



CENTRO NAZIONALE
SICUREZZA DELLE ACQUE

A Francesca Torracca
Direttore S.C. Igiene e Sanità
Pubblica
Dipartimento di Prevenzione,
Azienda Sociosanitaria Ligure 5
francesca.torracca@asl5.liguria.it

pc Elena Nicosia
Tutela della salute negli
ambienti di vita e di lavoro
via Fieschi 17, 16121 Genova
elena.nicosia@regione.liguria.it

Ivana Defabiani
Direttore S.C. Igiene degli
alimenti e Nutrizione
Dipartimento di Prevenzione
Azienda Sociosanitaria Ligure 5
ivana.defabiani@asl5.liguria.it

Pasqualino Rossi
Direttore Ufficio 4 DG-PREV
p.rossi@sanita.it

Oggetto: analisi per la ricerca di rotavirus ed altri virus enterici in campioni di acqua di mare e acque da canali di raccolta acque superficiali, comune di Lerici (La Spezia): relazione conclusiva

Vista la richiesta avanzata da codesta Azienda finalizzata ad ottenere il parere dell'Istituto Superiore di Sanità e tenuto conto che l'Istituto esprime il proprio parere, di natura tecnico-scientifica avuto riguardo esclusivamente alle notizie ed agli elementi forniti dallo stesso richiedente, si rappresenta quanto segue.

In data 01.09.2023, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) è stato contattato dall'Azienda Sociosanitaria Ligure n° 5 Dip. Prevenzione S.C. Igiene e Sanità Pubblica per fornire supporto per un'indagine ambientale finalizzata alla ricerca di virus enterici in campioni di acqua in zone di balneazione nel comune di Lerici (La Spezia), a seguito di numerose segnalazioni di gastroenteriti causate dal rotavirus, che hanno coinvolto bambini di età compresa tra 2 e 8 anni in alcune località del Comune di Lerici. La richiesta di supporto per le analisi ambientali è stata inviata via PEC all'ISS, con Prot. ASL5 n., 35188.

In data 01.09.2023, si è svolta una videoconferenza tra l'Asl, l'ISS e l'Università di Pisa per un primo aggiornamento sull'epidemia in corso e la sua possibile relazione con aree di balneazione. Durante l'incontro l'ISS ha confermato la sua disponibilità ad eseguire le analisi necessarie, sottolineando tuttavia la necessità e urgenza di condurre preliminarmente un'istruttoria tecnica da parte di ASL/ARPAL sulle fonti di pressione ambientale presenti nel territorio del Comune di Lerici, con particolare attenzione agli arenili delle località di San Terenzo e della frazione Venere Azzurra. L'istruttoria tecnica, richiesta da Asl il 02/09/2023 (Prot. ASL N. 35217), è stata inviata all'ISS da ARPAL tramite mail in data 05/09/2023, con protocollo ARPAL n. 24919 del 04/09/2023.

In data 02.09.2023, nel corso di un'ispezione condotta dall'ASL, è stato prelevato un campione all'interno del canale di raccolta di acque superficiali presso l'arenile «Venere Azzurra». Questo campionamento è stato eseguito, su richiesta del Servizio Igiene Alimenti e Nutrizione della Asl, dal personale tecnico di ACAM Acque di La Spezia, presente sul luogo per eseguire operazioni di spurgo, svolte su incarico del Comune di Lerici, a causa di sospette infiltrazione di scarichi non censiti. Il campione è stato raccolto alle ore 11.30 circa e identificato con il codice 40/1. Il campione è stato

inviato in condizioni refrigerate all'ISS in data 04.09.2023, accompagnato dal verbale di prelievo (Prot. ASL N. 35335).

In data 04.09.2023 si è tenuta una videoconferenza tra i rappresentanti dell'ISS, dell'ASL, dell'ARPA, della Regione Liguria, del Ministero della Salute e dell'Università di Pisa, con l'obiettivo di pianificare le attività di campionamento e analisi. A seguito delle rilevazioni acquisite in sede ispettiva dalle autorità sanitarie ed ambientali, è stato concordato di programmare le attività di campionamento ambientale per il 6 settembre. I dettagli relativi ai luoghi e agli orari del campionamento sono stati trasmessi all'ISS dall'Asl5 tramite PEC il 4 settembre (prot. ASL N. 35413) (protocollo ISS AOO-ISS-05/09/2023-0039991 Class: CENSIA 01.00).

