrifugazione allo scopo di eliminare i solidi sospesi che interferirebbero con il resto dell'analisi (figura 1d) e successivamente vengono concentrati mediante precipitazione in glicole polietilenico attraverso una seconda centrifugazione (figura 1e). Durante l'intero processo è inevitabile che una parte di particelle virali e Rna virale vengano perdute. Per questo, all'inizio della fase di concentrazione viene aggiunto un Rna sintetico di controllo di un virus non presente nelle acque reflue (mengovirus). Ciò permette di calcolare la percentuale di Rna di controllo inizialmente aggiunto nel campione che è stato possibile recuperare. Solo i campioni che mostrano una percentuale di recupero sopra una certa soglia vengono considerati validi.

Fase 3 - estrazione e purificazione del materiale genetico

Dal processo di concentrazione si ottiene un pellet (figura 1e), il quale viene risospeso in un buffer di lisi al fine di liberare l'Rna dalle particelle virali (i capsidi, ovvero le strutture proteiche che contengono il materiale genetico virale), e permetterne quindi l'estrazione. Tuttavia, per poter misurare correttamente la quantità di virus nell'acqua reflua attraverso Pcr, è necessario purificare l'Rna virale da proteine, acidi umici e altre sostanze che andrebbero a inibire l'efficienza di reazione di Pcr². La fase di estrazione racchiude tre processi: dapprima la rottura dei capsidi e l'adesione dell'Rna su particelle di silice; successivamente la purificazione, attraverso una serie di "lavaggi" e il recupero delle particelle di silice; e infine il recupero dell'Rna dalle particelle di silice attraverso un processo di eluizione.

Alla fine della fase di concentrazione ed estrazione il volume del campione viene ridotto di 500 volte (da 50ml, circa un quarto di un bicchiere d'acqua, a 0,1 ml, circa una goccia) (figura 1g). Il campione di estratto così ottenuto è quindi pronto per la determinazione della concentrazione di Rna virale mediante real time Rt-qPcr (figura 2a-b).

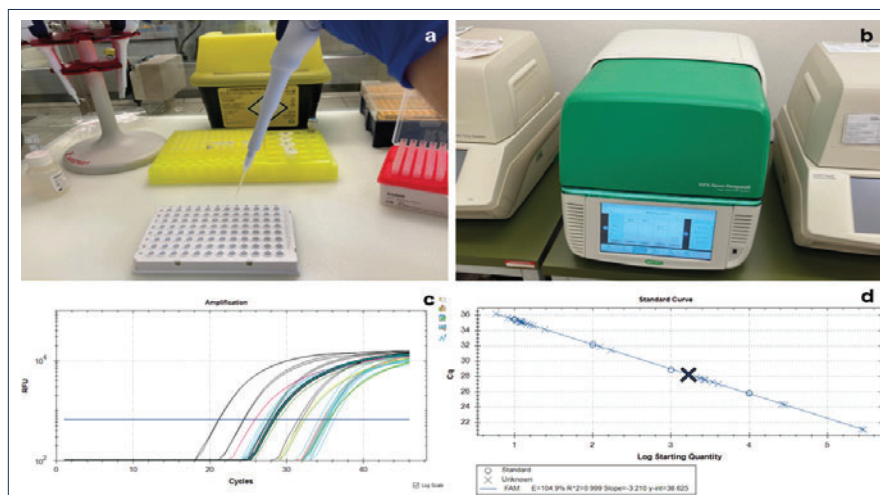


FIG. 2 QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI SARS-COV-2 NEI CAMPIONI MEDIANTE REAL TIME RT-QPCR

a) Preparazione della piastra da Pcr, in ciascun pozzetto vengono aggiunti l'enzima Dna-polimerasi, i primers le sonde e il target.
b) Termociclatore, strumento che ripete ciclicamente il profilo termico necessario per l'avanzamento della reazione di Pcr.
c) Curve di amplificazione, l'aumento del segnale luminoso (espresso in Rfu, relative fluorescence units) segue un andamento di tipo sigmoide, il confronto tra le curve di amplificazione avviene nella fase esponenziale di accrescimento (ovvero quando le curve sono tra loro parallele), l'intersecazione delle curve con la soglia (threshold, rappresentata nel grafico dalla linea orizzontale) individua il ciclo (Cq - ciclo di quantificazione) al quale corrisponde la concentrazione iniziale espressa in numero di copie genomiche per microlitro di estratto.
d) Curva standard, il confronto dei Ct ottenuti attraverso una serie di diluizioni a partire da un materiale di riferimento a concentrazione nota (rappresentati nel grafico dai cerchi), permette la quantifica dei campioni a concentrazione ignota (rappresentati invece dalle crocette). La relazione Cq vs. concentrazione è di tipo inverso, ovvero, a Ct bassi corrispondono concentrazioni elevate. L'efficienza di Pcr, ovvero il rapporto di conversione cicli-concentrazione, è rappresentato dalla pendenza della curva standard e affinché un saggio di Pcr sia validabile, il valore della pendenza deve rientrare entro un certo range (-3,1 -3,6). Foto e grafici: Appa Bolzano

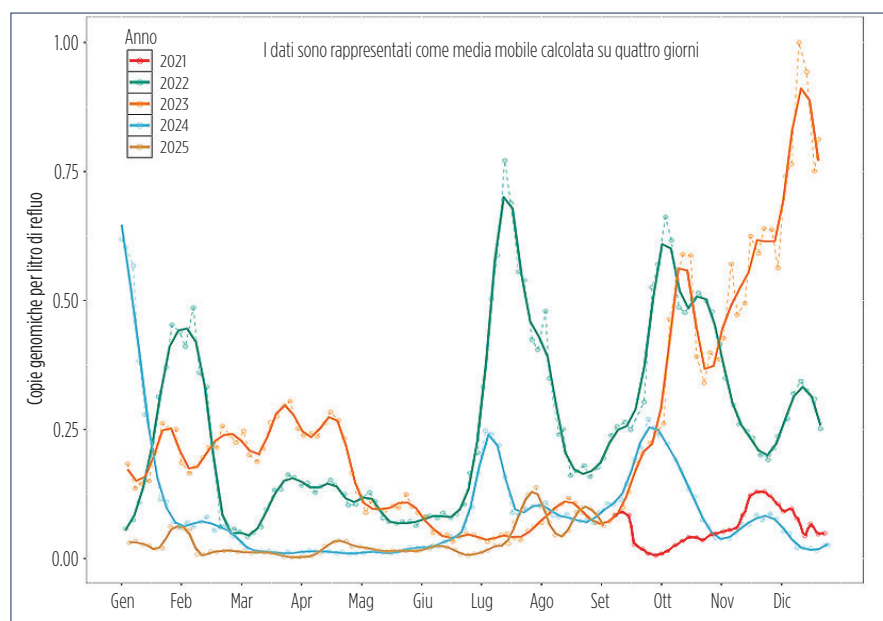


FIG. 3 CONCENTRAZIONE DI SARS-COV-2 NELLE ACQUE REFLUE ALL'INGRESSO DEL DEPURATORE

Serie temporale della concentrazione di Sars-cov-2 nelle acque reflue all'ingresso del depuratore di Bolzano. I dati sono rappresentati come media mobile, ciò permette di ridurre la variabilità intrinseca dei dati e poter meglio individuare le tendenze, in salita o in discesa, della concentrazione. Ciascuna delle linee rappresenta i dati relativi a un singolo anno, rappresentando i dati in questo modo appaiono più evidenti le periodicità stagionali. Infine, i singoli i valori di concentrazione sono stati standardizzati rispetto al valore massimo (in questo caso ottenuto la terza settimana di dicembre 2023), ciò permette di meglio confrontare i dati ottenuti di anno in anno.

Grafico: Appa Bolzano

Fase 4 - quantificazione della concentrazione di Sars-cov-2 nei campioni mediante real time Rt-qPcr

I punti di forza della Pcr, e che la rendono la tecnologia per eccellenza per questo tipo di analisi, sono due: dapprima, è altamente specifica, ovvero permette di quantificare esclusivamente una sequenza di un gene, chiamato

target, di uno specifico organismo (in questo caso del gene Orf1ab - nsp14 - del virus Sars-cov-2); e secondariamente, è estremamente sensibile, ovvero permette di quantificare anche piccolissime quantità di materiale genetico (nell'ordine di alcune molecole di Rna per microlitro di estratto). La specificità della Pcr è dovuta al fatto che la reazione inizia

solo se degli specifici iniziatori (detti *primers*) riconoscono la presenza del target. Mentre la sua sensibilità è dovuta al fatto che è una reazione a catena operata dall'enzima Dna-polimerasi, il quale replica in vitro il processo cellulare di duplicazione del Dna. La ripetizione nel tempo di questa reazione porta all'accumulo (o amplificazione) dei prodotti di reazione e rende rilevabili anche piccolissime quantità di target. Nello specifico, durante la fase di estrazione e purificazione, insieme all'Rna del Sars-cov-2, viene estratto materiale genetico di altri virus, batteri e di provenienza umana. Pertanto, grazie alla selettività e alla sensibilità della Pcr è possibile quantificare esclusivamente l'Rna appartenente al virus SarsS-Cov-2, e il processo di amplificazione lo rende rilevabile anche quando è presente a bassissime concentrazioni.

Tuttavia, in quanto il materiale genetico del Sars-cov-2 è un filamento di Rna, prima di procedere alla sua quantificazione, è necessario un ulteriore passaggio chiamato retrotrascrizione (da qui l'acronimo R-qPcr, ovvero Pcr quantitativa a transcriptasi inversa). Durante la retrotrascrizione l'Rna viene convertito in Dna a doppio filamento, e solo successivamente il Dna può essere amplificato dalla Dna-polimerasi. La quantificazione è resa possibile dal fatto che durante il proseguo della reazione di Pcr, ovvero in tempo reale (da qui il termine inglese *real-time*) è possibile rilevare un segnale di fluorescenza emesso dal Dna, in presenza di specifiche sonde, e prodotto durante ciascun ciclo di reazione. L'accumulo nel tempo dell'intensità del segnale luminoso, ovvero la sua amplificazione, è proporzionale al contenuto di Rna target presente all'inizio della reazione (*figura 2d*). In questo modo è possibile risalire alla quantità di Rna del virus Sars-cov-2 nell'estratto (*figura 2e*) attraverso il confronto con degli standard a concentrazione nota (filamenti di Rna virale sintetico forniti dall'Iss). E infine, attraverso dei semplici calcoli matematici, a quello originariamente contenuto nel campione di acqua reflua prelevato da ciascuno dei depuratori.

I dati prodotti dal monitoraggio

In questo tipo di monitoraggio ambientale si produce un'enorme mole di dati. Basti pensare che solo Appa Bolzano dalla fine del 2021 ha prodotto più di 3.000 singole misure di concentrazione. Questi dati vengono sia raccolti a livello nazionale sia utilizzati internamente all'Agenzia

per l'ambiente per informare l'Azienda sanitaria dell'Alto Adige in caso di aumento della concentrazione rispetto alla *baseline*³. Attualmente Appa Bolzano comunica sistematicamente all'Istituto superiore di sanità i risultati relativi ai tre depuratori afferenti alla rete Sari attraverso un'apposita web app e, in aggiunta, li pubblica sul proprio sito web⁴. In *figura 3* si riporta un esempio dei dati relativi al depuratore di Bolzano. Da questi è possibile vedere la tipologia di andamento, per esempio la stagionalità, ovvero il ripetersi, di anno in anno, e in determinati periodi dell'anno, di un aumento della concentrazione rispetto alla *baseline*. La Wbe mira a quantificare la presenza di patogeni, in questo caso di Sars-cov-2, nei reflui. Ciò costituisce la base di dati sulla quale sviluppare modelli che integrano questi dati di tipo ambientale con quelli di tipo clinico (si veda come esempio Fondriest et al., 2024). Solo attraverso questo approccio combinato è possibile sviluppare modelli che permettano di capire meglio come questo e altri agenti patogeni sono distribuiti nella popolazione ed eventualmente poter attivare sistemi di allerta per fronteggiare possibili ondate epidemiche. Si vuole infine aggiungere, che i dati raccolti attraverso l'approccio Wbe non sono destinati allo studio della trasmissione di malattie infettive attraverso la rete fognaria.

