

# PEPPER MILD MOTTLE VIRUS IN MATRICI IDRICHE IN ITALIA: UN POSSIBILE CANDIDATO COME INDICATORE VIRALE DI CONTAMINAZIONE FECALE?



Carolina Veneri<sup>1</sup>, Elisabetta Suffredini<sup>2</sup>, Giusy Bonanno Ferraro<sup>1</sup>, Pamela Mancini<sup>1</sup>, Marcello Iaconelli<sup>1</sup>, Lucia Bonadonna<sup>1</sup>, Maria Teresa Montagna<sup>3</sup>, Osvalda De Giglio<sup>3</sup> e Giuseppina La Rosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Ambiente e Salute, ISS

<sup>2</sup>Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, ISS

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

**RIASSUNTO** - Il Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) è un agente patogeno delle piante appartenente alla famiglia Virgaviridae, rilevato in diversi studi sia in campioni fecali umani, sia in ambienti acquatici, inclusi acque reflue, superficiali e sotterranee. Tali evidenze hanno portato a valutare il suo possibile impiego come indicatore virale di contaminazione fecale per monitorare la qualità delle acque. Viene qui presentato uno studio condotto in Italia dall'Istituto Superiore di Sanità per la determinazione della presenza e della concentrazione del PMMoV in diverse matrici idriche (acque reflue, di fiume, sotterranee, marine, potabili), finalizzato a incrementare le conoscenze sul suo possibile impiego come indicatore.

**Parole chiave:** Pepper mild mottle virus; acqua; indicatori fecali

**SUMMARY** (*Pepper Mild Mottle Virus in Italian waters: a candidate that could work as a viral indicator of faecal contamination*) - Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) is a plant pathogen belonging to the Virgaviridae family that has been detected both in human faecal samples and in different types of water. It has been suggested as a viral indicator of faecal contamination in order to monitor the quality of the water. Here we present a study conducted in Italy by the Italian National Institute of Health with the aim to investigate the occurrence and concentration of PMMoV in different types of water (wastewaters, rivers, ground and marine waters, and drinking water) to spread awareness about its possible use as a viral indicator.

**Key words:** Pepper mild mottle virus; water; faecal indicators

giuseppina.larosa@iss.it

La valutazione della qualità microbiologica dell'acqua è storicamente effettuata mediante la ricerca di batteri indicatori di contaminazione fecale, in particolare coliformi, *Escherichia coli* ed enterococchi. Questi gruppi di microrganismi non sono di per sé patogeni per cui non costituiscono un rischio diretto per la salute umana, ma la loro presenza è considerata come un indice di contaminazione e, pertanto, indicano la possibile presenza anche di organismi patogeni di origine fecale. Generalmente, per valutare la qualità microbiologica delle acque non sono ricercati direttamente i microrganismi patogeni (batteri, virus e parassiti). Infatti, se da una parte non sarebbe comunque possibile andare a ricercare tutti i patogeni potenzialmente presenti, dall'altra permangono difficoltà legate

alla durata, ai costi e alla complessità delle metodiche analitiche per il rilevamento e la quantificazione di questi organismi. Per questo motivo, di consuetudine sono ricercati i batteri indicatori che, oltre a presentare una maggiore praticità e fattibilità di analisi, hanno il vantaggio di poter essere rilevati indipendentemente dal grado di endemicità di alcune infezioni, poiché i batteri fecali sono escreti in modo pressoché costante da tutti gli individui. Tuttavia, negli anni più recenti, è stato riconosciuto dalla comunità scientifica che gli indicatori batterici spesso non sono correlati alla presenza di patogeni virali: casi o epidemie di origine virale sono, infatti, segnalati anche in relazione all'uso di acqua conforme ai requisiti di qualità prescritti dalle normative vigenti. Numerosi studi hanno messo in evidenza come fonti ►

di approvvigionamento idrico, superficiali e profonde, possono contenere patogeni virali anche in assenza dei classici indicatori di fecalizzazione, rappresentando quindi un importante problema di sanità pubblica (1). Ciò è dovuto sia a un diverso comportamento dei due gruppi di organismi rispetto ai trattamenti a cui è sottoposta l'acqua durante le fasi di potabilizzazione e depurazione, sia all'effetto di fattori ambientali e stagionali: i batteri indicatori mostrano infatti una minore capacità di sopravvivenza rispetto ai virus enterici nelle acque (2) essendo più vulnerabili alle condizioni ostili del mezzo in cui vengono a trovarsi.