In data 06.09.2023 il personale dell'ISS ha effettuato 5 campionamenti di acque di mare e di acque provenienti da canali di raccolta acque superficiali presso gli arenili delle località di San Terenzo e della frazione Venere Azzurra. Un ulteriore campione (bianco) è stato raccolto in una località distante dalle aree coinvolte nell'evento epidemico (spiaggia di San Giorgio). Sono stati inoltre raccolti 3 campioni di sabbia presso i canali in località S. Terenzo e venere Azzurra, oltre a un "bianco" prelevato a Lerici, dietro Casello. La Figura 1 mostra la mappa dell'area oggetto di indagine. Dettagli sui campionamenti effettuati sono illustrati in Tabella 1.

Tabella 1. Campionamenti effettuati da personale ISS presso i siti di San Terenzo e della frazione Venere Azzurra nel Comune di Lerici (La Spezia) in data 6 settembre 2023

Campione	Data	Coord_X	Coord_Y	Temp. (°C)	pH	Cond. (mS/cm)	Descrizione e note
VZ-01-M	06.09.23	9.906296	44.081384	25,1	8,29	54	Campione di acqua di mare fronte spiaggia Venere Azzurra; condizioni meteo: soleggiato. Temperatura aria circa 27°C; mare calmo.
VZ-01-C		9.906541	44.081745	20,4	8,3	0,702	Campione prelevato all'interno del corpo idrico canalizzato in località Venere Azzurra.
ST-01-M		9.898957	44.082978	25	8,27	54,1	Campione di acqua di mare fronte Rio Portiolo; condizioni meteo: soleggiato. Temperatura aria circa 27°C; mare calmo.
ST-01-C		9.896817	44.083060	19,5	7,92	0,703	Campione prelevato all'interno del corpo idrico canalizzato Lizzarella. Flusso idrico scarso; fondo sabbioso; si è proceduto a prelevare i 10 litri mediante una bottiglia in PVC non sterile.
ST-02-C		9.899128	44.083249	20,2	8,36	0,717	Campione prelevato all'interno del corpo idrico canalizzato Portiolo. Flusso idrico modesto e laminare. È stata scavata una buca in uscita per poter prelevare l'acqua con una bottiglia in PVC non sterile.
LE-B-M		9.908498	44.072123	24,7	8,3	54,7	Campione di acqua di mare fronte spiaggia S. Giorgio; condizioni meteo: soleggiato. Temperatura aria circa 30°C; mare calmo.
VZ-03-S							Sabbia canale Venere Azzurra.
ST-01-S							Sabbia sotto passerella canale prelevato presso S. Terenzo.

ST-02-S						Sabbia sbocco canale Portiolo prelevato presso S. Terenzo.
LE-B-2-S						Sabbia dietro Castello bianco prelevato presso Lerici.

VZ=Venere Azzurra; ST= San Terenzo; M= Mare; C=Canale; LE-B=Lerici Bianco (spiaggia non coinvolta nell'evento epidemico)



Figura 1. Area oggetto di indagine nel comune di Lerici (La Spezia)

In data 12.09.2023 personale dell'ASL ha effettuato un nuovo campionamento di n° 7 campioni: 4 di acqua di mare e 3 all'interno dei canali diretti a mare in località San Terenzo e Venere Azzurra negli stessi punti campionati da ISS in data 6 settembre. Uno dei campioni di acqua di mare è stato prelevato quale "bianco" in località retrocastello. I campioni, accompagnati da verbale di prelievo prot. ASL 5 n.36604 e Prot. ISS AOO-ISS 13/09/23 0041463, sono giunti in ISS in data 13.09.2023. La richiesta per la ricerca di rotavirus ed altri virus enterici nei campioni di acqua è pervenuta ad ISS con verbale ASL Prot. 37021. L'elenco dei campioni è illustrato in Tabella 2.