Prospettive per il futuro

L'applicazione della Wbe come strumento di monitoraggio ha dato vita a diverse iniziative sia a livello

nazionale (come la rete Sari) sia a livello internazionale (come, per esempio, l'*Eu wastewater observatory for public health*). Nell'immediato futuro gli Stati membri della Ue dovranno dare applicazione a quanto prescritto dalla direttiva Ue 2024/3019 sul trattamento delle acque reflue adottando sistemi di monitoraggio per rilevare patogeni come Sars-cov-2, virus influenzali e virus respiratorio sinciziale (Rsv), nonché di sistemi di monitoraggio della resistenza antimicrobica. Il Laboratorio biologico di Appa Bolzano, così come altri laboratori delle agenzie regionali e provinciali per l'ambiente, si sta attrezzando per rendere operativi questi nuovi piani di monitoraggio.

Matteo Dossena

Laboratorio biologico, Appa Bolzano

Ha collaborato alla stesura Nadia Franzoi (referente comunicazione Appa Bolzano)

NOTE

¹ Il prefisso q si riferisce a una versione quantitativa della Pcr tradizionale.

² Similmente a quanto viene fatto per calcolare il recupero, anche l'inibizione della Pcr viene controllata per evitare di ottenere una sottostima del valore di concentrazione.

³ In questo contesto con il termine *baseline* si intende la concentrazione di fondo, senza fare riferimento specifico a una sua individuazione di tipo statistico o numerico.

⁴ <https://ambiente.provincia.bz.it/it/ambiente-salute/sars-cov-2-acque-reflue-urbane>

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Eu Wastewater observatory for public health, European Commission's Joint research centre, <https://wastewater-observatory.jrc.ec.europa.eu>

Fondriest M. et al., 2024, "Wastewater-based epidemiology for Sars-cov-2 in Northern Italy: A spatiotemporal model", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 21, 741. <https://doi.org/10.3390/>

La Rosa G. et al., 2020, "Reflui e monitoraggio epidemiologico", *Ecoscienza*, n. 3/2020.

La Rosa G., Bonadonna L., Suffredini E., 2021, "Protocollo della sorveglianza di Sars-cov-2 in reflui urbani (Sari)", rev. 3, <https://doi.org/10.5281/zenodo.5758725>.

La Rosa et al., 2022, "Il sistema di sorveglianza di Sars-cov-2 nei reflui", *Ecoscienza*, n. 2/2022.

Singer A.C. et al., 2023, "A world of wastewater-based epidemiology", *Nature*, 1, 408-4015. <https://doi.org/10.1038/s44221-023-00083-8>

Toro L. et al., 2024, "Pathogen prioritisation for wastewater surveillance ahead of the Paris 2024 Olympic and Paralympic Games, France", *Euro Surveill.*, 29(28), 2400231. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.28.2400231>.

Ue 3019/2024, 2024, Direttiva (Ue) 2024/3019 del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 novembre 2024 concernente il trattamento delle acque reflue urbane.

ARPA VENETO IN PRIMA LINEA SU PFAS E ALTRI CONTAMINANTI

I LABORATORI ARPAV SONO UN PUNTO DI RIFERIMENTO NAZIONALE NEL MONITORAGGIO DEI PFAS IN DIVERSE MATRICI. L'IMPEGNO COSTANTE A SUPPORTO DELLA SALUTE PUBBLICA SI ESTENDE ANCHE AD ALTRE ATTIVITÀ, COME L'IDENTIFICAZIONE DI VIRUS NELLE ACQUE E IL CONTROLLO DI SOSTANZE CHIMICHE IN PRODOTTI DI USO QUOTIDIANO.

I laboratori di Arpa Veneto sono in prima linea nel monitoraggio e nella protezione dell'ambiente e della salute pubblica, concentrandosi sull'analisi di sostanze inquinanti emergenti e patogeni. Le attività spaziano dalla ricerca di Pfas (sostanze perfluoroalchiliche) nelle diverse matrici, all'identificazione di virus nelle acque, fino al controllo di sostanze chimiche in prodotti di uso quotidiano.

Polo di riferimento per l'analisi di Pfas e inquinanti emergenti

Arpav ha sviluppato un'esperienza e una capacità analitica sui Pfas che la vedono come punto di riferimento nazionale. L'eccellenza non deriva solo dalla semplice dotazione strumentale (Uhlc-Ms/Ms), ma da una combinazione di fattori che ne definiscono il ruolo di centro di ricerca e controllo avanzato sul territorio:

- ampiezza analitica: sviluppo e validazione di metodi per un numero estremamente elevato di composti, includendo non solo le molecole storiche ma anche quelle emergenti e di nuova generazione (ad esempio GenX, C6O4)
- diversità delle matrici: applicazione delle metodiche a un'applicazione di matrici ambientali e biologiche estremamente diversificato, che spazia dalle acque (potabili, superficiali, sotterranee) ai fanghi, alla qualità dell'aria e alle emissioni in atmosfera, fino ai tessuti biologici e al siero umano
- sensibilità: capacità di raggiungere limiti di quantificazione (Loq) eccezionalmente bassi, indispensabili per il monitoraggio sanitario e ambientale, unita a una continua attività di ricerca



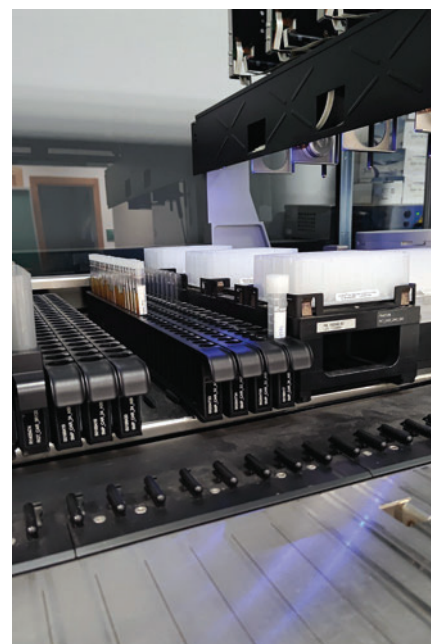
1

per individuare composti non ancora normati.

L'alta specializzazione trasforma il laboratorio da un semplice esecutore di analisi di routine a un ente attivo nella gestione di complesse situazioni ambientali e sanitarie.

Ad esempio, dal 2016 Arpav ha ricevuto l'incarico dalla Regione Veneto di fornire supporto tecnico e scientifico per misurare la concentrazione di Pfas nel siero della popolazione. I laboratori dell'Agenzia hanno automatizzato l'analisi e gestiscono circa 15.000 campioni all'anno.

Recentemente, è stato introdotto un nuovo spettrometro di massa ad alta risoluzione (Lc-Qtof) che permette di cercare e identificare sostanze non abitualmente monitorate nelle matrici acquose. Questo approccio, noto come *untarget*, apre nuove possibilità per la protezione dall'inquinamento.



2

1 Estrattore semiautomatico di acidi nucleici mediante magnetic beads.

2 Liquid handler (dettaglio).

Arpav ha anche sviluppato un metodo analitico interno per monitorare i Pfas nelle emissioni in atmosfera, per sopperire alla mancanza di metodi standardizzati riconosciuti. Questo metodo semplifica il campionamento e l'analisi rispetto ai protocolli proposti da Us-Epa. La tecnica si basa sulla diluizione isotopica e permette di quantificare 26 diversi composti con un limite di rilevabilità di circa 0,5 ng/m³. L'Agenzia sta anche contribuendo ai lavori di un gruppo Uni che si affianca al Cen (Comitato europeo di normazione) per lo sviluppo di standard analitici.

La protezione dai contaminanti nel biota

Oltre ai Pfas, i laboratori Arpav si dedicano all'analisi di altri inquinanti, come i composti organici persistenti (Pops), tra cui i Pbde (polibromodifenileteri). Questi composti, pur avendo una bassa idrofilità, si accumulano nei sedimenti e risalgono la catena alimentare, concentrandosi nel biota, ovvero pesci e molluschi, rendendoli utili indicatori di contaminazione. Il monitoraggio ha

rivelato una diffusa contaminazione da Pbde in tutti i corsi d'acqua della pianura veneta. Arpav ricerca anche altri composti bromurati, definiti ritardanti antinfiamma emergenti (eBfr) dall'Efsa, come il decabromodifeniletano (Dbdpe), le cui concentrazioni sono risultate le più elevate tra gli eBfr analizzati. Un'altra classe di sostanze analizzate sono i policlorotriifenili (Pct), che sono stati esaminati nel biota e hanno un destino simile ai più noti policlorobifenili (Pcb). L'analisi di queste sostanze richiede tecniche sofisticate, come la cromatografia gassosa ad alta risoluzione (Hrgc-Hrms), che consente di trattare matrici complesse come il biota.

Controlli sui prodotti e ricerca del norovirus

I laboratori Arpav sono anche attivi nel controllo di prodotti di consumo nell'ambito dei regolamenti europei Reach e Clp. Annualmente vengono analizzati circa 80 campioni per verificare la presenza di sostanze Svhc (*substances of very high concern*) in articoli come l'abbigliamento sportivo. Vengono anche condotti controlli sui composti silossanici (D4, D5, D6) nei cosmetici e in altri

prodotti chimici, con restrizioni che si estenderanno ulteriormente nel 2026. Per il controllo sul campo, il personale di Arpav utilizza la spettroscopia di fluorescenza a raggi X (Xrf) portatile, una tecnica non distruttiva che permette di identificare rapidamente specie metalliche come piombo, cadmio e arsenico in oggetti come gioielli e giocattoli. Questa strumentazione consente di eseguire numerosi test in poco tempo, decidendo in tempo reale quali campioni prelevare per analisi più approfondite in laboratorio. Parallelamente, Arpav svolge un ruolo cruciale a supporto della sanità pubblica, in particolare nella ricerca del norovirus nelle acque destinate al consumo umano. La presenza di questi virus, che sono tra gli agenti più comuni di gastroenteriti, è ora obbligatoria da valutare secondo le normative europee. Poiché il norovirus non si coltiva facilmente in laboratorio, l'analisi si basa su metodi molecolari per la rilevazione dell'Rna virale. L'intero processo analitico è complesso, costoso e richiede personale specializzato, per questo viene utilizzato principalmente per indagini mirate durante focolai epidemiologici.

A cura del **Laboratorio di Arpa Veneto**

LA RETE NAZIONALE DEI LABORATORI ACCREDITATI SNPA

UNA RETE AL SERVIZIO DELLA TUTELA DELL'AMBIENTE

La rete nazionale dei laboratori accreditati del Sistema nazionale per la protezione ambientale (Snpa), come previsto dalla legge 132/2016, costituisce un pilastro fondamentale dell'architettura della protezione ambientale in Italia.

Mediante l'armonizzazione dei sistemi di conoscenza, delle modalità di monitoraggio e controllo nonché attraverso l'accreditamento delle prove dei laboratori, la rete contribuisce a rendere i dati ambientali affidabili, comparabili e tecnicamente validi.

Il Snpa, per le proprie attività ordinarie e straordinarie, ricorre in via prioritaria alla rete nazionale dei laboratori interni anche al fine di assicurare economie per attività che presentino natura di elevata complessità e specializzazione.

I laboratori accreditati del Snpa sono tenuti ad applicare i metodi elaborati e approvati dal Sistema nazionale come metodi ufficiali di riferimento.



FOTO: ARPA SARDEGNA

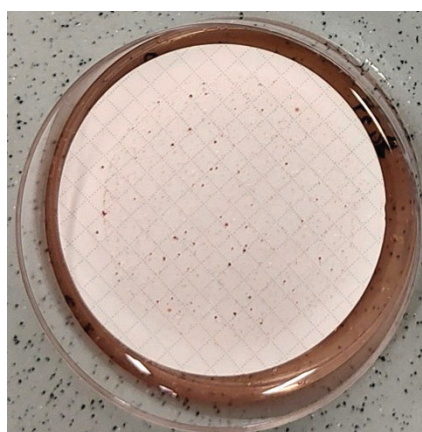
LO STUDIO DELL'ANTIMICROBICO RESISTENZA IN VALLE D'AOSTA

IL LABORATORIO DI ARPA VALLE D'AOSTA HA MESSO A PUNTO LE METODICHE ED EFFETTUATO I PRIMI SCREENING PER LA RICERCA IN ACQUE SUPERFICIALI E REFLUE DI RESIDUI DI ANTIBIOTICI E DI BATTERI RESISTENTI AGLI ANTIBIOTICI, NELL'AMBITO DI STRATEGIE DI PREVENZIONE, MONITORAGGIO E CONTENIMENTO IN OTTICA ONE HEALTH.