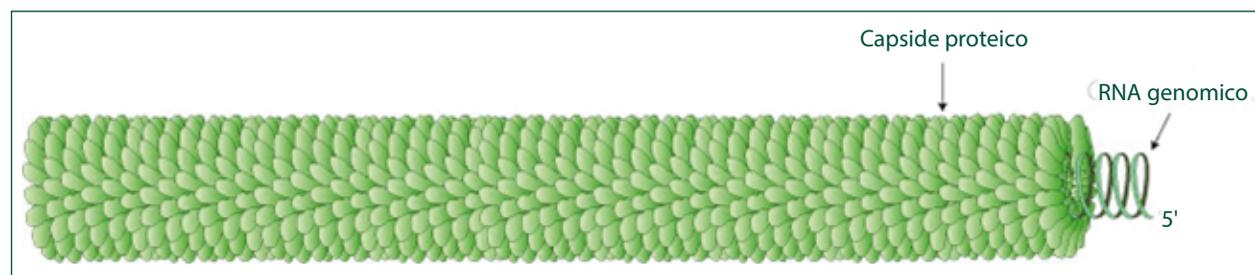
I virus enterici rappresentano un gruppo di virus, appartenenti a diverse famiglie e generi, che hanno in comune la caratteristica di infettare il tratto gastrointestinale umano e di essere trasmessi principalmente per via fecale-orale, ma anche attraverso il contatto interumano e la via respiratoria. Sono tra i principali agenti eziologici responsabili di malattie idro-trasmesse a causa della loro bassa dose infettante, l'alta concentrazione nelle feci umane, l'elevata persistenza nell'ambiente e la resistenza ai processi di disinfezione delle acque. Dunque, la presenza di patogeni virali nell'ambiente acquatico è un parametro molto importante da considerare ai fini della valutazione della qualità dell'acqua. Dal momento che i tradizionali indicatori microbiologici di contaminazione fecale non risultano essere efficaci nel determinare la presenza di patogeni virali, numerose ricerche sono state condotte per l'individuazione di un indicatore di contaminazione virale delle acque.

Di recente alcuni studi, tra cui quello condotto in Italia dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), hanno valutato il possibile utilizzo del Pepper Mild Mottle Virus come indicatore virale.



### Generalità sul Pepper Mild Mottle Virus e sulla sua presenza in matrici idriche

Il Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) è un agente patogeno vegetale appartenente al genere *Tobamovirus* (famiglia *Virgaviridae*), isolato per la prima volta nel 1984 in Sicilia da una pianta di peperone (1). Questo agente virale è in grado d'infettare il genere vegetale *Capsicum* e altre *Solanaceae* e ha determinato nel corso degli anni significative perdite di raccolto in tutto il mondo. Nei vegetali l'infezione con PMMoV può rimanere sostanzialmente asintomatica o indurre danno fogliare. Il genoma del PMMoV, un RNA a singolo filamento e a polarità positiva, presenta una lunghezza di circa 6.400 nucleotidi. Il virione è privo dell'*envelope* ed è caratterizzato da una struttura bastoncellare (~ 312 nm di lunghezza) simile a quella del virus del mosaico del tabacco e altri *Tobamovirus* (Figura 1) (3).



**Figura 1** - Struttura del virione appartenente alla famiglia *Virgaviridae*.

Fonte: ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics

Il PMMoV non è un virus patogeno per l'uomo, in quanto non è in grado di infettare le cellule umane e replicarsi nell'organismo, mentre è presente come transiente all'interno dell'intestino e nelle feci umane a seguito del consumo di vegetali quali peperoni e/o Solanaceae (o prodotti da essi derivati).

