

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

**La ricerca dei virus enterici nelle acque
e in varie matrici ambientali**

**Corso tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità
Roma, 23-25 novembre 1992**

**Atti a cura di
Francesca Anna Aulicino, Patrizia Orsini, Laura Volterra, Michele Muscillo**

Laboratorio di Igiene Ambientale

Istituto Superiore di Sanità, Roma

La ricerca del virus enterici nelle acque e in varie matrici ambientali. Corso tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità, Roma, 23-25 novembre 1992. Atti.

A cura di Francesca Anna Aulicino, Patrizia Orsini, Laura Volterra, Michele Muscillo

Giu 93, 182 p. Rapporti ISTISAN 93/20 (in italiano)

Lo sviluppo di un programma nazionale per la ricerca del parametro "enterovirus" nelle acque di balneazione ha determinato l'attivazione di unità periferiche di controllo, ha stimolato la collaborazione tra enti regionali deputati al controllo e centri di ricerca (per lo più universitari) ed ha spinto l'Istituto Superiore di Sanità a sviluppare tecniche di accertamento sui virus isolati, in modo da poter valutare il rischio teorico associabile alla diffusa presenza di questi microrganismi nell'ambiente.

Parole chiave: Acque, Acque marine, Enterovirus, Fanghi, Liquami, Virus.

Istituto Superiore di Sanità, Rome (Italy)

Research of enteric viruses in waters and other environmental matrices. Course held at the Istituto Superiore di Sanità, Rome, November 23-25, 1992. Proceedings.

Edited by Francesca Anna Aulicino, Patrizia Orsini, Laura Volterra, Michele Muscillo

Jun 93, 182 p. Rapporti ISTISAN 93/20 (in Italian)

The development of a national programme on bathing water monitoring for detecting enterovirus presence has contributed to activate periferical units of control, establish interactions among regional centers encharged of the environmental monitoring and research groups mainly belonging to the universities. The Istituto Superiore di Sanità (ISS) has developed techniques able to solve the problem of the theoretical risk due to the viral spread in the environment.

Key words: Enteroviruses, Sea water, Sewage, Sludges, Virus, Waters.

Indice

- Il significato della ricerca di virus in matrici ambientali (Laura Volterra)	1
- Sopravvivenza di virus enterici in ambienti diversi (Anna Maria Patti)	3
- La ricerca di enterovirus con sistemi di flocculazione: vantaggi e svantaggi (Annalaura Carducci)	14
- Metodi di concentrazione utilizzabili per il rilevamento di virus in acque superficiali e profonde (Giovanni Sansebastiano, Vania Rebizzi, Ennio Bellelli)	25
- Metodi di rilevamento di virus nell'acqua di rubinetto (Maria Romano)	33
- Pericolosità dei virus enterici nei fanghi di depurazione delle acque reflue urbane (Antonio Colombi, Lorenzo Giubileo)	50
- Contaminazione virale di un bacino lacustre (Angela Moiraghi Ruggenini, Angela Maiello, Orietta Ossola)	64
- Virus enterici ricercati nelle acque di balneazione del litorale romagnolo: campagne di monitoraggio (Gianna Bucci)	77
- Metodi di rilevamento di virus enterici nelle acque di mare: esperienze maturate (Francesca Anna Aulicino)	87
- Rilevamento di virus enterici in campioni "particolari" come gelatina e solidi sospesi (Patrizia Orsini, Francesca Anna Aulicino)	110

- **Metodi di identificazione di virus enterici in campioni ambientali**
(Michele Muscillo) 125

- **Proposte di tecniche per la concentrazione di campioni di provenienza ambientale**
(Francesca Anna Aulicino, Patrizia Orsini, Alessandra Mastrantonio, Carla Bellucci, Michele Muscillo, Anna Maria Patti, Laura Volterra) 142

- **Schede di accompagnamento campioni**
(Francesca Anna Aulicino, Patrizia Orsini, Laura Volterra) 174

IL SIGNIFICATO DELLA RICERCA DEI VIRUS IN MATRICI AMBIENTALI

L. VOLTERRA, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il programma per la ricerca degli enterovirus avviato sul territorio nazionale ed indirizzato prioritariamente alle acque di balneazione ha prodotto effetti positivi che si possono riassumere nella:

1. sensibilizzazione delle amministrazioni regionali;
2. formazione culturale e professionale degli operatori periferici;
3. migliore conoscenza della realtà ambientale per quanto attiene questo specifico parametro recepito dalla normativa italiana con il DPR 470/82 ed il DL n° 155 del 14/5/1988.