L'antimicrobico-resistenza (Amr) è definita come la capacità di un microorganismo di sopravvivere e moltiplicarsi nonostante la presenza di uno o più farmaci antimicrobici che normalmente sarebbero in grado di eliminarlo o di inibirne la crescita. L'Amr può essere intrinseca (naturalmente legata alla struttura o fisiologia del microorganismo) oppure acquisita, tramite mutazione spontanea o in seguito a eventi di trasferimento genico orizzontale e infine adattativa, ovvero transitoria e indotta da condizioni ambientali sfavorevoli. L'Amr è oggi riconosciuta dall'Organizzazione mondiale della sanità (Oms) come una delle maggiori minacce per la salute pubblica globale, poiché compromette l'efficacia delle terapie e aumenta la mortalità e i costi sanitari. Le strategie di prevenzione, monitoraggio e contenimento dell'Amr devono essere basate su una prospettiva *One health*, riconoscendo che la salute umana, quella animale e l'ambiente nel suo complesso sono intrinsecamente connessi e interdipendenti.

L'ambiente e la trasmissione dell'Amr

L'attenzione si sta concentrando sempre di più sul ruolo dell'ambiente nello sviluppo, nella trasmissione e nella diffusione dell'Amr. L'utilizzo massivo di antibiotici causa da un lato lo sviluppo e la persistenza in ambiente di batteri resistenti e di geni di resistenza e dall'altro il rilascio di notevoli quantità dei diversi antibiotici e dei relativi metaboliti. Le molecole raggiungono poi le acque reflue urbane e gli impianti di depurazione senza essere di solito completamente rimosse. Gli antibiotici e i metaboliti vengono quindi immessi nei corsi d'acqua superficiali, nei laghi o nei mari tramite le acque trattate oppure nei suoli, tramite l'utilizzo dei fanghi di

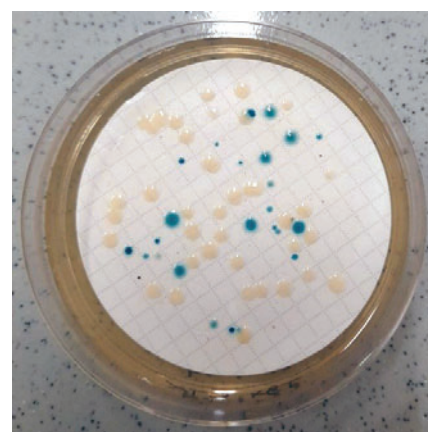


1

depurazione in agricoltura. L'esposizione dei batteri a concentrazioni sub-inibitorie di antibiotici negli ambienti acquatici rappresenta uno dei principali stimoli per la selezione di batteri resistenti. In tale contesto, *Escherichia coli* produttore di β -lattamasi a spettro esteso (*extended spectrum β -lactamase*, Esbl) è stato individuato dall'Oms come indicatore chiave per il monitoraggio dell'Amr in ambiente.

Lo screening

Nel 2024, il laboratorio di microbiologia di Arpa Valle d'Aosta ha deciso di effettuare un primo screening per la ricerca di *E. coli* produttore di Esbl in acque superficiali e in acque reflue in uscita dagli impianti di depurazione. Il protocollo analitico applicato è stato quello pubblicato nel 2021 dall'Oms noto come protocollo Tricycle (*Who integrated global surveillance on Esbl-producing E. coli using a "One Health" approach: implementation and opportunities*). Il principio su cui si basa il metodo è quello di considerare come *E. coli* produttori di Esbl quei batteri capaci di crescere su terreno di coltura selettivo contenente l'antibiotico Cefotaxime (cefalosporina di terza generazione) che vengono



2

poi confermati e identificati come appartenenti alla specie *E. coli* tramite identificazione biochimica. L'obiettivo di questa prima fase sperimentale è stato quello di indagare l'eventuale presenza di *E. coli* produttore di Esbl calcolandone anche la percentuale rispetto agli *E. coli* totali (resistenti e non) e di mettere a punto le tecniche analitiche per filtrazione e per spatolamento. I campioni analizzati sono stati in tutto 34 e in tutti è stato rilevato *E. coli* produttore di Esbl. A novembre 2024, l'Istituto superiore di sanità (Iss) ha diffuso il protocollo "Conta di microrganismi resistenti agli antibiotici in acque reflue urbane mediante esame colturale". Nel corso del 2025, il laboratorio ha quindi proseguito le indagini applicando tale protocollo per la ricerca e la quantificazione di *E. coli* Esbl produttori, *E. coli* resistenti ai carbapenemi e enterococchi resistenti alla vancomicina scegliendo di monitorare

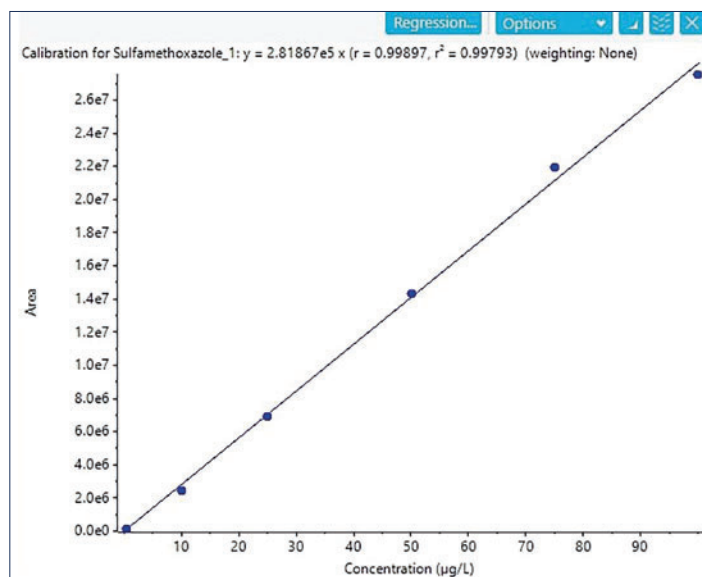
- 1 Colonie di enterococchi resistenti alla vancomicina (rosso mattone) su terreno Slanetz-Bartley agar con aggiunta di vancomicina.
- 2 Colonie di *Escherichia coli* produttore di Esbl (blu-verdi) su terreno Tryptone Bile X-Glucuronide agar con aggiunta di cefotaxime.
- 3 Sstrumento Uplc-Hrms-Ms in dotazione presso il laboratorio di chimica organica e inorganica di Arpa Valle d'Aosta.

con cadenza settimanale le acque reflue in ingresso e in uscita di due impianti di depurazione valdostani. Gli impianti oggetto di studio sono stati scelti perché i più significativi sulla base del consumo territoriale di antibiotici dei comuni da essi serviti. Per quanto riguarda le metodiche analitiche, è stata utilizzata la tecnica per spatolamento per i reflui in ingresso e la tecnica per filtrazione per i reflui in uscita. In tutti i campioni (40 in totale) è stata riscontrata la presenza di *E. coli* Esbl produttori e enterococchi resistenti alla vancomicina mentre in nessun campione è stato rilevato *E. coli* resistente ai carbapenemi. Grazie alla tecnologia Maldi-Tof applicata nell'ultima parte del progetto, è stato infine possibile identificare accidentalmente alcune colonie di *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi.

Il lavoro svolto dal laboratorio di chimica organica e inorganica di Arpa Valle d'Aosta a partire dal 2024 ha avuto come finalità la messa a punto di un metodo per la ricerca di alcuni antibiotici scelti applicando uno schema di prioritizzazione partendo dai dati di prescrizione e consumo forniti dall'Azienda unità sanitaria locale Valle d'Aosta, sulla base della frequenza di rilevamento e della stabilità e persistenza delle molecole a livello regionale e nazionale. È stato individuato un primo pool di antibiotici: azitromicina, claritromicina, amoxicillina, ciprofloxacina, sulfametossazolo, trimetoprim, ofloxacina e cefazolina.

FIG. 1
SULFAMETOSSAZOLO

Curva di taratura del sulfametossazolo (strumento Sciex 6500+ software Sciex Analyst data e Sciex OS).



Il laboratorio ha proseguito sviluppando e ottimizzando un metodo multiresiduo, sensibile e selettivo per l'ottenimento dei dati utili per la valutazione della tossicità per gli organismi acquatici e per la salute umana. La tecnica prevede l'impiego di una cromatografia liquida a ultra prestazione, accoppiata a una spettrometria di massa a triplo quadrupolo. Il metodo di riferimento normato (Uni En Iso 21676:2021) per la determinazione degli antibiotici sulle matrici acquose con la tecnica Uplc-Hrms/Ms è stato validato per le molecole sopra citate. Il metodo sviluppato è stato inizialmente applicato a campioni provenienti dal depuratore dell'ospedale, al fine di valutare la presenza e di valutare l'eventuale quantificazione delle molecole

in una matrice particolarmente rilevante dal punto di vista sanitario. Tuttavia l'elevata complessità della matrice ospedaliera ha evidenziato una forte variabilità tra i risultati analitici, che non rispettavano i criteri di ripetibilità e di recupero stabiliti in fase di progettazione del metodo.

Per questo motivo si è ritenuto necessario indirizzare il monitoraggio verso matrici più stabili e omogenee quali gli ingressi e le uscite degli impianti di depurazione regionali a uso civile e industriale. Questi rappresentano un punto strategico per la valutazione della presenza degli antibiotici in quanto ricevono e trattano acque reflue contenenti residui farmaceutici, provenienti da diverse fonti, incluso ospedali, comunità urbane e attività industriali.

Esaminare il contenuto degli affluenti delle acque reflue fornisce un'indicazione del peso comunitario della resistenza antimicrobica, nonché cosa potrebbe essere scaricato nell'ambiente.

Nel corso del primo semestre del 2025, dopo le prove di pretrattamento del campione (stabilizzazione del pH e filtrazione su filtri in fibra di vetro) e una preliminare estrazione in fase solida per la preconcentrazione degli analiti, le analisi sui campioni hanno evidenziato la presenza di alcune molecole confermando l'efficacia del metodo sviluppato.

I dati ottenuti sono risultati robusti e con ripetibilità e recupero entro i limiti di accettabilità definiti.

A cura del laboratorio di Chimica organica e inorganica e del laboratorio di Biologia, microbiologia e virologia di Arpa Valle d'Aosta



IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE DI ARPA LIGURIA

LA STRUTTURA SI OCCUPA DI SORVEGLIANZA AMBIENTALE E ANTIMICROBICORESISTENZA E FA PARTE DELLA RETE DI SORVEGLIANZA DELL'OMS PER IL POLIOVIRUS. L'ESPERIENZA ACCUMULATA RAPPRESENTA UN PUNTO DI FORZA PER CONSOLIDARE UN APPROCCIO INTEGRATO CHE UNISCE RICERCA, SANITÀ PUBBLICA E PROTEZIONE AMBIENTALE.

L'antimicrobico-resistenza (Amr) è una minaccia crescente e trova nei reflui urbani un importante serbatoio di diffusione. Il laboratorio di biologia molecolare di Arpal, attivo dal 2020, consente di integrare la sorveglianza ambientale con quella sanitaria. Il monitoraggio sistematico dei depuratori liguri rappresenta un tassello chiave per ricerca, prevenzione e tutela della salute collettiva, come sottolineato dalla nuova direttiva Acque reflue UE/2024/3019, che dispone per tutti i Paesi dell'Unione europea l'obbligo di monitoraggio dei nuovi agenti patogeni nelle acque reflue urbane e dell'Amr.

Un problema globale che passa dall'ambiente

Gli antibiotici hanno rivoluzionato la medicina, ma l'uso eccessivo e non controllato ha favorito la comparsa di batteri resistenti. L'antimicrobico-resistenza (*antimicrobial resistance*) è oggi

una delle principali minacce per la salute pubblica a livello mondiale.

La resistenza non resta confinata agli ospedali. Residui di antibiotici, batteri resistenti e geni di resistenza finiscono nelle acque reflue urbane e arrivano agli impianti di depurazione. Da qui possono diffondersi nell'ambiente, contribuendo a creare veri e propri serbatoi di resistenza antimicrobica. L'uso in campo veterinario e negli allevamenti intensivi è stato segnalato come una delle pratiche che maggiormente contribuiscono alla diffusione del fenomeno. L'impatto antropico si somma alle origini naturali dell'Amr, amplificando il rischio di diffusione di microrganismi difficili da contrastare.