L'identificazione del PMMoV nelle feci è stata inizialmente ottenuta tramite studi di metagenomica virale (4). Studi successivi condotti in tutto il mondo hanno confermato la presenza del virus in campioni fecali umani con diverse prevalenze: 67% negli Stati Uniti e a Singapore (6/9 campioni), 95% in Germania (19/20), 4% in Francia (23/512) (5). È stato, inoltre, dimostrato che è un virus particolarmente resistente, in grado di sopportare anche le diverse fasi di lavorazione degli alimenti inclusa l'esposizione ad alte temperature (3). Uno studio condotto in Francia, ad esempio, ha identificato sequenze di PMMoV nel 57% (12 campioni su 21) di prodotti alimentari commercializzati contenenti peperoni, come salse e polveri (6). Proprio perché la presenza del PMMoV nelle feci umane è di origine alimentare, ciò comporta che sia uno dei virus maggiormente escreto mediante le feci dalla popolazione sana, addirittura in concentrazioni anche maggiori (da  $10^5$  fino a  $10^{10}$  copie genomiche - cg - per grammo di feci) rispetto ai virus patogeni per l'uomo. Inoltre, poiché la presenza del virus nelle feci non è associata a un'infezione attiva nell'organismo, l'aumento delle concentrazioni di PMMoV tende a essere correlato, in generale, a una maggiore contaminazione, rispondendo così a uno dei requisiti auspicabili in un indicatore di contaminazione fecale.

Un buon indicatore di contaminazione fecale, per essere considerato tale, infatti deve: i) far parte del microbioma intestinale; ii) non essere patogeno per l'uomo; iii) essere facilmente rilevabile (con metodi rapidi e poco costosi); iv) essere presente in alte concentrazioni; v) essere resistente ai fattori ambientali e ai processi di trattamento e disinfezione (7). Il PMMoV può rappresentare un ottimo candidato come indicatore data l'alta ubiquità in tutti i tipi di matrici idriche, la presenza a concentrazioni elevate rispetto ad altri patogeni enterici, l'assenza di crescita in mancanza delle specie vegetali ospiti, la presenza di una relazione diretta tra la densità e il grado di inquinamento fecale, e l'elevata stabilità ambientale (5).

Diversi sono gli studi che hanno preso in esame il PMMoV nelle acque, in particolare in quelle reflue; il primo studio, condotto nel 2009 (8), mise in luce la presenza di tale virus a concentrazioni piuttosto elevate sia nelle acque reflue non trattate che in quelle trattate (rispettivamente  $10^{10}$  e  $10^9$  cg/L) (8). Successivamente la ricerca del PMMoV nei reflui urbani ha suscitato interesse in diversi Paesi, inclusi Stati Uniti, Germania, Vietnam, Costa Rica, Corea del Sud e Australia, nei quali il virus è stato rilevato nei reflui non trattati con una prevalenza fra il 57% e il 100% e a livelli di concentrazioni variabili fra  $10^5$  e  $10^{10}$  cg/L. La ricerca del PMMoV, inoltre, non si è limitata solo ai reflui urbani, ma si è estesa successivamente anche ad altre matrici idriche, come acque superficiali, acque d'irrigazione, acque sotterranee e fonti di acque potabili (5).

### Pepper Mild Mottle Virus in matrici idriche in Italia: lo studio condotto dall'ISS

Lo studio condotto nel Reparto di Qualità dell'Acqua e Salute dell'ISS (il primo di questo tipo in Italia), ha voluto analizzare la presenza e la concentrazione del PMMoV in diversi tipi di matrici idriche: campioni di reflui urbani trattati e non trattati, acque di estuario e di balneazione, acque di fiume, acque sotterranee e acque potabili (9). Parallelamente è stato anche effettuato, ove possibile, un confronto con i classici indicatori microbici di contaminazione fecale. A tale scopo sono stati analizzati un totale di 254 campioni così ripartiti: 92 di reflu non trattato, 32 di reflu trattato, 16 di acque di fiume, 9 di acque di estuario, 20 di acque di balneazione, 67 di acque sotterranee e 18 di acque potabili. I campioni inclusi nello studio sono stati raccolti nel biennio 2017-2019 in diverse Regioni del Nord, Centro e Sud Italia (Piemonte, Lombardia, ►



Emilia-Romagna, Lazio, Toscana, Puglia) e, per quanto concerne i campioni di reflui urbani, nell'arco delle diverse stagioni (18 in primavera, 23 in estate, 26 in autunno, 25 in inverno).