Tabella 2. Campionamenti effettuati da personale ASL presso i siti di San Terenzo e della frazione Venere Azzurra nel Comune di Lerici (La Spezia) in data 12 settembre 2023

N°	Matrice	Data	Descrizione Punto di Prelievo	Quantità	Orario
C1	acqua	12.09.2023	Canale S. Terenzo, piazza	10 L.	15.00
M1	acqua		Specchio acqueo S. Terenzo, piazza	10 L.	15.00
C2	acqua		Canale S. Terenzo, fronte farmacia	10 L.	15.20
M2	acqua		Specchio acqueo S. Terenzo, fronte farmacia	10 L.	15.20
C3	acqua		Canale Venere Azzurra, fronte parcheggio	10 L.	15.35
M3	acqua		Specchio acqueo venere Azzurra, fronte parcheggio	10 L.	15.35
M4	acqua		Specchio acqueo retrocastello Lerici *	10 L.	15.50

*Bianco (spiaggia non coinvolta nell'evento epidemico)



In data 21.09.2023 personale dell'ASL ha effettuato un nuovo campionamento di n° 10 campioni di matrici differenti: 4 di acqua di mare, 3 di acqua presente all'interno dei canali diretti a mare, 3 relativi a sabbia in prossimità dell'uscita dei canali. I campioni, accompagnati da verbale Prot. ASL n. 37892, sono giunti in ISS nel pomeriggio del giorno di campionamento. I campioni sono stati effettuati in punti di prelievo differenti: 6 in località S. Terenzo (2 di acqua di mare, 2 di acqua proveniente dai canali diretti e 2 di sabbia); 3 sono stati effettuati in località Venere Azzurra (1 di acqua di mare, 1 di acqua proveniente dai canali diretti e 1 di sabbia); 1 è stato effettuato in località Retro Castello nello specchio acqueo quale campione "bianco". I punti di campionamento sia a mare che a terra coincidono con quelli già campionati in precedenza da ISS. La richiesta per la ricerca di rotavirus ed altri virus enterici nei campioni di acqua e sabbie è pervenuta ad ISS con verbale Prot. ASL 37893 del 21.09.23. L'elenco dei campioni è illustrato in Tabella 3.

Tabella 3. Campionamenti effettuati da personale ASL presso i siti di San Terenzo e della frazione Venere Azzurra nel Comune di Lerici (La Spezia) in data 21 settembre 2023

N°	Matrice	Data	Descrizione Punto di Prelievo	Quantità	Orario
T1	acqua	21.09.23	Canale S. Terenzo, piazza	10 L	8.30-10.30
M1	acqua		Specchio acqueo S. Terenzo, piazza	10 L	8.30-10.30
T2	acqua		Canale S. Terenzo, farmacia	10 L	8.30-10.30
M2	acqua		Specchio acqueo S. Terenzo, fronte farmacia	10 L	8.30-10.30
T3	acqua		Canale Venere Azzurra, fronte parcheggio	10 L	8.30-10.30
M3	acqua		Specchio acqueo venere Azzurra, fronte parcheggio	10 L	8.30-10.30
M4	acqua		Specchio acqueo Retro Castello Lerici *	10 L	8.30-10.30
S1	sabbia		Fronte canale S. Terenzo, piazza	250 grammi	8.30-10.30
S2	sabbia		Fronte canale S. Terenzo, farmacia	250 grammi	8.30-10.30
S3	sabbia		Fronte Canale Venere Azzurra	250 grammi	8.30-10.30

*Bianco (spiaggia non coinvolta nell'evento epidemico)

Tutti i campioni di acqua sono stati concentrati utilizzando il Metodo EPA 1615 (concentrazione primaria mediante assorbimento/eluizione su membrane elettropositive e concentrazione secondaria mediante flocculazione organica)¹. Gli acidi nucleici sono stati estratti mediante silice magnetica con i reagenti di estrazione NucliSens (bioMérieux), e successivamente purificati per la rimozione di inibitori utilizzando il kit OneStep PCR Inhibitor Removal (Zymo Research).

Tenuto conto della complessità della matrice e dei metodi utilizzati per la concentrazione dei virus, è stato utilizzato un controllo di processo (Mengovirus), aggiunto al campione, estratto ed amplificato insieme alla sequenza target, in modo da valutare il recupero dei virus dalla matrice.

I campioni sono stati testati per rotavirus e per un pannello di virus enterici a RNA (norovirus GI e GII, enterovirus) e DNA (adenovirus).