Il valore della water-based epidemiology

La *wastewater-based epidemiology* (Wbe) si basa sul monitoraggio delle acque reflue come indicatore della circolazione di agenti patogeni in una popolazione. È

una disciplina giovane, ma ha dimostrato la sua efficacia durante la pandemia da Sars-cov-2, quando l'Ue ha richiesto agli Stati membri di attivare sistemi di sorveglianza attraverso le acque (reflue in primis, ma anche acque superficiali). L'approccio consente di individuare precocemente l'andamento nella popolazione della presenza di patogeni (virus e batteri), anche prima che vengano diagnosticati nei contesti clinici. Oggi la Wbe è riconosciuta come strumento predittivo e di prevenzione, utile per orientare strategie di sanità pubblica e per valutare l'impatto ambientale della diffusione dei geni di resistenza.

Il Piano nazionale e la strategia regionale

L'Italia ha inserito la sorveglianza ambientale dell'Amr tra le priorità del Piano nazionale di contrasto all'antimicrobico-resistenza 2023–2028. Il piano prevede il monitoraggio delle acque reflue e superficiali per individuare

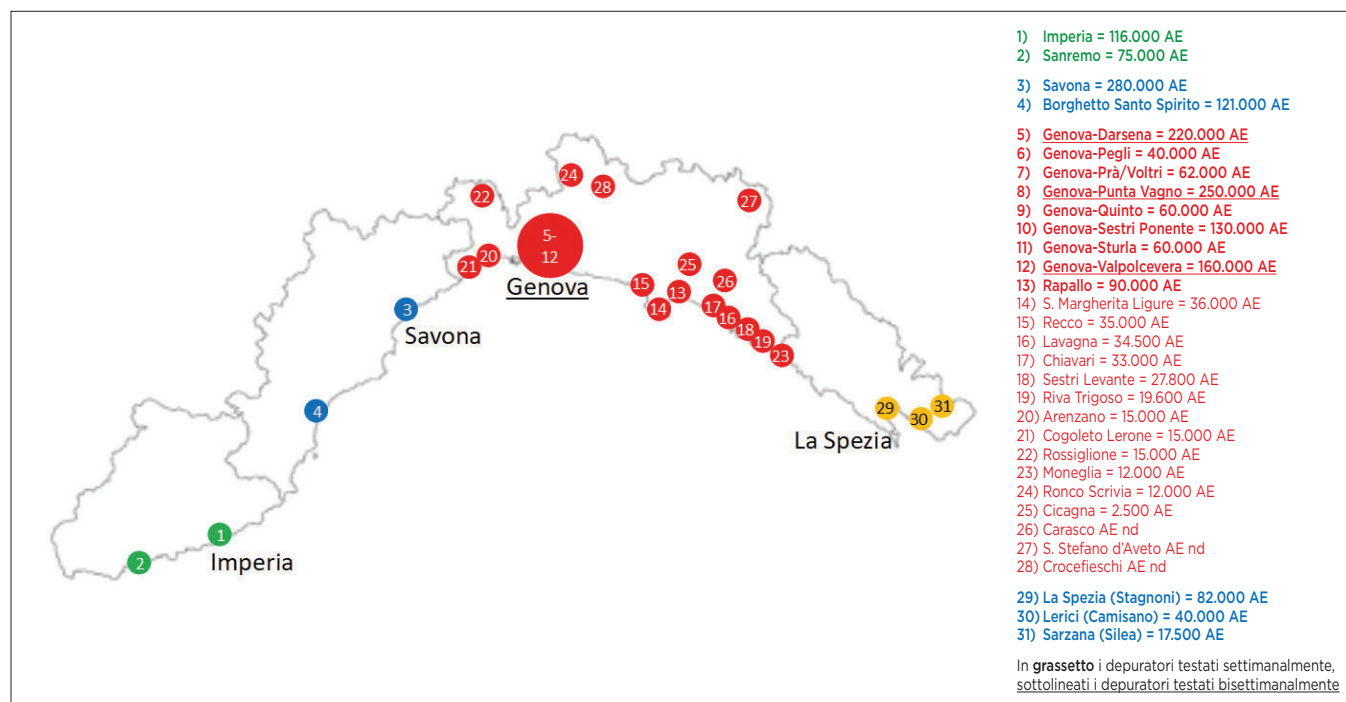


FIG. 1 DEPURATORI TESTATI IN LIGURIA

antibiotici, microrganismi resistenti e geni di resistenza.

La Regione Liguria ha recepito queste indicazioni a dicembre 2023, individuando in Arpal il soggetto incaricato del monitoraggio ambientale. Il compito è duplice: aumentare le conoscenze disponibili e fornire dati a supporto delle strategie di prevenzione, in stretto coordinamento con il Ministero della Salute, l'Istituto superiore di sanità (Iss) e il Sistema sanitario regionale (Ssr).

Il laboratorio di biologia molecolare di Arpal

Per rispondere a queste sfide, nel 2020 Arpal ha avviato un nuovo laboratorio di biologia molecolare, nato in piena pandemia da Covid-19. Il monitoraggio del Sars-cov-2 attraverso i reflui è diventato obbligatorio per tutti i Paesi Ue nel 2021 a seguito dell'entrata in vigore della raccomandazione (Ue) 2021/472 relativa alla sorveglianza sistematica del Sars-cov-2 e delle sue varianti nelle acque reflue.

La struttura di Arpal è dotata di strumentazione avanzata per l'analisi dei geni e delle sequenze microbiche, compresi i sequenziatori di nuova generazione, che permettono di caratterizzare rapidamente microrganismi resistenti.

Il laboratorio non si limita all'analisi di routine: sviluppa e sperimenta metodiche innovative, in linea con gli indirizzi dell'Istituto superiore di sanità. In collaborazione con l'Università di Genova sono stati attivati dottorati di ricerca finalizzati a perfezionare metodi analitici e protocolli da estendere a livello nazionale.

Dal progetto pilota alla sorveglianza sistematica

Nel periodo 2020–2024 le attività si sono concentrate sulla messa a punto di protocolli sperimentali. La capacità tecnica acquisita da Arpal è stata fondamentale, ad esempio, per l'adozione a livello nazionale del protocollo di sorveglianza ambientale del Sars-cov-2. Arpal ha avuto un ruolo di primo piano anche nella definizione del protocollo nazionale di rilevazione dei geni di Amr e nella messa a punto del nuovo metodo per rilevare la presenza di poliovirus nelle acque reflue, nell'ambito della rete di sorveglianza internazionale di questo patogeno, innovando – in collaborazione con Iss – il metodo proposto dall'Oms. Dal 2024 il laboratorio ha avviato la sorveglianza sistematica dei principali depuratori liguri, per valutare la prevalenza dell'antibioticoresistenza

nell'ambiente e collegare questi dati alla sorveglianza ospedaliera e sanitaria regionale. L'integrazione tra fonti diverse è considerata strategica per avere una visione più completa della circolazione dei patogeni e dei geni di resistenza.

Sfide e prospettive

Il monitoraggio ambientale dell'Amr presenta diverse sfide: la complessità della matrice reflua, la necessità di distinguere tra microrganismi vitali e Dna libero, la standardizzazione dei metodi tra laboratori, l'individuazione dei geni di resistenza che maggiormente rappresentano criticità a livello sanitario. Tuttavia, le opportunità sono significative. Arpal fa già parte della rete di sorveglianza ambientale mondiale dell'Oms per il poliovirus, con controlli

quindicinali sui principali depuratori regionali. L'esperienza accumulata rappresenta un punto di forza per consolidare un approccio integrato che unisce ricerca, sanità pubblica e protezione ambientale.

L'antimicrobicoresistenza è una sfida globale che richiede risposte multilivello. La Liguria, attraverso Arpal, contribuisce a costruire un modello che mette insieme innovazione tecnologica, collaborazione scientifica e attenzione alla salute collettiva.

Elena Nicosia¹, Elisabetta Delponte²

Arpa Liguria

1. Ruo Biologia e Tossicologia

2. Elisabetta Delponte, Uo Staff Dg

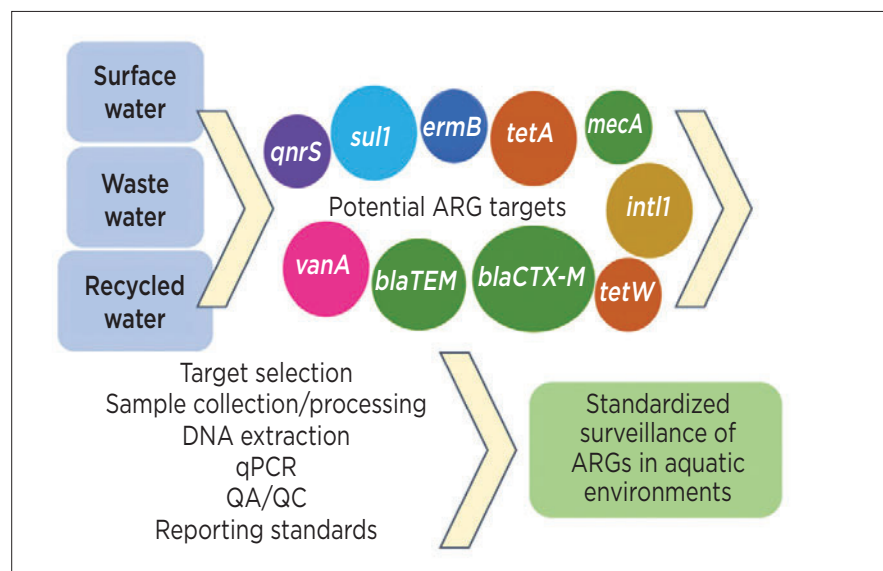


FIG. 2 SCHEMA DI WASTEWATER-BASED EPIDEMIOLOGY

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Who, 2023, *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (Glass) report*.

Rizzo L. et al., 2013, "Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review", *Science of the Total Environment*, 447:345–360.

Who, 2017, *Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance*.

European Commission, 2021, *Commission recommendation on a common approach to establish a systematic surveillance of Sars-cov-2 and its variants in wastewaters in the Eu*.

Ecdc, 2022, *Wastewater surveillance in the Eu – Lessons from Sars-cov-2*.

Ministero della Salute, 2023, *Piano nazionale di contrasto all'antimicrobico-resistenza (Pncar) 2023–2028*.

Regione Liguria, 2023, *Piano regionale di contrasto all'antibioticoresistenza*.

Arpal e Università di Genova, 2022, *Progetti di ricerca e dottorati sul monitoraggio ambientale dell'antibioticoresistenza [documentazione interna]*.

Iss, 2021, *Sorveglianza ambientale Sars-cov-2 attraverso reflui urbani*.

Who, 2024, *Global polio environmental surveillance network – annual report*.

STUDI INNOVATIVI DI ARPA FVG SULLE ACQUE REFLUE URBANE

I LABORATORI DI ARPA FVG, CON STRUMENTAZIONE ALL'AVANGUARDIA, MISURANO L'EFFICACIA DEI DEPURATORI NELL'ABBATTERE OLTRE 40 FARMACI IN TRACCE, ANCHE CON ANALISI UNTARGET. L'AGENZIA MONITORA PURE L'ANTIBIOTICO RESISTENZA (MICRORGANISMI E GENI), USANDO METODI CULTURALI, MALDI-TOF, RT-PCR E SEQUENZIAMENTO DEL DNA.

Il Laboratorio di Arpa Friuli Venezia Giulia esegue analisi chimiche, chimico-fisiche, ecotossicologiche e microbiologiche su molteplici matrici: acqua, aria, rifiuti, suoli e alimenti. Un lavoro complesso, che richiede prestazioni analitiche di rilievo, indispensabili per produrre dati scientifici affidabili come risultato del lavoro di monitoraggio, di vigilanza e controllo ambientale e sanitario, nonché di supporto tecnico-scientifico effettuate dall'Agenzia. A tale scopo il laboratorio utilizza strumentazione analitica all'avanguardia, dispone di personale formato e motivato, ed è accreditato ai sensi della norma Uni Cei En Iso/Iec 17025 per la quasi totalità delle prove che esegue. Nel corso degli anni, la struttura ha sviluppato un approccio proattivo, necessario per adeguarsi alla continua evoluzione normativa e tecnologica, indispensabile per affrontare le sempre più sfidanti problematiche ambientali.

Depuratori, un'interfaccia critica tra attività antropica ed ecosistemi

Gli scarichi degli impianti di trattamento delle acque reflue urbane costituiscono uno dei punti di ingresso nell'ambiente delle molecole prodotte e utilizzate dall'uomo, tra cui quelle dei farmaci e degli antibiotici. L'efficienza di questi impianti nell'abbattimento degli inquinanti è quindi un fattore importante per minimizzare l'impatto dell'attività umana sugli ecosistemi.

