

METODI INNOVATIVI NELLA VALUTAZIONE DI CONTAMINAZIONE DELLE ACQUE DI BALNEAZIONE: ESPERIENZE IN ITALIA

Annalaura Carducci (a), Giuseppina La Rosa (b), Lucia Bonadonna (b), Rossella Briancesco (b), Elisabetta Suffredini (c), Anna Maria Coccia (b), Simonetta Della Libera (b), Marco Verani (a), Ileana Federigi (a), Lorenzo Cioni (d), Marcello Iaconelli (b), Giusy Bonanno Ferraro (b), Pamela Mancini (b), Emanuele Ferretti (b), Luca Lucentini (b), Liana Gramaccioni (e)

(a) Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Pisa

(b) Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(d) Scuola Normale Superiore, Pisa

(e) Direzione Generale della Prevenzione, Ministero della Salute, Roma

Introduzione

La normativa sulle acque di balneazione (1), in vigore da oltre 10 anni, attua il controllo igienico sanitario di queste sulla base dei due indicatori di contaminazione fecale *E. coli* ed enterococchi intestinali i cui valori limite derivano da studi epidemiologici.

Dopo dieci anni di applicazione di tale normativa è possibile rilevare alcune criticità, sulle quali è aperto un dibattito per arrivare a una revisione della direttiva. Innanzitutto, il giudizio di balneabilità è basato su indicatori la cui presenza e quantità non sono correlate a quelle dei patogeni, soprattutto virali (2). È ormai noto che la presenza degli indicatori fecali assume un significato diverso a seconda delle fonti di contaminazione (umane o animali), imponendo l'individuazione di queste e la valutazione della loro importanza relativa (*Microbial Source Tracking*). I valori limite imposti dalla direttiva derivano da studi epidemiologici in aree selezionate e, quindi, non rappresentative di tutti i contesti e le condizioni climatiche, peraltro in evoluzione a causa dei cambiamenti in atto. Le analisi microbiologiche colturali richiedono tempi di esecuzione troppo lunghi (minimo 18 ore) per segnalare tempestivamente inquinamenti di breve durata. La classificazione delle aree si basa su un numero di campioni troppo basso per evitare rischi di sovra o sottostima e di «artifici» per evitare declassamenti (es. le chiusure programmate a seguito di piogge). Per di più il sistema di classificazione considera il 95° percentile per la classe eccellente e buona e il 90° per la sufficiente, creando evidenti confusioni, e per la stima di tali valori non tiene in considerazione il tipo di distribuzione.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) (3), esaminate tali criticità e le ipotesi di soluzione, raccomanda di mantenere gli stessi indicatori fecali e gli stessi limiti come base per il giudizio di balneabilità, senza l'aggiunta di altri parametri (es. i virus), e gli stessi livelli di classificazione. Tuttavia, consiglia di rivedere il sistema di classificazione considerando il 95° percentile per tutti i livelli, aumentare il numero minimo annuale dei campioni per ogni punto da 4 a 20 e verificare che la distribuzione dei dati nei siti sia log-normale, su almeno 80 campioni.

Comunque, fra i temi da approfondire la WHO segnala l'identificazione di un indicatore o di un patogeno virale, la ricerca dei vibrieni e l'applicazione della valutazione quantitativa del rischio microbiologico (*Quantitative microbial risk assessment*, QMRA), già testata in ambito regolatorio in California (USA) e Alberta (Canada).

Su questi temi nel 2018 è stato finanziato un progetto da parte del Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie (CCM) del Ministero della Salute dal titolo “Supporto alla implementazione di analisi di rischio in acque potabili e balneazione e gestione del sistema informativo portale acque”, comprendente due unità:

- 1) Istituto Superiore di Sanità: Studio pilota di ricerca e quantificazione di patogeni batterici (vibrioni) e virali (adenovirus e norovirus) in parallelo agli indicatori (*Escherichia coli* ed Enterococchi intestinali, batteriofagi) su alcune aree balneabili interessate da particolari criticità.
- 2) Università di Pisa: Studio pilota mediante *Quantitative Microbial Risk Assessment* (QMRA) in base alle linee guida WHO applicate ad acque di balneazione.