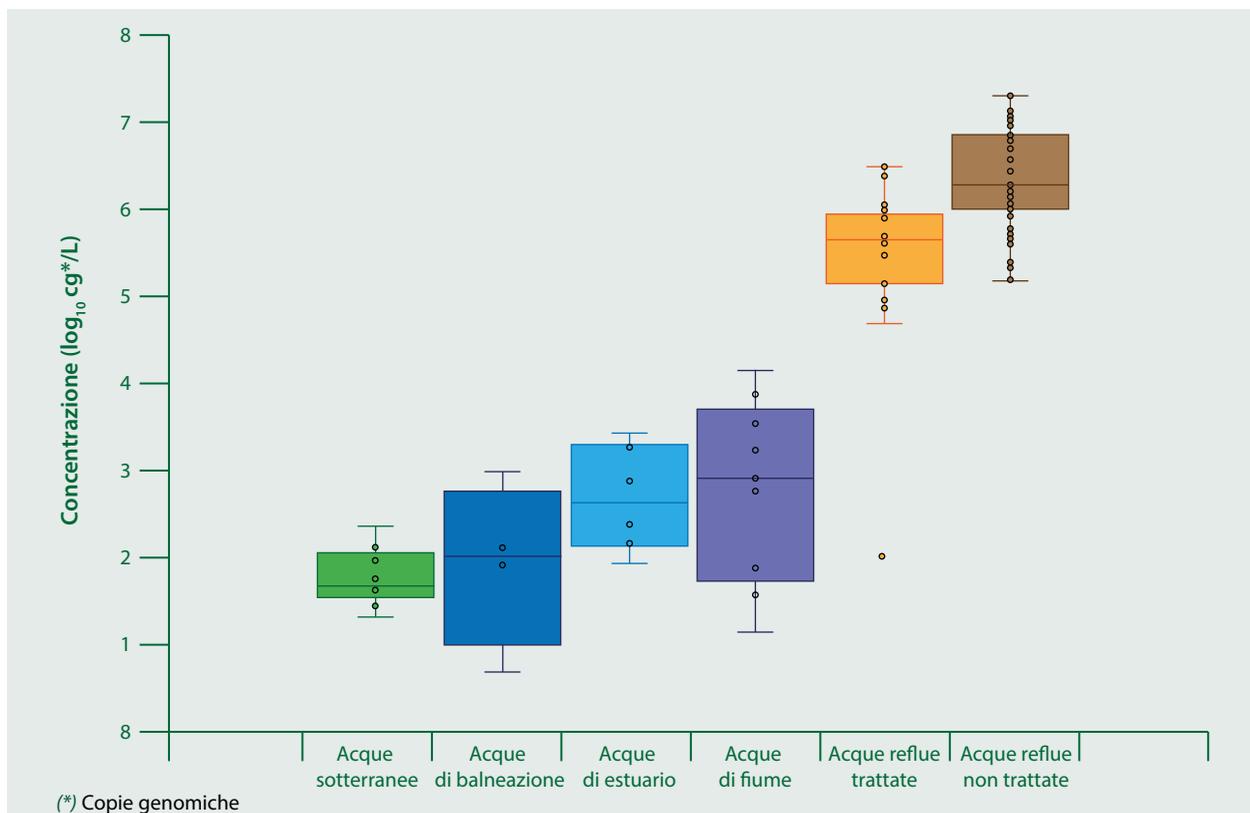
La ricerca del PMMoV nelle matrici idriche è stata effettuata impiegando due metodi di biologia molecolare, una PCR qualitativa (nested RT-PCR) e una PCR quantitativa (real time RT-PCR). Dai risultati ottenuti si è osservato come la presenza e la carica virale media del PMMoV negli ambienti acquatici rifletta

nettamente un gradiente decrescente a partire dalle acque più inquinate fino a quelle con caratteristiche di potabilità, come di seguito riportato: acque reflue non trattate (79,3% di campioni positivi; concentrazione media pari a  $2,2 \times 10^6$  cg/L) > acque reflue trattate (75,0%;  $2,9 \times 10^5$  cg/L) > acque fluviali (75,0%;  $6,1 \times 10^2$  cg/L) > acque di estuario (66,6%;  $4,8 \times 10^2$  cg/L) > acque di balneazione (25,0%;  $8,5 \times 10^1$  cg/L) > acque sotterranee (13,4%;  $5,9 \times 10^1$  cg/L) > acque potabili (nessuna presenza) (Tabella, Figura 2).