I protocolli per la determinazione dei virus nei campioni di acqua sono riportati in Tabella 4. Per l'identificazione del rotavirus sono stati utilizzati metodi molecolari: real-time PCR e digital PCR per la quantificazione (target: gene codificante per la proteina non strutturale 3, NSP3), e RT-PCR convenzionale per la caratterizzazione molecolare seguita da sequenziamento genico (target: gene codificante VP7). Inoltre, sono state effettuate delle PCR per l'amplificazione della VP4 (la proteina VP4 identifica il P-tipo) utilizzando i protocolli impiegati dell'EuroRotaNet, un network di laboratori

¹ Fout GS, Brinkman NE, Cashdollar JL, Griffin SM, McMinn BR, Rhodes ER, Varughese EA, Karim MR, Grimm AC, Spencer SK, Borchardt MA. 2010. Method 1615: measurement of enterovirus and norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR, publication no EPA/600/R-10/181. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH

Europei che collaborano per la sorveglianza dei genotipi di rotavirus circolanti in Europa². Per l'identificazione del pannello di virus enterici sono state utilizzate PCR Real-time di letteratura in adozione presso i laboratori dell'ISS.

Tabella 4. (RT)-PCR utilizzate per lo screening dei virus nei campioni di acqua

Virus	Genoma	Regione target	Reference
Rotavirus	RNA	NSP3	Freeman et al., 2008 ³
		VP7	Gilgen et al., 1997 ⁴
Norovirus GI	RNA	ORF1-ORF2 junction	ISO 15216-2:2019 ⁵
Norovirus GII	RNA	ORF1-ORF2 junction	ISO 15216-2:2019 ⁵
Enterovirus	RNA	5'NTR	Fuhrman et al., 2005 ⁶
Adenovirus	DNA	Hexon	Hernroth et al., 2002 ⁷

Per quanto riguarda i campioni di sabbia, 10 g di sabbia sono stati risospesi con 15 mL di dH₂O sterile e lasciati ad agitare su un agitatore orbitale per 20'. Dopo centrifugazione a 4000 ×g per 10' a 4°C, 10 ml di surnatante sono stati direttamente estratti mediante silice magnetica con i reagenti di estrazione NucliSens (bioMérieux), e successivamente purificati per la rimozione di inibitori utilizzando il kit OneStep PCR Inhibitor Removal (Zymo Research).

I risultati relativi alla presenza del rotavirus nei campioni d'acqua sono riportati nella Tabella 5, mentre la Tabella 6 presenta i risultati relativi al rotavirus nei campioni di sabbia.

Tabella 5. Risultati per rotavirus relativi ai campioni raccolti in mare e nei canali di raccolta acque superficiali

Identificativo campione	Matrice	Data prelievo	Real-time PCR	Digital PCR	Copie genomiche /L acqua	PCR per Sequenziamento
40/1	Acqua da canale	02.09.2023	Positivo	Positivo	3,0E+04	Positivo
VZ-01-M	Acqua di mare	06.09.2023	Negativo	Negativo	-	Negativo
VZ-01-C	Acqua da canale		Positivo	Positivo	7,6E+01	Negativo
ST-01-M	Acqua di mare		Negativo	Negativo	-	Negativo
ST-01-C	Acqua da canale		Positivo	Positivo	3,8E+01	Negativo

² <https://www.eurorotanet.com/project-information/documents-and-methods/>

³ Freeman, M.M.; Kerin, T.; Hull, J.; McCaustland, K.; Gentsch, J. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 2008, 80, 1489–1496.

⁴ Gilgen M, Germann D, Lüthy J, Hübner P. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int J Food Microbiol.* 1997 Jul 22; 37(2-3):189-99. doi: 10.1016/S0168-1605(97)00075-5. PMID: 9310854.

⁵ ISO 15216-2:2019 - Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection

⁶ Fuhrman JA, Liang X, Noble RT. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Aug;71(8):4523-30. doi: 10.1128/AEM.71.8.4523-4530.2005. PMID: 16085845; PMCID: PMC1183282.

⁷ Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Sep;68(9):4523-33. doi: 10.1128/AEM.68.9.4523-4533.2002. PMID: 12200309; PMCID: PMC124092.