La proposizione di un protocollo operativo comprendente la fase del prelievo/trattamento del campione, nonché della metodica analitica, ha gettato le basi per una comparabilità dei risultati. Prove di laboratorio eseguite in condizioni controllate hanno validato le tecniche fissate. Controlli di campo fatti direttamente dall'Istituto Superiore di Sanità o in collaborazione con altre unità sono stati utilizzati per verificare l'applicabilità del metodo, per evidenziare eventuali difficoltà, per conoscere la dimensione del problema ambientale relativo alla diffusione degli enterovirus.

Le prime campagne di rilevamento hanno dimostrato spesso la mancanza di correlazione tra enterovirus, da un lato, e fecalizzazione ed eutrofizzazione dall'altro. Virus erano rinvenibili in aree giudicabili idonee alla balneazione con colimetrie e streptococcometrie tendenti o eguali a zero. Forme virali non erano spesso isolabili in tratti di mare affetti da fioriture algali in atto. Accertamenti effettuati sul tipo di forme virali sviluppate sui monostrati cellulari hanno dimostrato come sia più ricorrente l'isolamento di virus enterici piuttosto che quello di "enterovirus" come prescritto dalla normativa. Si poneva, così, l'interrogativo di quale significato sanitario attribuire ai ritrovamenti ed alle richieste di legge.

Poiché gli enterovirus classici: polio, echo e coxsackievirus, pur ritrovati in acque potabilizzate, non risulta abbiano indotto patologie manifeste nei consumatori, sia per le basse dosi assumibili con l'acqua da bere, sia per l'alto grado di copertura immunitaria della popolazione esposta, si è concluso che la presenza di queste specifiche particelle virali assolve il ruolo più di "indicatore" di qualità che quello di rischio reale. Tuttavia esiste la certezza che altri virus più genericamente "enterici" abbiano una rilevanza fondamentale nella diffusione di patologie più o meno gravi che vanno dall'epatite infettiva alle generiche gastroenteriti. Non si può, quindi, non attribuire a queste ultime particelle virali un ruolo infettivo ed una virulenza spinta basata su un rapporto risposta/dose che prevede l'assunzione di piccoli numeri di virus.

Del resto le attuali metodiche di analisi, se si limitassero al rilevamento dell'effetto citopatico sui monostrati cellulari non sarebbero in grado di discriminare le particelle coltivabili in enterovirus ed in virus enterici.

Il passaggio biologico su cellule non è in grado di escludere nemmeno che altri virus di origine animale siano in grado di infettare e di crescere all'interno delle strutture citoplasmatiche.

Un campione ambientale può contenere una miscela di inquinanti virali, ciascuno con una virulenza specifica nei confronti del substrato culturale fornito, virulenza che potrebbe essere anche potenziata o attutita da fattori chimici, fisici e biologici che ciascun virus ha, per caso, "subito" spazio-temporalmente nell'ambiente in cui si è venuto a trovare. Ciò comporta che nell'ambito dell'arricchimento su monostrato cellulare tra le varie forme presenti qualcuna sopravvanti le altre nascondendo queste ultime ad un successivo rilevamento anche basato su tecniche di biologia molecolare. Allo stato attuale, infatti, tali metodologie volte ad accertare che tipo di virus è stato isolato o si è, successivamente, sviluppato su un tappeto cellulare richiedono una quantità minima di virus pari a 10^5 TCID₅₀.