La legislazione ambientale ha posto una sempre maggiore attenzione su questa problematica. Il primo gennaio del 2025 è entrata in vigore la direttiva (Ue) 2024/3019 del Parlamento europeo e del Consiglio, riguardante il trattamento delle acque reflue urbane, che concede 31 mesi ai Paesi membri per recepirla nelle rispettive legislazioni nazionali.



Essa costituisce un passo avanti verso gli obiettivi di neutralità energetica e climatica, allineandosi ai dettami del *green deal* europeo. La direttiva pone maggiore attenzione sull'inquinamento proveniente dagli agglomerati urbani più piccoli, sottolineando inoltre l'importanza dell'efficienza dei trattamenti quaternari degli impianti di depurazione. Quest'ultimi permettono la drastica riduzione di inquinanti che, fino a ora, non sono stati presi in considerazione per

la loro difficoltà di depurazione, ma che possono comportare anche un notevole disequilibrio nell'ecosistema legato alla matrice acqua.

Viene a tal fine stabilito un cronoprogramma per l'applicazione del requisito di abbattimento di almeno l'80% di uno spettro di molecole, prevalentemente farmaci in tracce. L'immissione nell'ambiente di molecole di antibiotici è poi una delle cause della diffusione di microrganismi

a loro resistenti, capaci cioè di sopravvivere o svilupparsi in presenza di una concentrazione di antibiotici che normalmente sarebbe in grado di uccidere o inibire germi della stessa specie.

L'antibiotico-resistenza è uno dei problemi principali per la salute pubblica, e l'importanza del suo monitoraggio ambientale viene sempre più sottolineata dalla letteratura scientifica, trovando un crescente riscontro nella normativa. La direttiva (Ue) 2024/3019 del Consiglio sottolinea l'opportunità di introdurre un monitoraggio obbligatorio dell'antibiotico-resistenza, oltre che la ricerca di virus, nelle acque reflue urbane, mentre in ambito nazionale il Pncar (Piano nazionale di controllo dell'antibiotico resistenza) sottolinea anche l'importanza di disporre di metodi standardizzati e di protocolli condivisi per controllare questo fenomeno, anche nel campo ambientale.

innovativa, concepita per eseguire uno screening delle molecole eventualmente presenti nel campione, senza scegliere a priori quali cercare, come avviene con il tradizionale approccio *target*.

Per il monitoraggio dei farmaci nelle acque è stata utilizzato lo stato dell'arte della strumentazione analitica di ultima generazione, la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa-Orbitrap, e software dedicati per l'analisi *untarget*, gestita da personale con una formazione specifica in questo settore.

Con logica proattiva rispetto all'introduzione della direttiva specifica sopra citata, nel 2023 è stato implementato un primo studio su tre impianti di depurazione di acque reflue urbane, opportunamente scelti in quanto ricevanti anche scarichi ospedalieri, per valutare l'abbattimento di oltre quaranta farmaci di vario tipo.

Lo studio ha evidenziato una generale difficoltà nel raggiungere l'obiettivo



2

La progettualità di Arpa Fvg sulle acque reflue urbane

Già nel 2015 Arpa Fvg aveva avviato un primo studio sulla presenza di sostanze difficilmente degradabili negli impianti di depurazione, coinvolgendo l'Università degli Studi di Udine, quella di Parma e l'Irccs Istituto di ricerche farmacologiche "Mario Negri".

Nel 2016 il laboratorio di Arpa Fvg era stato individuato da Ispra, assieme a quello di Arpa Lombardia, come riferimento nazionale per la ricerca degli inquinanti emergenti previsti dalla *watch list*, introdotta dalla normativa comunitaria l'anno precedente.

Il laboratorio di Arpa Fvg ha quindi acquisito negli anni una notevole esperienza nel settore della ricerca dei farmaci, sia nelle acque superficiali sia in quelle di scarico, con analisi sia qualitative, mirate cioè alla rilevazione della presenza delle molecole nei campioni analizzati, sia quantitative, progettate cioè per determinarne la concentrazione, con approcci analitici sia *target* sia *untarget*.

L'analisi *untarget* è stata introdotta nel laboratorio nel 2020 e utilizza una tecnica

COSA PREVEDE LA DIRETTIVA 2024/3019 (DAL 2027)

Obiettivo

La direttiva (UE) 2024/3019 rivede le norme dell'Unione europea sul trattamento delle acque reflue urbane nell'ambito del piano d'azione sull'inquinamento zero e degli obiettivi del *green deal* europeo.

Le nuove norme rafforzano i requisiti per la raccolta, il trattamento e lo scarico di acque reflue urbane, al fine di proteggere l'ambiente e la salute umana, in linea con l'approccio *One health*. La direttiva estende l'ambito di applicazione dei requisiti sul riutilizzo dell'acqua e sulla neutralità energetica per il trattamento delle acque reflue, stabilendo norme per il monitoraggio delle acque reflue per quanto riguarda i parametri sanitari e per l'accesso ai servizi igienico-sanitari per tutti, e rafforzando il principio "chi inquina paga".

La nuova direttiva sostituirà la precedente 91/271/CEE a decorrere dal 1° agosto 2027.

Punti chiave

Gli agglomerati con oltre 1.000 abitanti equivalenti (a.e.) devono raccogliere e trattare le acque reflue, corrispondente a una riduzione della soglia di 2.000 rispetto alle norme precedenti.

Tutti gli agglomerati sopra i 2.000 a.e. devono avere reti fognarie collegate a tutte le fonti di acque reflue domestiche.

Gli agglomerati tra 1.000 e 2.000 a.e. dovranno adeguarsi entro il 31 dicembre 2035.

Gli agglomerati sopra i 100.000 a.e. dovranno avere un piano integrato di gestione entro il 2033, quelli a rischio, ovvero tra 10.000 e 100.000 a.e., entro il 2039.

Tipi di trattamento

- Trattamento secondario: rimozione della materia organica biodegradabile. Obbligatorio entro il 2035 per agglomerati oltre i 1.000 a.e..

- Trattamento terziario: rimozione di azoto e fosforo. Introdotti livelli di rimozione più severi.

Applicazione per impianti di agglomerati ≥150.000 a.e. (30% degli impianti entro il 2033; 70% entro il 2036; 100% entro il 2039).

Estensione a tutti gli impianti di agglomerati ≥10.000 a.e. entro il 2045, con tappe intermedie.

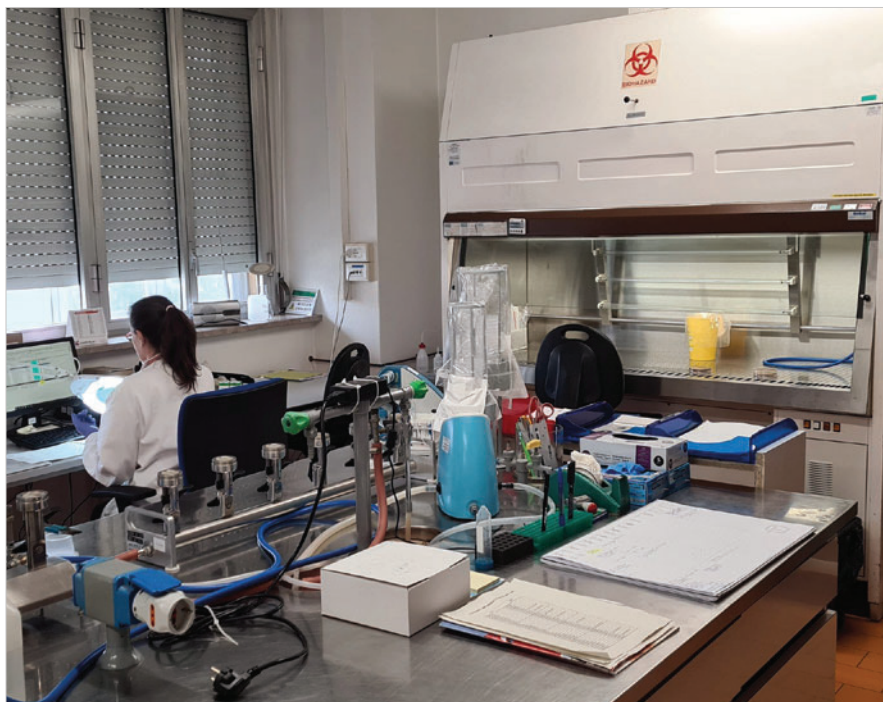
- Trattamento quaternario: rimozione di microinquinanti.

Per impianti ≥150.000 a.e. (20% entro il 2033; 60% entro il 2039; 100% entro il 2045).

Il trattamento primario (rimozione fisica dei solidi) non viene citato nella direttiva perché ritenuto non sufficiente per la protezione dell'ambiente; la direttiva, infatti, eleva il trattamento secondario (biologico) a standard minimo per agglomerati >1.000 a.e.

1 Laboratorio microinquinanti organici, sistemi Hplc e lc accoppiati a spettrometro di massa a trappola orbitale.

2 Laboratorio microinquinanti organici, sistema Hplc accoppiato a spettrometro di massa a tempo di volo.



3

di abbattimento dell'80% della concentrazione di inquinanti previsto dalla normativa, per quanto riguarda le acque reflue derivanti da impianti di trattamento privi della depurazione quaternaria (processo avanzato di depurazione progettato per la rimozione dei microinquinanti).

Nel 2024 lo studio è stato esteso a ulteriori cinque impianti di depurazione di acque reflue urbane, che ha confermato la difficoltà nel raggiungere gli stringenti requisiti previsti dalla nuova normativa, in assenza di un trattamento quaternario. Parallelamente a questi studi innovativi, Arpa Fvg ha implementato un progetto pilota, concepito per monitorare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza nelle acque reflue del Friuli Venezia Giulia, cercando non solo le molecole di antibiotici, ma anche i microrganismi resistenti e il materiale genetico capace di veicolare l'antibiotico-resistenza.

Nel 2024 sono state analizzate le acque in ingresso e in uscita di cinque depuratori, scelti tra quelli ricevuti anche scarichi ospedalieri, le acque superficiali a valle degli stessi e un ulteriore centinaio di acque di scarico in uscita da altri impianti di depurazione.

Per l'esecuzione di questo progetto pilota il laboratorio di Arpa Fvg ha messo a punto diversi metodi analitici,

comprendenti i metodi colturali classici, la tecnologia Maldi-Tof (*Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight*), la Rt-Pcr Multiplex e il sequenziamento del Dna.

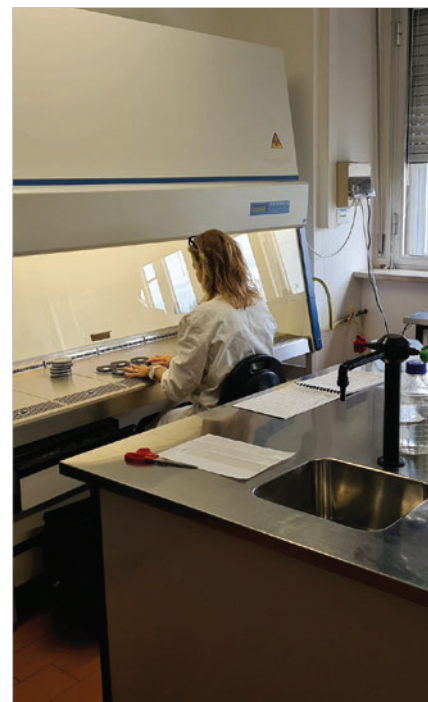
Il metodo colturale classico viene utilizzato per monitorare la presenza di *Escherichia coli* resistenti alle cefalosporine di terza generazione (cefotaxime), utilizzando il *Tricycle protocol*, un protocollo tecnico sviluppato dall'Organizzazione mondiale della sanità nel 2021, riconosciuto internazionalmente.

È stata rilevata una generale tendenza all'abbattimento della carica di *Escherichia coli* resistenti nei depuratori, con una riduzione anche di diversi ordini di grandezza della loro concentrazione nelle acque in uscita agli impianti, rispetto a quelle in ingresso.

Il Maldi-Tof è una tecnica di spettrometria di massa che permette l'identificazione diretta delle specie batteriche resistenti, e la conferma della resistenza batterica alle cefalosporine, tramite conferma fenotipica.