ST-02-C	Acqua da canale		Positivo	Positivo	1,9E+01	Negativo
LE-B-M	Acqua di mare (bianco)		Negativo	Negativo	-	Negativo
C1 (ST)	Acqua da canale	12.09.2023	Positivo	Positivo	2,3E+01	Negativo
M1 (ST)	Acqua di mare		Negativo	Negativo		Negativo
C2 (ST)	Acqua da canale		Positivo	Positivo	2,7E+01	Negativo
M2 (ST)	Acqua di mare		Negativo	Negativo	-	Negativo
C3 (VZ)	Acqua da canale		Negativo	Negativo	-	Negativo
M3 (VZ)	Acqua di mare		Negativo	Negativo	-	Negativo
M4 (B)	Acqua di mare (bianco)		Negativo	Negativo	-	Negativo
T1 (ST)	Acqua da canale	21.09.2023	Negativo	Negativo	-	Negativo
M1 (ST)	Acqua di mare		Negativo	Negativo	-	Negativo
T2 (ST)	Acqua da canale		Positivo	Positivo	7,68E+00	Negativo
M2 (ST)	Acqua di mare		Negativo	Negativo	-	Negativo
T3 (VZ)	Acqua da canale		Negativo	Negativo	-	Negativo
M3 (VZ)	Acqua di mare		Negativo	Negativo	-	Negativo
M4 (B)	Acqua di mare (bianco)		Negativo	Negativo	-	Negativo

VZ=Venere Azzurra; ST= San Terenzo; M= Mare; C=Canale; B=Bianco (spiaggia non coinvolta nell'evento epidemico)

Tabella 6. Risultati per rotavirus relativi ai campioni di sabbia

Identificativo campione	Data prelievo	Real-time PCR	Digital PCR	Copie genomiche in 10 grammi di sabbia	PCR per sequenziamento
ST-01-S	06.09.2023	Positivo	Positivo	4,4E+03	Positivo
ST-02-S		Positivo	Positivo	9,6E+02	Positivo
VZ-03-S		Positivo	Positivo	3,7E+04	Positivo
LEB-2-S*		Negativo	Negativo	-	Negativo
S1	21.09.2023	Positivo	Positivo	3,0E+03	Positivo
S2		Positivo	Positivo	2,6E+03	Positivo
S3		Positivo	Positivo	3,1E+04	Positivo

*Bianco (spiaggia non coinvolta nell'evento epidemico)

Dal sequenziamento Sanger del campione 40/1, è stata ottenuta una sequenza di 985 bp nella regione VP7, che, analizzata mediante il Rotavirus A Genotyping Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/rotavirusa/>), conferma la presenza di rotavirus gruppo A, G3. La tipizzazione nella regione VP4 indica la presenza di un P-tipo 8 (G3P[8]).

È importante notare che l'elettroferogramma della sequenza del campione 40/1 ha evidenziato la predominanza di una sequenza principale associata alla presenza di picchi doppi di bassa intensità in



alcuni punti dell'elettroferogramma, che indicano anche la presenza di rotavirus diversi da quello dominante, in quantità minoritaria.

Non è stato possibile ottenere dati di sequenze dai campioni positivi di acqua dei canali raccolti nelle date 06.09.2023, 12.09.2023 e 21.09.2023, presumibilmente a causa delle basse concentrazioni virali. Dati di sequenziamento sono stati invece ottenuti dai campioni di sabbia prelevati il 06.09.2023 e il 21.09.2023; tali dati confermano la presenza di rotavirus gruppo A, G3. Solo per il campione di sabbia prelevato a Venere Azzura il 06.09.23 è stato possibile determinare anche la presenza del P-tipo 8.

I risultati globali delle PCR Real-time per rotavirus e per un pannello di altri virus enterici sono illustrati in Tabella 7.

Tabella 7. Risultati della PCR Real-time per rotavirus (RV), enterovirus (EV), adenovirus (AdV), norovirus GI (NoVGI) e norovirus GII (NoVGII). I valori in rosso indicano i Ct delle reazioni positive.