Quanto sopra serve a mitigare i risultati fino ad oggi ottenuti in questo settore della microbiologia ambientale e a far comprendere che ad essi non può essere attribuito un valore "oggettivo" risolutivo dei problemi che si pongono più propriamente gli igienisti.

E' ipotizzabile che in futuro, grazie all'impiego di tecnologie sempre più sensibili e potenti non sia più necessario magnificare il titolo virale, ricorrendo al principio della infettività cellulare, ma possa essere sufficiente operare direttamente sui concentrati grazie all'amplificazione genomica. In linea teorica il futuro dovrebbe tendere a bypassare il gradino della crescita su cellule e ad analizzare direttamente gli acidi nucleici estraibili dalle unità virali concentrate dal volume trattato. In questo futuro l'analisi del rischio reale/effettivo potrà costituire la filosofia in base alla quale definire criteri e standard di qualità. Questi potranno essere distinti in criteri e standard di qualità igienica e criteri e standard di qualità ambientale. I primi indicheranno il rischio di trasmissione di patologie per l'uomo, i secondi la pressione che tutte le forme viventi esercitano su uno specifico ambiente naturale.

Allo stato attuale il ritrovamento di virus, secondo le procedure disponibili, è espressione indiretta della possibile fecalizzazione umana o animale.

Non si può, infine, trascurare il significato che la presenza diffusa di virus anche non umani può avere in natura. Interrelazioni fino ad ora non studiate tra queste particelle ed altre forme di vita potrebbero rivelarsi importanti non solo per comprendere fenomeni di collassi improvvisi di popolazioni algali, di morie di specie animali, etc., ma anche per comprendere le potenzialità plastiche di un ambiente in cui scambi di materiale genico potrebbero essere mutuati da processi di trasformazione e di trasduzione. Lo studio della componente virale che ha avuto inizialmente un indirizzo sanitario potrebbe acquisire, così, un più generale significato ambientale.

SOPRAVVIVENZA DI VIRUS ENTERICI IN AMBIENTI DIVERSI

A. M. PATTI

Istituto di Igiene "G. Sanarelli"
Università "La Sapienza" ROMA

La reale estensione della contaminazione ambientale da virus enterici è fenomeno difficile da valutare: già nel 1971 Akin riteneva che potesse interessare approssimativamente il 36% di tutte le acque di superficie (1). Virus enterici si possono presumere oltre che in qualsiasi tipo di acqua possa essere contaminato da liquami umani, anche nei suoli ove i liquami sono dispersi per spandimento o utilizzati a scopo agricolo come tali o come fanghi di risulta.

Il numero e i tipi di virus variano grandemente a seconda dell'incidenza delle infezioni virali enteriche nelle diverse popolazioni, dei livelli socio economici e sanitari della popolazione, dei criteri di smaltimento dei liquami, della stagione, delle piogge ecc. Il numero delle particelle virali isolate da acque di superficie da ricercatori di diversi paesi varia, anche a seconda delle tecniche utilizzate, da 0,1 a 620 PFU/litro (2). Probabilmente si tratta sempre di sottostime dati i limiti che ancora esistono nella metodologia di recupero dei virus.

Nell'ambiente idrico i virus sono comunque molto diluiti; d'altra parte bisogna tenere presente che, essendo esclusivamente dei patogeni, il loro numero non raggiunge mai, neppure nei liquami, quello degli indicatori batterici di contaminazione fecale.

Si presuppone, infatti, una concentrazione media di particelle virali variabile da 10000 TCID 50/litro di liquame, secondo stime USA, a 500000, secondo dati provenienti dal Sud Africa e da Israele (3); è logico quindi che nelle acque di superficie la concentrazione delle particelle virali sia di molto inferiore per effetto della diluizione. I virus, inoltre, non possono moltiplicarsi nell'ambiente dato che sono parassiti endocellulari obbligati, dotati di specificità di ospite.