La tecnologia Maldi-Tof e i metodi colturali classici vengono applicati all'analisi di colonie batteriche pure, mentre i metodi molecolari permettono l'identificazione dei geni coinvolti nei meccanismi dell'antibiotico-resistenza provenienti da diversi microrganismi, presenti nel campione di acqua da analizzare.

Nell'ambito dello studio è stata utilizzata la metodica Rt-Pcr multiplex per la rilevazione di otto classi di geni coinvolti



4

nella resistenza nei confronti di tre classi di antibiotici (carbapenemi, vancomicina e cefalosporine), nella totalità della flora batterica presente. La maggior parte dei campioni analizzati è risultata essere positiva per i geni Kpc, Ctx-M e Oxa-48, tutti portatori di resistenza.

Sempre per quanto riguarda i metodi molecolari, il sequenziamento del Dna con la tecnologia di nuova generazione Ngs (*Next generation sequencing*) ha consentito l'ampliamento del pannello analitico dei geni responsabili dell'antibiotico-resistenza, confermando comunque i risultati ottenuti con le altre metodiche. Sono stati identificati 137 geni e due loro varianti.

I dati finora raccolti da Arpa Fvg in questo progetto pilota sono in linea con quanto suggerito dalla letteratura scientifica, e nel 2025 le analisi sono state estese a ulteriori cinque impianti di depurazione, mentre le analisi molecolari vengono orientate anche verso la dimensione quantitativa.

L'implementazione di questi studi innovativi dimostra la volontà di Arpa Fvg di mantenere un ruolo propositivo nell'ambito del Sistema nazionale per la protezione dell'ambiente, per continuare a garantire ai cittadini servizi di qualità sempre al passo coi tempi.

Alessandro Marotta, Sara Briguglio, Vito Gelao, Michele Bazzichetto, Sebastiano Muscia, Antonella Felice, Marco Minocci

Laboratorio Arpa Friuli Venezia Giulia

3 Laboratorio di microbiologia, analisi acque potabili.

4 Laboratorio di microbiologia, ricerca legionella.

TECNICHE INNOVATIVE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

IL CENTRO REGIONALE DI BIOLOGIA, AMBIENTE E SALUTE DI ARPA PIEMONTE SVOLGE, OLTRE ALLE ATTIVITÀ ISTITUZIONALI, ANCHE INDAGINI SPERIMENTALI IN CAMPO AMBIENTALE, UTILIZZANDO TECNOLOGIE E STRUMENTAZIONI INNOVATIVE E TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI E SEQUENZIAMENTO NGS.

Il Centro regionale di biologia, ambiente e salute (Crbas) di Arpa Piemonte svolge, oltre alle attività istituzionali di controllo e monitoraggio, come ad esempio le analisi microbiologiche delle acque potabili e il monitoraggio dei pollini e delle spore aerodispersi, anche indagini sperimentali in campo ambientale utilizzando tecnologie e strumentazioni innovative, che impiegano tecniche analitiche molecolari, ovvero tecniche di indagine basate sulla ricerca di Rna/Dna di organismi "target". In particolare, tali indagini sono state condotte utilizzando tecniche di amplificazione di acidi nucleici e di sequenziamento Ngs.

Amplificazione acidi nucleici in campioni ambientali

Una delle tecniche molecolari più interessanti applicate alle indagini in campo ambientale è rappresentata dalla *polymerase chain reaction* (Pcr) che permette, partendo anche da un numero esiguo di copie di filamenti di acido nucleico (Dna o Rna), di creare milioni di copie (amplificazione) del tratto di materiale genetico di interesse consentendo di verificare la presenza degli organismi ricercati nei campioni

esaminati e, in alcune condizioni, consentirne la quantificazione. Questa tecnica trova applicazioni pratiche in svariati ambiti ambientali e il Crbas ha potuto sviluppare alcune esperienze in particolare nel monitoraggio delle acque reflue.

Sorveglianza della presenza di virus respiratori nei reflui urbani tramite Real time-Pcr

Il monitoraggio di Sars-cov-2 nei reflui urbani è stato oggetto, nell'anno 2021, della raccomandazione 2021/472 dalla Commissione europea [1] e nell'anno 2024 è stato incluso nella direttiva 2024/3019 concernente il trattamento delle acque reflue urbane [2] come approccio complementare e indipendente alle altre strategie utilizzate fino a quel momento per la sorveglianza di Sars-cov-2.

Attraverso la sorveglianza nei reflui urbani si ha una fotografia obiettiva e a basso costo della presenza e quantità virale in un preciso arco temporale, in modo imparziale, senza distorsioni dei dati influenzate dal numero di soggetti sintomatici o asintomatici. Questo approccio è comunemente chiamato *wastewater based epidemiology* (Wbe) [3, 4].

A partire da aprile 2021 Arpa Piemonte ha avviato un programma di sorveglianza

della presenza di Sars-cov-2 nelle acque reflue. Il Crbas ha analizzato settimanalmente le acque reflue in ingresso ai principali depuratori del Piemonte, utilizzando un approccio analitico implementato dal laboratorio (figura 1).

L'approccio analitico adottato prevede la ricerca di Rna virale attraverso le fasi di concentrazione, estrazione e purificazione degli acidi nucleici totali (Tna) e in seguito di amplificazione di geni virali target mediante analisi multiplex Rt-real time Pcr.

Il metodo è in grado di rilevare oltre ai geni virali target del Sars-cov-2 (gene E/ gene N1) anche l'Rna del *Pepper mild mottle virus* (Pmmov) utilizzato sia come controllo di processo sia come parametro per la normalizzazione dei dati. L'analisi fornisce un valore numerico (Ct) associato alla presenza dei geni ricercati e può essere utilizzato per definire un andamento della presenza di Sars-cov-2 nelle acque per ogni depuratore (figura 2). Alcuni risultati di queste analisi sono confluiti in una pubblicazione, nella quale si evidenzia che l'Rna virale può essere riscontrato nelle acque reflue prima di quanto si evidenzi a livello di popolazione con la diagnosi laboratoristica su tamponi, avvalorando il vantaggio nell'impiego di questo metodo nella sorveglianza ad ampio spettro [6].

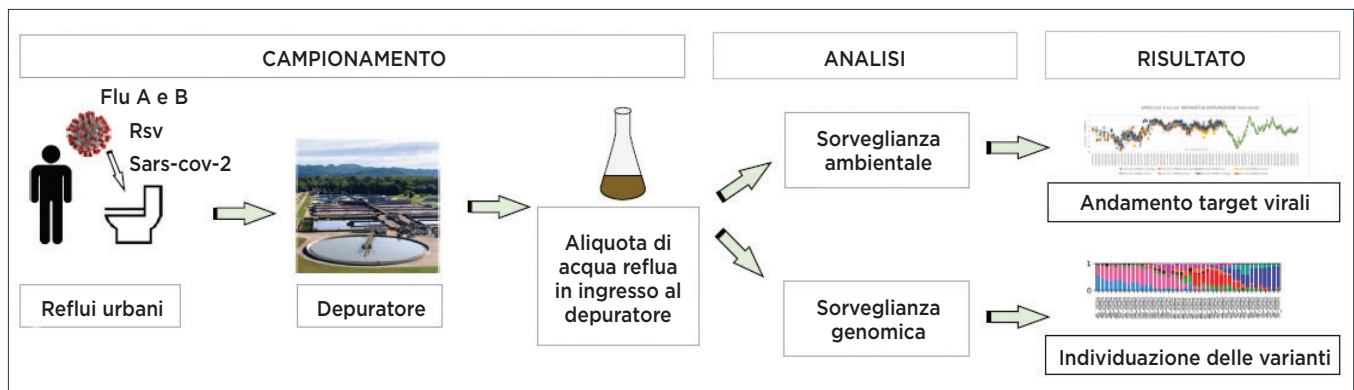


FIG. 1 SORVEGLIANZA AMBIENTALE E GENOMICA

Approccio analitico utilizzato dal laboratorio di biologia molecolare di Arpa Piemonte per la sorveglianza ambientale e genomica di alcuni virus respiratori

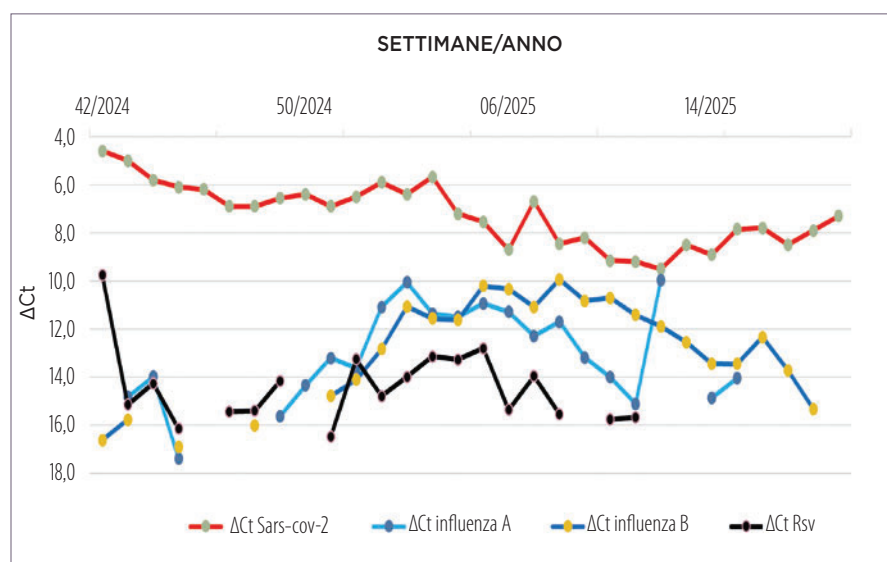


FIG. 2 WASTEWATER-BASED EPIDEMIOLOGY

Andamento della presenza di Sars-cov-2, influenza A, influenza B e Rsv nelle acque reflue nel depuratore di Castiglione Torinese dalla 42esima settimana del 2024 alla 19esima settimana del 2025.

Dal 2022, oltre a Sars-cov-2, sono stati monitorati nelle acque reflue in ingresso al principale depuratore della Città metropolitana di Torino (Castiglione Torinese), con il medesimo approccio analitico, i virus dell'influenza A, B e Rsv (*respiratory syncytial virus*) (figura 2). I risultati del monitoraggio sono stati utilizzati dall'Azienda sanitaria locale della Città di Torino per popolare l'ambito ambientale del sistema di sorveglianza integrata degli agenti patogeni virali respiratori (Siprev). Il Siprev - Cdt è strutturato su diversi ambiti che si integrano (figura 3):

- sorveglianza integrata, microbiologica ed epidemiologica, per Covid-19, Asl Città di Torino
- sorveglianza RespiVirNet, Asl Città di Torino
- monitoraggio delle sindromi respiratorie virali gravi e complicate nei pazienti ricoverati nei reparti di terapia intensiva dell'Asl Città di Torino
- sorveglianza delle sindromi respiratorie

e influenzali nel Pronto soccorso dell'Asl Città di Torino

- sorveglianza ambientale di virus respiratori basata sull'analisi dei reflui urbani campionati dal depuratore di Castiglione Torinese da Arpa Piemonte
- sorveglianza basata sugli eventi (Ebs).

I dati di Arpa Piemonte in questo caso hanno contribuito a caratterizzare la diffusione e la rilevanza dei principali virus patogeni respiratori circolanti nella popolazione dell'area metropolitana di Torino nel periodo di sorveglianza sanitaria.

Sequenziamento Ngs

La disponibilità di tecniche di sequenziamento del Dna di seconda generazione ha consentito di decifrare con relativa facilità le sequenze dei target che vengono individuati nei campioni ambientali.

Applicando questa tecnica è possibile individuare, ad esempio, le varianti circolanti di un singolo target virale molto variabile come Sars-cov-2, oppure di avere una panoramica completa di tutte le specie che convivono in un particolare ecosistema.

Identificazione delle varianti di Sars-cov-2 nelle acque reflue

La raccomandazione 2021/472 indicava di monitorare le varianti di Sars-cov-2 eventualmente presenti nei reflui urbani tramite il sequenziamento del genoma del virus.

Presso il Crbas, dal dicembre 2021 sono stati sequenziati i campioni di acidi nucleici estratti dalle acque reflue provenienti dagli impianti di depurazione di Castiglione Torinese, Alessandria, Cuneo e Novara.

