

I VIRUS NELL'ACQUA E LE MALATTIE IDROTRASMESSE.

A cura del gruppo di lavoro di virologia ambientale:

Michele Muscillo, Giuseppina La Rosa, Manoochehr Pourshaban e Marcello Iaconelli.

Le malattie idrotrasmesse

Si definiscono malattie virali idrotrasmesse tutte quelle patologie infettive dell'uomo e degli animali associate all'uso diretto o indiretto dell'acqua. I virus enterici sono sempre stati la causa principale di malattie infettive associate al consumo di acqua contaminata da materiale fecale. Le epidemie di origine idrica, o tecnicamente *waterborne diseases*, sono sicuramente sottostimate per la mancanza di adeguati programmi di sorveglianza epidemiologica.

I virus enterici responsabili di epidemie di gastroenteriti di origine idrica sono: enterovirus, norovirus, adenovirus, virus dell'epatite E e dell'epatite A, rotavirus. I virus enterici sono responsabili di un vasto spettro di patologie, tra cui le più note sono le paralisi flaccide permanenti o transitorie, gastroenteriti, meningiti asettiche, encefaliti, miocarditi e pericarditi. Poiché essi sono caratterizzati da una circolazione prevalentemente asintomatica, vi è una grave sottostima della loro diffusione nell'uomo e nell'ambiente. La ricerca degli **enterovirus** nei campioni ambientali ed il loro significato forense risale al recepimento della direttiva Comunitaria 76/160 dell'8 dicembre 1975. Al contrario negli ultimi anni gli adenovirus ed i norovirus stanno destando un crescente interesse in campo ambientale. Infatti la comunità europea ha di recente finanziato il progetto VIROBATHE per una stima della diffusione degli adenovirus e norovirus nelle acque di balneazione, per una proposta di revisione delle normative comunitarie in materia di balneazione. Gli **adenovirus** sono responsabili di un ampio spettro di forme cliniche che, sebbene nella maggior parte dei casi si risolvano spontaneamente, possono dare forme assai gravi o letali nei bambini e nei pazienti immunocompromessi. Spesso danno infezioni latenti riattivate a distanza di tempo. La maggior parte di essi causano malattie respiratorie, tranne il tipo 40 e 41 che danno gastroenteriti, si isolano dalle feci, dalle secrezioni delle mucose nasali, congiuntivali e della faringe. In alcuni casi possono causare infezioni importanti come epatiti, nefriti, miocarditi, meningoencefaliti. Sierotipi particolarmente virulenti, come per esempio il 14, sono venuti recentemente alla cronaca in quanto responsabili di numerosi decessi negli USA.

Esistono scarse informazioni sulla epidemiologia delle infezioni da Adenovirus in Italia e sulla distribuzione dei sierotipi circolanti nell'uomo, nei pazienti immunocompromessi e nell'ambiente. L'*Environmental Protection Agency of America* (USEPA) ha introdotto gli adenovirus nella "Contamination Candidate List" inserendoli tra i 4 principali microrganismi da monitorare per le acque potabili.

I **norovirus** presentano diffusione mondiale nell'uomo e negli animali e nei paesi industrializzati sono i più comuni agenti virali responsabili nell'uomo di gastroenteriti epidemiche e con un ruolo importante nelle gastroenteriti sporadiche. I norovirus vengono classificati in cinque diversi genogruppi, denominati da GI a GV, sulla base di analisi filogenetiche; tali genogruppi sono ulteriormente suddivisi in 29 *cluster* genetici a loro volta comprendenti diversi tipi. La trasmissione dei norovirus può avvenire per consumo di alimenti contaminati, e/o di acqua contaminata, contatto persona-persona o per contatto diretto con superfici contaminate. Sono considerati attualmente patogeni emergenti data la loro grande diffusione in diverse tipologie di ambienti, la capacità di dare luogo ad infezioni clinicamente rilevanti in tutti i gruppi di età e di trasmettersi con diverse modalità, così come l'elevata diversità genetica e la capacità di sviluppare nell'uomo una immunità di tipo breve.

L'epidemiologia di patogeni responsabili di malattie *waterborne* è complessa e la potabilizzazione dell'acqua da bere e un adeguato trattamento dei liquami grezzi, sono gli unici mezzi per il controllo e prevenzione di malattie derivanti dalla contaminazione virologica dell'acqua.

Normative di riferimento.