Identificativo campione	Data	RV	EV	AdV	NoVGI	NoVGII
40/1	02.09.2023	29,30	neg	neg	37,89	neg
VZ-01-M		neg	neg	neg	neg	neg
VZ-01-C		38,12	neg	neg	neg	neg
ST-01-M		neg	neg	neg	neg	neg
ST-01-C	06.09.2023	37,63	neg	neg	neg	neg
ST-02-C		38,97	neg	neg	neg	neg
LE-B-M		neg	neg	neg	neg	neg
VZ-03-S		26,39	neg	neg	neg	neg
ST-01-S		32,09	neg	neg	neg	40,39
ST-02-S		34,16	neg	neg	neg	neg
LE-B-2-S		neg	neg	neg	neg	neg
C1		37,42	36,98	neg	35,12	38,14
M1	12.09.2023	neg	neg	neg	neg	neg
C2		36,79	neg	neg	neg	neg
M2		neg	neg	neg	neg	neg
C3		neg	neg	neg	neg	neg
M3		neg	neg	neg	neg	neg
M4		neg	neg	neg	neg	neg
T1 (ST)		neg	neg	neg	neg	neg
M1 (ST)		neg	neg	neg	neg	neg
T2 (ST)		38,24	neg	neg	36,36	neg
M2 (ST)		neg	neg	neg	38,41	neg
T3 (VZ)	21.09.23	neg	neg	neg	neg	neg
M3 (VZ)		neg	neg	neg	neg	neg
M4 (B)		neg	neg	neg	neg	neg
S1		32,07	neg	neg	neg	neg
S2		33,33	neg	neg	neg	neg
S3		29,22	neg	neg	neg	neg



Limitatamente al campione 40/1 sono state effettuate anche PCR Real-time per altri virus enterici a RNA (sapovirus, salivirus, astrovirus, aichivirus, torovirus e parechovirus) e DNA (bufavirus e tusavirus), tutti con esiti negativi.

Si evidenzia:

- La presenza di NoVGI (oltre a rotavirus) nel campione di acqua prelevato dal canale in località Venere Azzurra (campione 40/1) il 2 settembre 2023
- La presenza di NoVGII (oltre a rotavirus), nella sabbia prelevata sotto passerella canale presso S. Terenzo il 6 settembre 2023
- La presenza di EV, NoVGI e NoVGII (oltre a rotavirus) nell'acqua del canale in località S. Terenzo (piazza) prelevato il 12 settembre 2023
- La presenza di NoVGI (oltre a rotavirus) nell'acqua del canale in località S. Terenzo (farmacia) prelevato il 21 settembre 2023
- La presenza di NoVGI (in assenza di rotavirus) nello specchio acqueo S. Terenzo (farmacia) prelevato il 21 settembre 2023

L'esame dei dati acquisiti consente di rilevare quanto segue:

- È stata rilevata una significativa contaminazione da rotavirus nel campione di acqua del canale raccolto il 02.09.2023 in località Venere Azzurra, con una concentrazione di $3,0E+04$ copie genomiche/L. Il campione è stato caratterizzato come rotavirus gruppo A, genotipo G3P[8].
- La positività al rotavirus è stata confermata nei campionamenti effettuati in data 06.09.2023 nel punto di campionamento presso il canale di Venere Azzurra e rilevata anche in due canali di scolo situati a San Terenzo, sebbene con concentrazioni notevolmente inferiori rispetto a quelle del campione prelevato il 02.09.2023 (range: $1,9E+01$ – $7,6E+01$ copie genomiche/L). Non sono state rilevate positività nelle acque di mare fronte canali.
- Positività per rotavirus sono state rilevate anche nei campioni di sabbia raccolti nei canali di scolo in data 06.09.2023, in concentrazioni da $9,6E+02$ a $3,7E+04$ in 10 g. Il sequenziamento delle sabbie ha confermato la presenza di rotavirus gruppo A, genotipo G3 in tutti e tre i campioni. Solo per il campione di sabbia prelevato a Venere Azzurra è stato possibile determinare la presenza di un P-tipo 8.
- La positività al rotavirus, in basse concentrazioni (range: $2,3E+01$ – $2,7E+01$ copie genomiche/L), è stata confermata nei campionamenti effettuati il 12.09.2023 nei canali di scolo in località S. Terenzo. Non sono state rilevate positività nelle acque di mare fronte canali.
- L'analisi per il pannello di virus enterici ha mostrato la presenza, oltre a rotavirus, di EV, NoVGI e NoVGII nell'acqua del canale in località S. Terenzo (piazza) prelevato il 12 settembre.
- La positività al rotavirus, in basse concentrazioni ($7,8E+00$ copie genomiche/L), è stata confermata nel campione prelevato il 21 settembre nel canale di scolo in località S. Terenzo (farmacia). Nello stesso campione è stato rilevato anche norovirus GI, identificato anch'esso a basse concentrazioni. Non è stata rilevata positività per rotavirus nell'acqua di mare fronte canale, ma positività per norovirus GI.
- Positività per rotavirus sono state rilevate anche nei campioni di sabbia raccolti nei canali di scolo in data 21.09.2023, in concentrazioni da $2,6E+03$ a $3,1E+04$ in 10 g di sabbia. Il sequenziamento delle sabbie ha confermato la presenza di rotavirus gruppo A, genotipo G3.