Per eseguire il sequenziamento genomico è stato seguito l'approccio di tipo *targeted whole viral genome* che consiste nel sequenziamento di tutto il genoma virale. Il passo successivo al sequenziamento consiste in un insieme di analisi computazionali che prende il nome di analisi bioinformatica con la quale le sequenze generate attraverso il sequenziamento vengono confrontate con la sequenza del genoma di riferimento di Sars-cov-2, universalmente riconosciuto come "Sars-cov-2-Wuhan". Questo confronto permette di individuare variazioni nelle sequenze nucleotidiche generate e, mediante l'uso di banche dati riconosciute e condivise a livello internazionale (ad es. GisaId (<https://gisaid.org/>), Pangolin (<https://pangolin.cog-uk.io/>), Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>), di identificare le varianti presenti. Il lavoro svolto ha portato a una pubblicazione scientifica sul metodo utilizzato per il sequenziamento [7].

Le informazioni ottenute da queste due tipologie di monitoraggio (andamenti



FIG. 3 WASTEWATER-BASED EPIDEMIOLOGY

Ambiti del Siprev (Sistema di sorveglianza integrata degli agenti patogeni virali respiratori) dell'Asl Città di Torino.

tramite rt-Rt-Pcr e le varianti tramite sequenziamento) hanno consentito di avere una visione più completa in merito all'andamento della pandemia, utile alle autorità per attuare interventi ad hoc.

Sorveglianza dei geni che conferiscono resistenza antimicrobica nei reflui urbani e nell'acqua di lago

L'ambiente svolge un importante ruolo nella diffusione dei geni Amr (*antimicrobial resistant gene*, Arg). I microrganismi resistenti sono spesso osservati a concentrazioni più elevate presso alcuni siti, come gli impianti di trattamento dei reflui, considerati una delle principali fonti di agenti antimicrobici e dei relativi metaboliti. L'Unione europea riconosce l'importanza di affrontare il problema della resistenza agli antimicrobici, in particolare attraverso la comunicazione della Commissione del 29 giugno 2017 dal titolo *Piano d'azione europeo One Health contro la resistenza antimicrobica* [8]. Quest'ultima privilegia un approccio integrato e unificante che mira a bilanciare e ottimizzare in modo sostenibile la salute di persone, animali ed ecosistemi. Ulteriormente, la direttiva Acque reflue 2024/3019 ha introdotto un obbligo di monitoraggio della resistenza agli antimicrobici nelle acque reflue urbane al fine di approfondire le nozioni scientifiche e potenzialmente attuare interventi adeguati in futuro [2]. Nel contesto italiano, queste indicazioni sono state recepite nel *Piano nazionale di Contrasto all'antimicrobico-resistenza* (Pncar) [9], con l'obiettivo di fornire le linee strategiche e le indicazioni operative per affrontare l'emergenza dell'Amr seguendo un approccio multidisciplinare e in una visione *One health*. Durante il 2025, il Crbas utilizzando l'analisi di sequenziamento dei geni "per cattura" (*hybrid-capture*) ha eseguito alcune prove preliminari su campioni di acqua reflua in ingresso al depuratore e di acqua di lago, con sonde che si ibridizzano (cioè si legano in modo complementare) agli Arg. Questo approccio è stato ritenuto idoneo per valutare la presenza e l'abbondanza degli Arg in campioni ambientali. L'analisi bioinformatica, in questo caso, consiste nel confrontare le sequenze ottenute con un database di riferimento di geni che conferiscono una resistenza agli antimicrobici. A seguito dell'analisi possono essere elencati gli Arg presenti e, in base a quante sequenze sono state prodotte con il sequenziamento, è possibile calcolare anche l'abbondanza relativa di quel gene rispetto al totale.

Prospettive future

Sempre più frequentemente viene richiesta la possibilità di conoscere e analizzare le comunità microbiche, sia batteriche che fungine, nonché le comunità vegetali e animali in specifici ambienti, come possono essere i suoli o l'acqua di fiumi o laghi. L'analisi del Dna ambientale permette di identificare le specie presenti in un ecosistema, analizzando i frammenti di Dna rilasciati dagli organismi nell'ambiente, senza richiedere la cattura o la manipolazione fisica degli organismi e può essere complementare agli approcci più tradizionali di indagine. Molti progetti di ricerca prevedono l'analisi della biodiversità negli ambienti oggetto di indagine utilizzando come approccio innovativo l'analisi del metabarcoding applicato all'analisi tassonomica. È il caso ad esempio del progetto Ledna promosso dall'Istituto Eth di Zurigo, al quale ha partecipato il Crbas e i cui risultati sono in fase di elaborazione.

Anche il monitoraggio di specie esotiche aliene e invasive o di specie rare o minacciate può essere realizzato attraverso un approccio molecolare, che permette di rilevare organismi difficili da osservare con metodi tradizionali, come pesci rari, insetti o anfibi notturni. Inoltre, come menzionato nella direttiva Acque reflue, la composizione delle

comunità viventi, la diffusione di antimicrobico resistenze possono essere legate ad altri fattori di inquinamento, quali ad esempio la presenza di microplastiche. Anche per questo motivo le microplastiche sono uno dei parametri per i quali la direttiva richiede il monitoraggio. Il laboratorio Crbas sta svolgendo ricerche per l'analisi e la determinazione del contenuto di microplastiche nelle acque con la prospettiva di poter collegare i risultati di queste analisi e fornire informazioni utili per la prevenzione e il contrasto dell'inquinamento e della diffusione di geni per la resistenza agli antimicrobici. Infine, i dati prodotti ad esempio sulla circolazione di un determinato microrganismo patogeno e delle sue varianti possono essere utilizzati come base dati per modelli di diffusione predittivi basati sulla scienza dei sistemi complessi, sulla scienza delle reti, sull'intelligenza artificiale e sulle scienze sociali computazionali.

Carlotta Olivero, Camilla Crasà, Cristina Fedele, Giada Scorza, Maddalena Derosa, Massimo Di Martino, Davide Gallo, Francesca Donnarumma, Claudia Strumia, Enrico Verzotti

Arpa Piemonte

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] Commissione europea, 2021, *Raccomandazione n. 2021/472 della Commissione del 17 marzo 2021 relativa a un approccio comune per istituire una sorveglianza sistematica del Sars-cov-2 e delle sue varianti nelle acque reflue nell'Ue*, https://ec.europa.eu/environment/pdf/water/recommendation_covid19_monitoring_wastewaters.pdf.
- [2] Direttiva UE 2024/3019 del Parlamento e del Consiglio Europeo concernente il trattamento delle acque reflue urbane, <https://eur-lex.europa.eu/IT/legal-content/summary/urban-waste-water-treatment.html>.
- [3] La Rosa G. et al., 2021, "Sorveglianza delle acque reflue. Le prospettive", *Ecoscienza*, 2021, 1:34-35.
- [4] La Rosa G. et al., 2022, "Il sistema di sorveglianza di Sars-cov-2 nei reflui", *Ecoscienza*, 2022, 2:54-59.
- [5] Bortone G., 2022, "Il monitoraggio a supporto delle strategie One health", *Ecoscienza*, 2022, 1:20-22.
- [6] Robotto et al., 2022, "Wastewater-based Sars-cov-2 environmental monitoring for Piedmont, Italy", *Environ Res.*, 203:111901.
- [7] Robotto A. et al., 2024, "Efficient wastewater sample filtration improves the detection of Sars-cov-2 variants: An extensive analysis based on sequencing parameters", *PLoS One*, 2024 19(5):e0304158.
- [8] Commissione Europea, 2017, *Piano d'azione europeo "One health" contro l'antimicrobico resistenza*, https://health.ec.europa.eu/document/download/353f40d1-f114-4c41-9755-c7e3f1da5378_it?filename=amr_2017_action-plan.pdf.
- [9] Ministero della Salute, *Piano nazionale di contrasto all'antibiotico-resistenza (Pncar) 2022-2025*, www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_3294_allegato.pdf.

NUOVA ORGANIZZAZIONE E SPECIALIZZAZIONE IN ARPAS

LA RIORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI ARPA SARDEGNA SEGUE PRINCIPI DI MASSIMA EFFICIENZA, CREA POLI POLISPECIALISTICI E SPECIALIZZATI. I PRINCIPI CHIAVE SONO LA STANDARDIZZAZIONE DEI DATI SU BASE REGIONALE E L'AUTONOMIA GESTIONALE GARANTITA DALLA NUOVA AREA DI DIREZIONE DEI LABORATORI.

L'Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente della Sardegna (Arpas), istituita nel 2006 e pienamente operativa dal 2008, sta vivendo una fase di profonda trasformazione della propria rete laboratoristica. Avviato nel 2015 con la chiusura dei laboratori di Nuoro e Oristano e la centralizzazione delle attività di Sassari, Portoscuso e Cagliari sotto un unico coordinamento tecnico-scientifico, questo percorso evolutivo giunge oggi a una nuova fase: un progetto di riorganizzazione che rafforza il ruolo dell'Agenzia come punto di riferimento pubblico di eccellenza per il controllo ambientale. Il progetto di riorganizzazione, avviato operativamente a gennaio 2025, risponde all'esigenza di massimizzare l'efficienza delle risorse disponibili, eliminando ridondanze e diseconomie.

La nuova configurazione prevede la creazione di due laboratori polispecialistici a Cagliari e Sassari – che gestiscono le analisi chimiche, biologiche e microbiologiche – e un terzo laboratorio specializzato a Portoscuso, dedicato principalmente alle matrici solide e ai microinquinanti inorganici, in considerazione delle pressioni ambientali derivanti dal polo industriale e dalle aree minerarie del territorio.

Questa riorganizzazione, accelerata dall'adeguamento al decreto legislativo 18/2023 sulla qualità delle acque destinate al consumo umano, garantisce uniformità e standardizzazione dei dati su tutto il territorio regionale. Dal 1° marzo 2025, quindi, le analisi delle acque potabili e dei reflui urbani sono processate esclusivamente nei laboratori accreditati Iso/Iec 17025 per diverse prove chimiche e microbiologiche di Cagliari e Sassari. Inoltre, dal 1° aprile

2025, con l'avvio della campagna di monitoraggio, anche i campioni delle acque di balneazione seguono la stessa logica distributiva.

Il laboratorio di Portoscuso, anch'esso accreditato, ma solo per prove chimiche, dal 1° marzo 2025 ha assunto le competenze esclusive a valenza regionale per il monitoraggio delle acque di transizione e marino-costiere, delle acque sotterranee, delle zone vulnerabili ai nitrati e delle deposizioni atmosferiche. In questo quadro riorganizzativo si collocano poi alcune eccellenze che caratterizzano l'Agenzia.

Monitoraggio marino: zooplancton e microplastiche

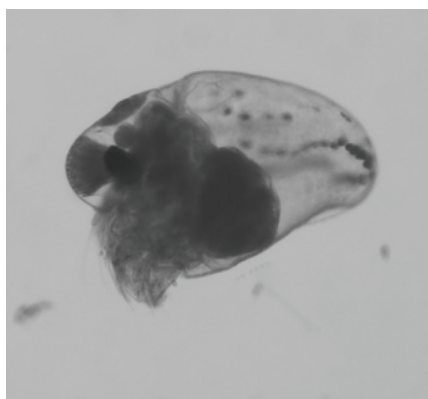
Con oltre 1.800 chilometri di costa, la Sardegna rappresenta un osservatorio privilegiato per lo studio degli ecosistemi marini. In questo contesto, il laboratorio di Sassari ha sviluppato competenze uniche nell'analisi dello zooplancton per l'intero territorio regionale, un'attività fondamentale per la valutazione dello stato ecologico delle acque marine nell'ambito della direttiva quadro sulla Strategia per l'ambiente marino (2008/56/CE), recepita in Italia con il Dl n. 190 del 2010. Lo zooplancton è incluso in 4 degli 11 descrittori previsti



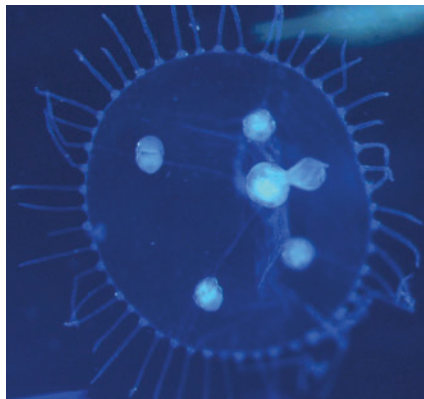
1



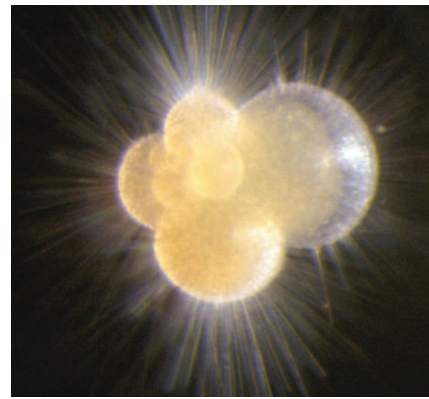
2



3



4



5

al fine di raggiungere il buono stato ecologico ambientale “*good environmental status*” (Ges) delle acque marine costiere. Il mesozooplankton, la componente compresa fra 200 μm e 20 mm, svolge un ruolo fondamentale essendo un importante anello di congiunzione nella catena alimentare. Gli organismi zooplanctonici si nutrono principalmente di fitoplancton, trasferendo l'energia dai produttori primari ai consumatori secondari. Al suo interno vi sono organismi che trascorrono l'intero ciclo vitale (oloplancton), mentre per altri la fase planctonica riguarda soltanto una parte della vita (meroplancton).