- Valutazione parametro enterovirus normato dalla Direttiva Comunitaria 76/160 dell'8 dicembre 1975 con il DPR 14-5-1988 n. 155 e DPR 236 del 24-5-1988, riguardanti acque di balneazione ed acque ad uso potabile
- Valutazione parametro enterovirus normato dalla Circolare Min.Ambiente n.260/3/01 e successivi D.M. 24/01/1996, D.Lgs. 152/1999 (art.35) riguardanti l'identificazione di enterovirus nel materiale di dragaggio.
- D.lgs 11 maggio 1999, n. 152 "Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva91/271/Cee Gazzetta ufficiale 30 luglio 1999, n. 177 e successive integrazioni.

Progetti rilevanti, nazionali ed europei finalizzati alla revisione di normative.

- **1995-1996** ricerca degli enterovirus nelle acque di balneazione nell'ambito di una convenzione MURST-ISS.
- **2005-2006** il gruppo di lavoro partecipa come U.O. 13 al progetto europeo VIROBATHE, "Sixt Framework Programme- Specific Targeted Research Project. Methods For The Concentration And Detection Of Adenoviruses And Noroviruses In European Bathing Waters With Reference To The Revision Of The Bathing Water Directive 76/160/EEC" . Il progetto ha visto coinvolti 9 stati (Italia, Francia, Germania, Spagna, Portogallo, Olanda, RegnoUnito, Polonia e Cipro) per un totale di 16 gruppi di ricerca compreso l'ISS (Inizio 2005-fine 2007)
- *Management Committee* del progetto europeo COST-Action929 che si occupa del network europeo di Virologia ambientale ENVIRONET (inizio 2006-fine 2010).
- Progetto CCM del Ministero della Salute riguardante la diagnostica rapida dei virus nei liquami (inizio 2008-fine 2009)

Attività di ricerca e potenzialità istituzionali attuali del gruppo di lavoro.

- a) Identificazione molecolare mediante RealTime PCR di enterovirus, adenovirus e norovirus GI, GII e GIV umani in campioni ambientali tra cui: **acque di mare, acque dolci e liquami, acque depurate destinate all'agricoltura, acque provenienti da dissalatori per uso umano**. Gli standard di calibrazione relativi ai virus ad RNA sono prodotti in ISS mediante sintesi in vitro dell'RNA da DNA clonato in vettori plasmidici;
- b) identificazione molecolare mediante PCR ed analisi delle sequenze di **Teschovirus** ed **enterovirus** suini nell'acqua destinata agli allevamenti;
- c) identificazione molecolare mediante PCR ed analisi delle sequenze di **reovirus** umani ed animali nell'acqua e negli aerosol;
- d) preparazione di campioni d'acqua per la ricerca di virus dell'**influenza aviaria**,
- e) identificazione e classificazione di enterovirus umani nelle **sabbie di dragaggio** destinate ai ripascimenti delle spiagge. L'identificazione riguarda l'identificazione delle particelle virali con un sistema integrato RealTime-culture cellulari,
- f) identificazione e valutazione dell'efficienza dei depuratori di acque reflue urbane. Tale indagine comprendono, gli indicatori batterici di riferimento *E.coli* (ISO9308-1 / ISO9308-3) ed *Enterococchi* (ISO7899-1 / ISO7899-2), valutazione comparata di genomi virali entrata/uscita dei depuratori e test integrati RealTime culture-cellulari.
- g) *Repository* biologica ed *in silico*. Disponibilità di ceppi virali catalogati, metodologie disponibili *online* per l'identificazione molecolare dei virus, simulazioni di PCR provvisoriamente implementati su server Linux (<https://cosmos.bio.uniroma1.it>).
- h) Preparazione di campioni ambientali per l'identificazione di microrganismi virali associati all'antrace in attacchi bioterroristici.