Tuttavia la loro presenza in qualsiasi tipo di acqua destinato al consumo umano, ad attività ricreative, alla molluschicoltura o ancora nei terreni in prossimità di falde idriche o in quelli destinati alla coltivazione di ortaggi, costituisce un importante problema di sanità pubblica, in quanto i virus sono in grado di dare infezione a dosi infettanti minime: in teoria una sola particella virale è in grado di determinare infezione, anche se poi lo sviluppo della malattia clinica dipende da numerosi altri

fattori che includono lo stato immune e l'età dell'ospite, la virulenza del microrganismo, il tipo di virus ecc.

Nell'ambiente i virus sono sottoposti all'azione di svariati fattori che possono avere un'influenza negativa sul mantenimento della loro infettività o viceversa possono addirittura esercitare un'azione protettiva. Va sottolineato subito che le particelle virali resistono nell'ambiente molto meglio e più a lungo dei batteri che vengono utilizzati come indicatori di contaminazione fecale.

In letteratura vengono riportati tempi di sopravvivenza virale di 2-168 giorni in acqua di rubinetto, 2-130 giorni in acqua di mare, 25-125 giorni nel suolo e fino a 90 giorni nei mitili (4). Negli ultimi anni si è notato un risveglio di interesse sulle caratteristiche di sopravvivenza dei batteri indicatori e dei patogeni nell'ambiente, particolarmente in quello idrico, sia in relazione alla messa a punto di appropriati standards per le acque di balneazione e per le acque utilizzate per la coltivazione dei mitili, sia in relazione all'utilizzo di acque di superficie a scopo potabile.

Diverse critiche sono state rivolte a quelle normative, quali la direttiva CEE e le leggi italiane attualmente in vigore, che basano sugli standard batteriologici il giudizio della qualità igienica delle acque. La critica più interessante concerne l'importanza attribuita alla colimetria in assenza di basi epidemiologiche. Gli studi EPA hanno messo in evidenza che vi è un misurabile rischio di contrarre infezioni gastrointestinali a probabile etiologia virale in presenza di acque con coliformi fecali e totali nei limiti di legge. Gli stessi studi hanno anche dimostrato che la concentrazione di enterococco potrebbe correlare meglio con la presenza di particelle virali data la minore sensibilità ad agenti inattivanti naturali o ai disinfettanti (5).

I virus enterici possono quindi sopravvivere al di fuori delle cellule ospiti per giorni oppure per mesi. La sopravvivenza, se così si può dire parlando dei virus che si trovano al limite tra strutture chimiche complesse e microrganismi molto primitivi, dipende dal tipo di virus e dalle condizioni ambientali. E' forse più corretto parlare di inattivazione virale, intendendo con tale termine la perdita della capacità dei virioni di infettare le cellule ospiti. Tale fenomeno si realizza in natura, ma anche sperimentalmente, con procedure che interferiscono con l'attacco dei virus ai recettori cellulari, alterando il rivestimento proteico in modo da renderlo irriconoscibile alle cellule target o distruggendo l'attività biologica dell'acido nucleico, in modo tale da rendere impossibile la replicazione. La semplice rimozione e/o l'alterazione del capsido lascia il genoma intatto e quindi mantiene il potenziale infettivo del virus, sebbene in pratica in tal modo la particella virale può non essere infettiva.

Temperatura, luce, pH, sostanze organiche, presenza di altri microrganismi, presenza di particolato solido sospeso possono compromettere la sopravvivenza virale o viceversa proteggere l'integrità delle particelle virali (6).

L'influenza dei vari fattori ambientali sul mantenimento dell'infettività delle particelle virali è stata determinata in esperimenti di laboratorio in cui diversi ricercatori hanno tentato di ricostruire un ambiente simile a quello naturale o hanno viceversa tentato di esaminare un fattore per volta.

L'esame dei dati bibliografici deve quindi tenere conto della diversità delle procedure adottate e del fatto che non è facile chiarire la cinetica di inattivazione. Certamente però questi studi hanno fornito numerose delucidazioni sul comportamento ambientale dei virus.

Occorre premettere, per una migliore comprensione del fenomeno, che in natura si ha un'azione concomitante dei diversi fattori inattivanti e protettivi; tuttavia per semplificare l'esposizione sarà opportuno esaminare i principali parametri separatamente, non dimenticando che i virus dimostrano un ampio spettro di sensibilità.