Materiali e metodi

Sono state oggetto di studio due aree localizzate rispettivamente sulla costa adriatica settentrionale (Comune di Riccione in provincia di Rimini) e sulla costa tirrenica centrale (Comune di Ardea in provincia di Roma) con caratteristiche geomorfologiche, idrodinamiche e di pressione antropica simili. Per ciascun sito sono stati prescelti 3 punti di prelievo, situati rispettivamente a destra e a sinistra di un corpo idrico afferente alla costa e comunque all'interno di un'area adibita a balneazione. Il terzo punto è stato selezionato a circa 50 mt di fronte alla foce dell'immissario. Fra le aree balneabili interessate, negli ultimi anni due sono state classificate insufficienti (Riccione Foce Marano sud e Ardea Rio Grande) e una risulta buona (Riccione Foce Marano Nord).

Sono stati effettuati campionamenti con cadenza mensile, da maggio a settembre 2018; in totale sono stati prelevati e analizzati 20 campioni da aree balneabili e 10 campioni da foci.

I campioni sono stati analizzati per la determinazione di indicatori di contaminazione virale (colifagi somatici). Sono stati inoltre ricercati:

- Patogeni quali vibrioni e o Coliformi a 37°C, *E. coli*: metodo colturale miniaturizzato in MPN Colilert 18 (IDEXX);
- Enterococchi intestinali: metodo colturale miniaturizzato in MPN Enterolert E (IDEXX).
- Colifagi somatici: metodo delle placche di lisi, ISS A 008B rev.00 (4).
- *Vibrio* spp: filtrazione su membrana, coltura su substrato Chromatic Vibrio (Liofilchem), screening mediante test biochimici e identificazione con tecniche biochimiche (VITEK 2 Compact) e molecolari (PCR e sequenziamento genico).
- Virus enterici: adenovirus (AdV), norovirus (NoV), enterovirus (EV) e aichivirus (AiV), mediante metodi molecolari quantitativi (Real-Time qPCR) e qualitativi (nested e RT-nested-PCR).

Nelle stesse aree è stata applicata la QMRA, come riportato nelle linee guida WHO (5). Questa metodologia, analoga a quella di stima del rischio chimico, stima il rischio di infezione/malattia partendo dalle concentrazioni ambientali di patogeni (misurate o stimate) e dai volumi/vie di esposizione, usando specifiche curve dose-risposta. L'incertezza derivante dalla scarsa precisione dei dati disponibili viene gestita attraverso l'uso di modelli che includono funzioni di probabilità per le variabili coinvolte e stime mediante analisi Monte Carlo che consiste nella simulazione di 10.000 iterazioni successive, cambiando in modo casuale i valori delle variabili nell'ambito delle distribuzioni che le rappresentano. L'applicazione della QMRA ad acque ricreative è in continuo aumento e contribuisce a risolvere varie criticità (6). Nel presente progetto essa è stata applicata per verificare se il rischio così stimato corrispondesse a quanto indicato dalla classificazione ai sensi della direttiva.

Poiché i dati sui patogeni erano insufficienti per la stima di funzioni di probabilità, sono stati utilizzati i dati sulle concentrazioni di *Escherichia coli* derivanti dal monitoraggio routinario disponibili dai *Bollettini stagionali di ARPAE Emilia Romagna* e dai *Bollettini Ufficiali della Regione Lazio* dal 2011 al 2018 per stimare le concentrazioni di Norovirus, Rotavirus, *Salmonella* e Adenovirus utilizzando differenti fattori di conversione.

Risultati

Nei campioni prelevati in corrispondenza delle aree adibite a balneazione, le concentrazioni dei tradizionali indicatori di contaminazione fecale (*E. coli* e Enterococchi) sono risultate entro i limiti previsti dal DL.vo 116/2008 nel 70% (14/20) dei campioni, mentre 6 campioni hanno mostrato difformità per *E. coli* e/o Enterococchi.

Positività per virus enterici sono state riscontrate in 11/20 (55%) campioni, di cui 6 risultavano conformi sulla base degli indicatori fecali di contaminazione. Norovirus è stato identificato in 5/20 (25%) dei campioni, a basse concentrazioni (fino a 3.2 copie genomiche (g.c.)/L). Aichivirus è stato identificato in 6/20 (30%) campioni con elevate concentrazioni (fino a 1.100 g.c./L.) Un solo campione è risultato positivo per enterovirus (non quantificabile), mentre nessuna positività è stata riscontrata per adenovirus in acque di balneazione.