Pubblicazioni più rappresentative

- 1) **Muscillo M.**, Aulicino F. A., Patti A. M., Orsini P., Volterra, L., Fara G. M.. Molecular techniques for the identification of enteric viruses in marine waters. *Water Res.* **28**: 1-7, (1994).
- 2) **Muscillo M.**, La Rosa G., Aulicino F.A., Aulicino F.A., Orsini P., Bellucci C., and Micarelli R. Comparison of cDNA probe hybridizations and RT-PCR detection methods for the identification and differentiation of enteroviruses isolated from sea water samples. *Water Res.* **29**: 1309-1316, (1995).
- 3) **Muscillo M.**, Carducci A., La Rosa G., Cantiani L., Marianelli C. Enteric virus detection in Adriatic Sea water by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis. *Water Res.* **31**: 1980-1984 (1997).
- 4) **Muscillo M.**, La Rosa G. Carducci A., Cantiani L., Marianelli C. Molecular analysis of poliovirus 3 Isolated from an aerosol generated by a waste water treatment plant. *Water Res.* **31**: 3125-3131, (1997).
- 5) **Muscillo M.**, La Rosa G., Carducci A., Cantiani L., Marianelli C. Molecular and biological characterization of poliovirus 3 strains isolated in adriatic seawater samples. *Water Res.* **33**: 3204-3212 (1999).
- 6) Carducci A., Tozzi E., Rubulotta E., Casini B., Cantiani L., Rovini E., **Muscillo, M.** and Pacini R. Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. *Water Res.*, **34**: 1173-1178, (2000).
- 7) **Muscillo M.**, La Rosa G., Marianelli C., Zaniratti S., Capobianchi M.R., Cantiani L., and Carducci A. A new RT-PCR method for the identification of reoviruses in seawater samples. *Water Res*, **35**: 548-556, (2001).
- 8) Manzara S., **Muscillo M.**, La Rosa G., Marianelli C., Cattani P. and G. Fadda. Molecular identification and typing of Enteroviruses isolated from clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.* **40**: 4554-4560, (2002).
- 9) Falcone E., Cordioli P., Tarantino M., **Muscillo M.**, La Rosa G., and Tollis M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. *Vet. Res. Commun.* **27**: 485-494, (2003).
- 10) Falcone E., Cordioli P., Tarantino M., **Muscillo M.**, Sala G., La Rosa G., Archetti I.L., Marianelli C., Lombardi G., and Tollis M. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2) isolated from a contaminated vaccine. *Vet. Res. Commun.* **27**: 577-589, (2003).
- 11) Di Trani L., Bedini B., Cordioli P., **Muscillo M.**, Vignolo E., Moreno A., and Tollis M. Molecular characterization of low pathogenicity H7N3 avian influenza viruses isolated in Italy. *Avian Dis.* **48**: 376-383, (2004).
- 12) Minosse C., Zaniratti M.S., Calcaterra S., Carletti F., **Muscillo M.**, Pisciotta M., Pillitteri L., Corpolongo A., Lauria F.N., Narciso P., Anzidei G., and Capobianchi M.R. Application of a Molecular Panel To Demonstrate Enterotropic Virus Shedding by Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *J Clin Microbiol* **43**: 1979-1981, (2005).
- 13) **Muscillo M.**, La Rosa G., Sali M., De Carolis E., Adone R., Ciuchini F., and Fasanella A. Validation of a pXO2-A PCR Assay To Explore Diversity among Italian Isolates of Bacillus anthracis Strains Closely Related to the Live, Attenuated Carbosap Vaccine. *J Clin Microbiol* **43**: 4758-4765, (2005).
- 14) Faustini A., Fano V., **Muscillo M.**, Zaniratti S., La Rosa G., Tribuzi L., Perucci C.A. An outbreak of aseptic meningitis due to Echovirus 30 associated with attending school and swimming in pools. *Int. J. Infect. Dis* **10**: 291-7 (2006).
- 15) La Rosa G., **Muscillo M.** Sali M., De Carolis E., Marianelli C., Civilini M., Fasanella A., and Adone R. Molecular study of genes involved in virulence regulatory pathways in Bacillus anthracis vaccine strain "Carbosap". *New Microbiol.* **29**: 307-310, (2006).
- 16) La Rosa G., **Muscillo M.**, Iaconelli M., Di Grazia A., Fontana S., Sali M., De Carolis E., Cattani P., Manzara S., Fadda G. Molecular characterization of human adenoviruses isolated in Italy. *New Microbiol* **29**: 177-84, (2006).
- 17) La Rosa G., Muscillo M., Di Grazia A., Fontana S., Iaconelli M., and Tollis M. Validation of

RT-PCR Assays for Molecular Characterization of Porcine Teschoviruses and Enteroviruses. *J.Vet.Med.Series B* **53**: 257-265. (2006).