**Tabella** - Risultati sulla presenza e la carica virale media del PMMoV nelle matrici idriche italiane ottenute nello studio (9)

Matrice idrica	n. campioni	% di positività	Concentrazione media (cg <sup>a</sup> /L)
Acque reflue	92	79,3	$2,2 \times 10^6$
Acque reflue trattate	32	75,0	$2,9 \times 10^5$
Acque di fiume	16	75,0	$6,1 \times 10^2$
Acque d'estuario	9	66,6	$4,8 \times 10^2$
Acque costiere	20	25,0	$8,5 \times 10^1$
Acque sotterranee	67	13,4	$5,9 \times 10^1$
Acque potabili	18	0	-
<b>Totale</b>	<b>254</b>	<b>50,4<sup>b</sup></b>	

(a) Copie genomiche; (b) percentuale di campioni positivi su campioni totali



**Figura 2** - Concentrazione del PMMoV nelle matrici idriche investigate



Non sono state osservate sostanziali fluttuazioni stagionali, probabilmente dal momento che il PMMoV è un virus associato al consumo alimentare di vegetali, e non all'infezione nell'uomo.

In accordo con quanto riportato anche da altri studi, non è stata osservata alcuna correlazione tra la presenza e la quantità di PMMoV con *E. coli* e gli enterococchi intestinali, fatta eccezione per le acque potabili in cui né i batteri indicatori, né il PMMoV sono stati individuati.

## Conclusioni

Questo primo studio pilota sulla rilevazione del PMMoV in ambienti acquatici in Italia, sebbene condotto su un limitato numero di campioni raccolti in corpi idrici in alcune Regioni italiane, ha permesso di mettere in evidenza:

- l'ubiquità di tale virus lungo tutta la filiera idrica con concentrazioni variabili a seconda dei diversi tipi di acqua;
- l'assenza di correlazione con gli indicatori microbici di contaminazione fecale, fatta eccezione per acque di buona qualità quali quelle potabili;
- un andamento decrescente della carica virale dalle acque reflue non trattate fino all'assenza nelle acque potabili.

In aggiunta a queste prime informazioni preliminari, bisognerà valutare se le diverse abitudini alimentari e la distribuzione ecologica delle piante possano influenzare la presenza e la quantità di PMMoV nelle matrici idriche a seconda delle diverse Regioni geografiche.

Sebbene il PMMoV offra interessanti funzionalità come indicatore di contaminazione fecale, diverse lacune conoscitive (nello specifico: la persistenza di PMMoV negli ambienti acquatici, la correlazione con i virus patogeni umani, l'effetto della sua diversa morfologia sui tassi di rimozione/riduzione durante i processi di trattamento) dovranno necessariamente essere colmate. È auspicabile che siano sviluppati studi ampi e approfonditi prima della sua eventuale valutazione di idoneità come indicatore virale di inquinamento fecale nelle acque. ■

## Dichiarazione sui conflitti di interesse

*Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.*

## Riferimenti bibliografici

1. Fout GS, Borchardt MA, Kieke Jr BA, et al. Human virus and microbial indicator occurrence in public-supply groundwater systems: meta-analysis of 12 international studies. *Hydrogeol J* 2017;25(4):903-19.
2. Farkas K, Walker DI, Adriaenssens EM, et al. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. *Water Res* 2020;181:115926.
3. Wetter C, Conti M, Altschuh D, et al. Pepper Mild Mottle Virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology* 1984;74:405-10.
4. Zhang T, Breitbart M, Lee WH, et al. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* 2006;4(1):e-3.
5. Kitajima M, Sassi HP, Torrey JR. Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *NPJ Clean Water* 2018;1, Article Number 19 (doi: <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0019-5>).
6. Colson P, Richet H, Desnues C, et al. Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, Fever, abdominal pains, and pruritus in humans. *PLoS ONE* 5 2010;5(4):e10041.
7. United States Environmental Protection Agency. *Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality; no. 820-R-15-098*. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2015.
8. Rosario K, Symonds EM, Sinigalliano C, et al. Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(22):7261-7.
9. Bonanno Ferraro G, Suffredini E, Mancini P, et al. Pepper Mild Mottle Virus as indicator of pollution: assessment of prevalence and concentration in different water environments in Italy. *Food Environ Virol* 2021;13(1):117-25.