I colifagi somatici sono stati identificati in 10/20 acque di balneazione, a concentrazioni elevate nel mese di agosto (2120 PFU/100 mL) con una media di 36 PFU/100 mL e 280 PFU/100 mL nella costa adriatica e tirrenica. In 8 campioni è stata trovata presenza simultanea di virus enterici e colifagi somatici.

I batteri del genere *Vibrio* (prevalentemente *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. campbellii*) sono stati osservati in 17/20 (85%) campioni, sia ad Ardea sia a Riccione, in concentrazioni fino a $1,7 \times 10^4$ UFC (Unità Formanti Colonie)/100 mL.

Come era da attendersi, in prossimità delle foci sono stati riscontrati valori più elevati sia per gli indicatori di contaminazione fecale (fino a oltre 4800 MPN/100 mL per *E. coli* e 2827 MPN/100 mL per enterococchi intestinali) sia per i virus enterici, identificati nel 70% dei campioni di acque di estuario. In particolare, sono stati identificati NoV nel 30% dei campioni (concentrazioni fino a 13 g.c./L) e AiV nel 60% dei campioni (concentrazioni fino a 1860 g.c./L). Anche gli adenovirus sono stati identificati in acque non balneabili (2/10 campioni, 20%); i campioni positivi, seminati su cellule A549 non hanno prodotto effetto citopatico, a indicare assenza di adenovirus vitali oppure coltivabili (tipi 40 e 41). I colifagi somatici sono stati identificati in 7 campioni di foce, 6 dei quali contenevano anche virus enterici.

Infine, batteri del genere *Vibrio* erano ubiquitari e abbondanti (fino a $1,0 \times 10^4$ UFC/100 mL, media $2,7 \times 10^3$ UFC/100 mL), con presenza di 8 diverse specie, di cui *V. alginolyticus* prevalente.

L'applicazione della QMRA ha consentito di stimare una probabilità media di malattia a Riccione dello 0,9% alla Foce Marano Nord e dell'1% alla Foce Marano Sud: questa differenza è in accordo con la differenza di classificazione. Nel caso di Ardea (Rio Grande) il rischio di malattia (0,2%) appare invece inferiore anche a quello del punto Marano Nord, in contrasto con la classificazione "insufficiente".

Conclusioni

Lo studio ha evidenziato alcune delle criticità rilevate dalla WHO, confermando la necessità di ulteriori ricerche. Infatti, la positività per patogeni sia batterici sia virali di acque a norma secondo la Direttiva attuale ha confermato la scarsa rappresentatività degli indicatori fecali, e la diffusa presenza di virus e vibroni. Di particolare rilievo la frequente rilevazione di Aichivirus, per la prima volta ricercati in acque di mare, a conferma della circolazione idrica di tali virus.

L'applicazione della QMRA appare utile per integrare la classificazione ai sensi della direttiva con una stima di rischio, anche se attualmente è limitata dalla scarsità di dati specifici sui patogeni. Infatti, l'uso degli indicatori per stimare le concentrazioni di patogeni introduce un ulteriore fattore di incertezza, anche se è al momento l'unica possibilità.

Bibliografia

1. Europa. Direttiva del 15 febbraio 2006 n. 2006/7/CE relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e che abroga la direttiva 76/160/CEE. *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee* L 64 del 4 marzo 2006.
2. Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, Höller C, de Roda Husman AM, Kay D, Kozyra I, López-Pila J, Muscillo M, José Nascimento MS, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk R, Wyer M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res* 2011;45(3):1025-38.
3. WHO. WHO recommendations on scientific, analytical and epidemiological developments relevant to the parameters for bathing water quality in the Bathing Water Directive (2006/7/EC). Geneva: World Health Organization;2018.
4. Bonadonna L, Ottaviani M. *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/5).
5. WHO. *Quantitative Microbial Risk Assessment: Application for Water Safety Management*. Geneva: World Health Organization;2016.
6. Federigi I, Verani M, Donzelli G, Cioni L, Carducci A. The application of quantitative microbial risk assessment to natural recreational waters: A review. *Mar Pollut Bull* 2019;144:334-50.