In Sardegna, il monitoraggio del mesozooplankton, iniziato nel 2015, viene effettuato stagionalmente lungo sette transesti disposti intorno all'isola. Su ciascun transetto sono presenti tre punti di prelievo, situati a 3, 6 e 12 miglia dalla costa. I campioni vengono raccolti utilizzando un retino standard tipo Wp2, con vuoto di maglia da 200 μm . Quelli destinati all'analisi quali-quantitativa vengono fissati con una soluzione di etanolo al 70% e glicerina al 5%, e analizzati entro due settimane. I campioni utilizzati per la determinazione della biomassa (peso fresco e peso secco) vengono invece analizzati entro 24 ore dalla raccolta. La determinazione dei vari taxa viene effettuata, ove possibile fino al livello di specie, mediante osservazione allo stereomicroscopio e al microscopio ottico. Tutti i dati prodotti dalle diverse Arpa regionali vengono trasmessi all'Ispira, che ne cura l'elaborazione.

Le indagini svolte hanno permesso di raccogliere un'ampia quantità di dati, utili allo studio delle variazioni spaziali e temporali. Considerando i prelievi effettuati tra il 2022 e il 2024, l'analisi delle abbondanze relative dei tre principali gruppi – *Copepoda*, *Cladocera* e “altro zooplankton” (che comprende meroplancton e altri taxa dell'oloplancton) – evidenzia come i copepodi rappresentino la classe sistematica più rilevante del mesozooplankton.

Questi ultimi costituiscono, quasi sempre, almeno il 70% della densità totale e risultano anche il gruppo con il maggior numero di taxa. Tale ricchezza specifica rende i copepodi particolarmente adatti per effettuare valutazioni ambientali¹. Non si osservano variazioni significative

1-2 Copepodi.

3 Cladoceri.

4-5 Altro zooplankton.

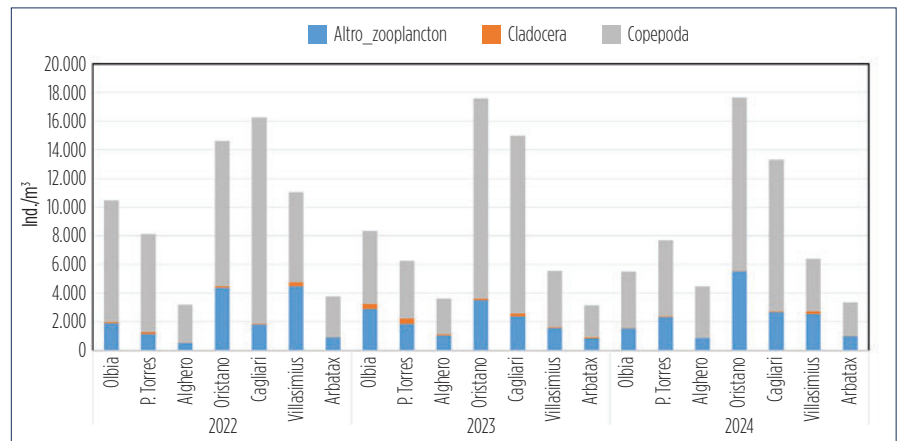


FIG. 1 MONITORAGGIO ZOOPLANKTON

Abbondanze assolute/anno per transetto (2022-2023-2024).

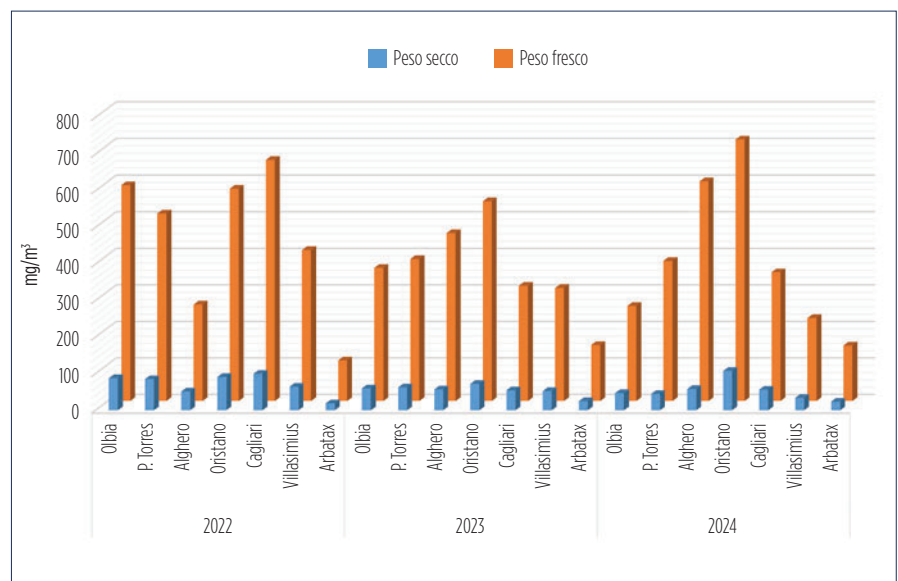


FIG. 2 MONITORAGGIO ZOOPLANKTON

Valori di biomassa/anno per transetto (2022-2023-2024).

nei valori assoluti registrati nei tre anni considerati. È tuttavia evidente dalla figura 1 che i valori più elevati si riscontrano nei transesti di Oristano e Cagliari, mentre i minimi sono associati al transetto di Arbatax. Considerazioni analoghe valgono anche per i valori di biomassa (figura 2), espressi sia in peso fresco che in peso secco, analizzati per anno e per transetto.

Le informazioni ottenute rappresentano un contributo rilevante al monitoraggio continuo del mesozooplankton nella valutazione della biodiversità planctonica. I risultati sottolineano l'importanza di proseguire tali attività per comprendere più a fondo le dinamiche ecologiche e i potenziali effetti dei cambiamenti climatici sugli ecosistemi marini.

Sempre nell'ambito del progetto Strategia marina i laboratori Arpas effettuano anche il monitoraggio delle microplastiche in mare tramite analisi

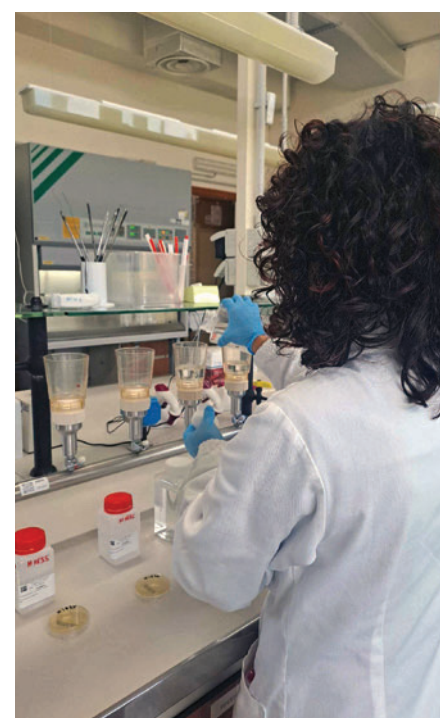


FOTO: ARPA SARDEGNA

quantitative e di identificazione delle particelle in base alla loro forma. A ciò si aggiunge la partecipazione del Centro regionale amianto (Cra) e del laboratorio geologico-petrografico del Dipartimento geologico dell'Arpas al progetto "Ricerca di microplastiche in pesci allevati in Sardegna e contributo alla valutazione del rischio sanitario per il consumatore", insieme a Izs della Sardegna, Università di Sassari e Laboratorio nazionale di riferimento per le biotossine marine. Arpas ha collaborato con Izs per lo sviluppo dei protocolli per la digestione dei tessuti e ha effettuato l'analisi in spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier accoppiata a microscopio (micro-Ftir) del digestato per l'identificazione delle diverse tipologie di microplastiche presenti nei pesci di allevamento. Lo studio ha riguardato 4 allevamenti di maricoltura della Sardegna e i risultati sono pubblicati sul sito web dell'Agenzia².

Innovazione tecnologica: microscopia correlativa

A fine gennaio 2025 il laboratorio geologico petrografico e Centro regionale amianto sono stati integrati; ciò ha portato alla creazione di un polo di eccellenza unico nel panorama nazionale, capace di fornire risposte analitiche integrate per problematiche ambientali complesse che si esprime anche tramite la recente acquisizione di un innovativo sistema di "Microscopia correlativa ottica-elettronica automatica e semi-automatica". Il sistema è costituito da una piattaforma hardware e software che consente di combinare, in un unico metodo di analisi, le informazioni ottenute da un microscopio ottico in luce polarizzata trasmessa e riflessa, con quelle composizionali e morfologiche ottenute con un microscopio elettronico a scansione (Sem) con spettrofotometro a dispersione di energia (Eds), in maniera automatica tramite un apposito porta-campioni, utilizzabile in entrambi gli strumenti e semi-automatica con immagini acquisite senza porta-campioni e tramite un unico software. Il software è in grado di gestire immagini di grandi dimensioni sfruttando le caratteristiche diagnostiche e analitiche di entrambe le tecniche, oltre a poter consentire la sovrapposizione di immagini provenienti da strumenti diversi (*multi-layer*) combinando le differenti risultanze analitiche. Un esempio di utilizzo della piattaforma di microscopia correlativa ottico-



FOTO: ARPAS SARDEGNA

elettronica è la ricerca degli elementi critici (es terre rare, cobalto, titanio ecc.) importanti nella transizione energetica; infatti le potenzialità del microscopio ottico, che permette il riconoscimento di minerali caratteristici il cui contenuto di elementi critici è noto, è fortemente integrato con le potenzialità analitiche puntuali del Sem anche con l'utilizzo di immagini geo-riferite, acquisite con i due strumenti, con possibilità di eseguire mappature analitiche utili all'individuazione su tutta la superficie del preparato di detti elementi critici. L'attività descritta rientra negli obiettivi del Progetto Carg geotematico Foglio Guspini che il Dipartimento geologico in collaborazione con il laboratorio Geo-Cra sta eseguendo per conto dell'Ispira. Arpas, infatti, riveste il ruolo di Servizio geologico della Regione Sardegna.

Organizzazione e governance

Con il passaggio al contratto collettivo regionale, avvenuto nel 2025, si evidenzia un ulteriore elemento di innovazione organizzativa. Arpas è la prima Agenzia del sistema nazionale per la protezione dell'ambiente (Snpa) ad aver istituito una Direzione area dei laboratori come struttura autonoma, disgiunta dalla Direzione tecnico-scientifica. Questa configurazione organizzativa, unica nel panorama nazionale, garantisce

maggiore autonomia gestionale e operativa, pur mantenendo il necessario coordinamento tecnico-funzionale. La Direzione area dei laboratori assicura così l'indirizzo strategico e il coordinamento delle tre sedi laboratoristiche, ottimizzando l'utilizzo delle risorse e garantendo standard qualitativi uniformi su tutto il territorio regionale. La nuova configurazione laboratoristica di Arpas rappresenta dunque un modello di riferimento per il Sistema nazionale, coniugando specializzazione territoriale, innovazione tecnologica e rigore metodologico al servizio della tutela ambientale e della salute pubblica in Sardegna.

Massimo Secchi¹, Emanuela Venturini², Roberto Lonis³, Giovanni Antonio Mocchi⁴

Arpa Sardegna

1. Area dei Laboratori
2. Servizio qualità dei laboratori e procedure operative
3. Laboratorio geologico-petrografico e Centro di riferimento regionale amianto
4. Laboratorio di Sassari

NOTE

¹ *Msfid Summary Report*, 2024

² www.sardegnaambiente.it/documenti/21_393_20240110151038.pdf