- 18) **Muscillo, M.**, F. A. Aulicino, P. Orsini, C. Bellucci, G. La Rosa, and L. Volterra. Standardizzazione di un metodo "dot-blot" per l'identificazione molecolare di enterovirus in campioni ambientali mediante cDNA sonde. *Ann. Ig.* **4**: 255-261. (1992)
- 19) **Muscillo M.** e La Rosa G. Identificazione di enterovirus in lisati cellulari mediante RT-PCR: differenziazione fra poliovirus e non-poliovirus. *L' Igiene Moderna*, **103**: 223-236, (1995).
- 20) La Rosa G, **Muscillo M**, Iaconelli M, Di Grazia A, Fontana S, Sali M, De Carolis E, Cattani P, Manzara S, Fadda G. Molecular characterization of human adenoviruses isolated in Italy. *New Microbiol* 29: 177-84, (2006).
- 21) La Rosa, G., Fontana, S., Di Grazia, A., Iaconelli, M., Pourshaban, M., and **Muscillo, M.** Molecular Identification and Genetic Analysis of Norovirus Genogroups I and II in Water Environments: Comparative Analysis of Different Reverse Transcription-PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (13), 4152-4161, (2007).
- 22) **Muscillo, M.**, Pourshaban, M., Iaconelli, M., Fontana, S., Di Grazia, A., Manzara, S., Fadda, G., Santangelo, R, and La Rosa, G. Detection and Quantification of Human Adenoviruses in Surface Waters by Nested PCR, TaqMan Real-Time PCR and Cell Culture Assays. *Wat Air Soil Pollut* . 2008. *In press*

Rapporti ISTISAN

- 23) **Muscillo M.** Metodi di identificazione di virus enterici in campioni ambientali. *In*: Aulicino F.A., Orsini P., Volterra L e **Muscillo M** (Ed.). La ricerca dei virus enterici nelle acque e in varie matrici ambientali. Roma, Istituto Superiore di Sanità. *Rapporti Istisan* **93/20**, pp 125-141, (1993).
- 24) **Muscillo M.**, La Rosa G. (Ed.) Rapporto sulle malattie infettive di origine idrica. La reazione di polimerizzazione a catena per l'identificazione dei virus enterici nell'acqua. *Rapporti Istisan* **95/33**, (1995).
- 25) **Muscillo M.**, La Rosa G.. I virus nell'acqua. *In*: E. Funari, M. Ottaviani (Ed.). Aspetti igienico sanitari delle acque destinate al consumo umano. Roma, Istituto Superiore di Sanità. *Rapporti Istisan* **97/9**, pp 49-97, (1997).
- 26) **Muscillo M.**, La Rosa G., Marianelli C., Cantiani L., and Carducci A. Caratterizzazione di virus enterici dell'Adriatico centrosettentrionale mediante tecniche di biologia molecolare. *In*: Enzo Funari. (Ed.). *Alcuni studi su problematiche sanitarie per la salvaguardia del Mare Adriatico - Prima Fase*. Roma, Istituto Superiore di Sanità. *Rapporti Istisan* **99/34**, pp 10-37, (1999).
- 27) **Muscillo M.** and e La Rosa G. Approccio genomico, relativo all'antrace, sulla biodifesa delle risorse idriche destinate al consumo umano. Ottaviani, M., Drusiani, R., Lucentini, L., Ferretti, E., and Bonadonna, L. (Ed.). Misure di prevenzione e di sicurezza dei sistemi acquedottistici nei confronti di possibili atti terroristici . [Appendice 2]. Roma, Istituto Superiore Sanita, Ministero della Salute, Federgasacqua. *Rapporti Istisan* **05/4**, 78-96, (2005)
- 28) La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., and **Muscillo, M.** Epidemie associate agli adenovirus nelle acque di piscina. *In*: L. Bonadonna and G. Donati (Ed.). Piscine ad uso natatorio: aspetti igienico-sanitari e gestionali per l'applicazione della nuova normativa. Roma, Istituto Superiore di Sanità. *Rapporti Istisan* **07/11**, pp 82-90, (2007).
- 29) Faustini A., Fano V., **Muscillo, M.**, Zaniratti, S, La Rosa, G., Tribuzi, L., and Perucci C.A. Indagine su un'epidemia di meningite asettica da Echovirus 30. L. *In*: Bonadonna and G. Donati (Ed.). Piscine ad uso natatorio: aspetti igienico-sanitari e gestionali per l'applicazione della nuova normativa. Istituto Superiore di Sanità. *Rapporti Istisan* **07/11**, pp 91-100, (2007)