In laboratorio il tasso di inattivazione viene misurato in base all'equazione $K = (\ln C_0 - \ln C_t)/T$, cioè logaritmo naturale della concentrazione virale a tempo 0 meno logaritmo naturale della concentrazione virale residua a tempo t, diviso l'intervallo di tempo considerato.

La temperatura è probabilmente il più importante fattore che condiziona la perdita dell'infettività dei virus ed è comunque il solo fattore che è stato significativamente correlato con l'inattivazione virale.

In numerosi lavori sperimentali è stato dimostrato che l'incremento di temperatura comporta la denaturazione dell'acido nucleico e distrugge sia le proteine di superficie che quelle interne. Nell'applicazione pratica di questo principio occorre però tenere presente che, sebbene la maggior parte dei virus siano suscettibili all'incremento della temperatura, alcuni virus possono resistere a temperature variabili da 60 a 98°C. Tale resistenza che è dovuta all'acido nucleico, che mantiene l'infettività nonostante la rottura del capsido, viene trasmessa alla progenie virale cosicché si potrebbe addirittura ipotizzare una selezione di virus resistenti alle alte temperature (7,8).

All'azione della temperatura si addiziona quella della luce solare. Esperimenti condotti su colture di batteriofagi MS2, Ox-174, T7 hanno mostrato una mortalità significativamente più elevata rispetto ai controlli tenuti al buio. Ovviamente le radiazioni solari agiscono sugli strati superiori delle acque di superficie. Il danno fotochimico procurato è simile a quello che si riscontra in colture esposte ai raggi ultravioletti. Tuttavia si riscontra anche una minore suscettibilità alla luce solare dei

batteriofagi ad RNA e a DNA rispetto per es. a Escherichia coli il danno fotochimico riguarda essenzialmente l'acido nucleico (9).

In natura tuttavia l'azione della luce solare è contrastata dalla torbidità dell'acqua che ostacola il passaggio delle radiazioni.

Anche l'azione del pH è estremamente importante: Cords et al. sono riusciti ad ottenere l'inattivazione del coxsackievirus A13 inoculandolo in una soluzione tampone ipotonica; la perdita dell'infettività era dovuta alla perdita di un piccolo polipeptide, il VP4, con conseguente incapacità delle particelle virali di attaccarsi ai recettori delle cellule ospiti (10).

Risultati simili sono stati ottenuti anche con altri Picornavirus che sono stati inattivati mantenendoli in soluzioni con pH alcalini o viceversa acidi. Il Poliovirus, in soluzione di sali di ammonio a pH 9,5, viene inattivato a causa del clivaggio dell'acido nucleico che tuttavia resta racchiuso dal capsido. Si può presupporre che anche gli altri Picornavirus siano altrettanto sensibili ai pH alcalini.

I reovirus, invece, sembrano decisamente più resistenti.

L'azione inattivante dei fanghi digeriti anaerobicamente potrebbe per esempio essere spiegata con la loro abbondanza di ammonio. Nei fanghi l'ammonio non esplica quasi nessuna azione virulicida a pH compresi tra 4,5 e 7,5; incrementando il pH invece si incrementa l'inattivazione, sicuramente del poliovirus e presumibilmente, anche degli altri enterovirus (11).

L'utilizzo di alti pH nel trattamento dei fanghi potrebbe portare all'abbattimento della carica virale. In tal caso potrebbe essere più giusto utilizzare come indicatore dell'avvenuto processo di disinfezione non il Poliovirus ma i Reovirus.

I fattori inattivanti fisico-chimici sin qui considerati non sono i soli a ledere l'integrità delle particelle virali e ad interferire con il mantenimento dell'infettività.

All'inizio degli anni '60 è stata dimostrata l'esistenza nell'acqua di mare di fattori biologici dotati di azione antivirale (12).