Su richiesta di ISS, sono stati inviati all'ISS campioni di feci da bambini coinvolti nell'evento epidemico (n=12, più un campione negativo per rotavirus; verbali ASL Prot. N. 36604 e Prot. n. 37892), per consentire un confronto delle sequenze nucleotidiche con i ceppi di rotavirus individuati nell'ambiente. Per la tipizzazione dei ceppi di rotavirus nelle feci sono stati utilizzati gli stessi saggi impiegati per i campioni ambientali, che hanno come target la regione VP7 e VP4. Mediante sequenziamento Sanger è stata confermata la presenza di rotavirus gruppo A, genotipo G3P[8]. Le sequenze dei ceppi di rotavirus ottenute saranno inserite nel database della sorveglianza EuroRotaNet. Dal confronto delle sequenze dei campioni clinici e ambientali è stato possibile riscontrare un'identità nucleotidica del 100%.

Nel corso del periodo d'indagine sono state inviate all'Azienda Sociosanitaria Ligure 5 n. 2 relazioni intermedie (prot. A00-ISS-13/09/2023-0041425 Class: CENSIA 01.10, inviato il 13.09.23 e prot. A00-ISS-22/09/2023-0043062 Class: CENSIA 01.10, inviato il 22.09.23).

In conclusione, nel periodo compreso tra il 2 e il 21 settembre 2023, sono stati condotti quattro campionamenti, con la raccolta totale di undici campioni di acqua di mare, dieci campioni di acqua prelevata dai canali e sette campioni di sabbia.

Nonostante si sia riscontrata una diminuzione sia nel numero dei siti positivi al rotavirus che nelle concentrazioni virali nel corso del tempo, va notato che al 21 settembre la presenza del rotavirus è ancora confermata nel canale di scolo di S. Terenzo (farmacia) e nelle sabbie dei tre canali.

È importante notare che il rotavirus ha una dose infettante molto bassa, possono infatti essere sufficienti 10-100 particelle virali per causare malattia in individui suscettibili. Inoltre, le analisi hanno evidenziato occasionali positività per altri virus enterici oltre a rotavirus, sia nei canali che nelle sabbie, suggerendo una contaminazione di origine fecale nei canali in questione.

La convergenza di molteplici evidenze riscontrate sui campioni ambientali consente di identificare con ogni ragionevole certezza la significativa e persistente contaminazione delle aree di balneazione come riconducibile a reflui fognari veicolati dai canali di scolo presenti negli arenili. Tale fenomeno è stato, verosimilmente, alla base di episodi infettivi conclamati e persiste come pericolo per l'esposizione dei bagnanti, peraltro variabile per effetto di eventi climatici. Si ribadisce pertanto la raccomandazione ai soggetti responsabili di implementare ogni azione funzionale alla prevenzione e al controllo della contaminazione nelle aree territoriali interessate e alla limitazione dell'esposizione dei fruitori della spiaggia, fintanto che sia assicurata la rimozione delle fonti inquinanti.

Nel rimanere a disposizione per ogni seguito si subordina l'esecuzione di ulteriori controlli analitici da parte di questo Istituto alla realizzazione degli interventi necessari a garantire l'igiene delle aree in oggetto.

Si resta a disposizione per ogni seguito.

Il Direttore del Centro Nazionale
per la Sicurezza delle Acque

Luca Lucentini

Il Direttore del Dipartimento di
Malattie infettive

Anna Teresa Palamara

Il Direttore del Dipartimento di
Sicurezza alimentare, nutrizione e
sanità pubblica veterinaria

Umberto Agrimi