L'attività virulicida del mare, denominata fattore MAVA (Marine Anti Viral Agent), venne accertata, in seguito, in esperimenti di laboratorio condotti da ricercatori di diversi Paesi: Matossian e Garabedian (1967) nel Mediterraneo lungo le coste di Israele, Shuval (1971) nel mar Rosso, Magnusson (1967) nel mar del Nord e nel Baltico, Akin (1975) nel Golfo del Messico, Lo (1976) nell'Atlantico, Fujioka (1980) nel Pacifico e altri autori ancora dimostrarono che tale attività antivirale era legata direttamente o indirettamente alla presenza e alle attività vitali di microrganismi marini (13,14,15,16,17,18). Infatti campioni di acqua di mare, sottoposti a diversi procedimenti di disinfezione, dalla sterilizzazione in autoclave o per filtrazione a quella

con cloro, perdevano la capacità di inattivare il poliovirus, in genere scelto per la conduzione degli esperimenti, data la facilità di coltivazione in vitro e la rapidità di crescita.

L'effetto MAVA venne dapprima addebitato al Vibrio marinus, poi al Flavobacterium sp. e quindi genericamente a batteri nativi marini. Il meccanismo dell'attività antivirale non è mai stato del tutto chiarito. Potrebbe essere dovuto ad una vera e propria predazione da parte di batteri che producono enzimi proteolitici in grado di digerire il capsido, oppure essere dovuto a polimeri batterici esocellulari che causano flocculazione o adsorbimento delle particelle virali (19). Probabilmente sono attendibili entrambe le spiegazioni, essendo reperibili in letteratura studi comprovanti ora l'una ora l'altra ipotesi.

Non sono soltanto le acque marine ad essere dotate di una naturale azione antivirale: fenomeni di inattivazione biologica sono stati descritti anche in altri tipi di acqua, con flora microbica diversa, sia ambientale sia dovuta allo scarico di liquami.

In uno studio da noi condotto qualche anno fa sull'acqua di Rio Martino, un canale che raccoglie reflui di parte della provincia di Latina, è stato possibile dimostrare l'esistenza di un fenomeno biologico di inattivazione del Poliovirus 1 e del virus dell'epatite A, pur essendo la contaminazione microbica di origine fecale (20). Tuttavia mentre il Poliovirus non è più rilevabile dopo pochi giorni in acqua di mare e di estuario, rispettivamente 5 e 7 giorni dall'inoculo, il virus dell'epatite A è ancora titolabile dopo 60 giorni in acqua di estuario e dopo 30 giorni in acqua di mare (21). Esistono pertanto delle differenze nei meccanismi di inattivazione esercitati dai vari tipi di acqua, probabilmente dovuti alla diversità dei batteri presenti e delle differenze di sensibilità ai diversi fattori biologici da parte dei vari virus.

Gli studi sul fenomeno dell'inattivazione biologica non si sono limitati ai diversi tipi di acqua. Particolarmente interessanti e probabilmente anche suscettibili di applicazione pratica, sono quelli condotti sui fanghi ottenuti negli impianti di depurazione dei liquami.

I risultati di esperimenti condotti con diversi virus enterici addizionati a fanghi attivati hanno dimostrato che le particelle virali subiscono un irreversibile processo di inattivazione che, sebbene si incrementi con l'incremento della temperatura, può ancora verificarsi a temperature prossime allo zero.

La causa dell'inattivazione appare legata alla frazione batterica presente nel liquame; infatti rimuovendo la frazione batterica si perde anche la capacità inattivante del liquame e, viceversa, del semplice brodo in cui i virus enterici mantengono per lungo tempo integra la loro infettività, acquista proprietà inattivanti se inoculato con il fango attivato e incubato a 37°C per tre giorni prima dell'aggiunta dei virus.

Anzi, in questo caso, la capacità virulicida, che si esplica in circa 16 ore, sembra molto più accentuata che nel fango. La frazione inattivante può essere eliminata dal fango per centrifugazione o per filtrazione ed è sensibile al calore. Ciò starebbe ad indicare che si tratti in effetti di batteri. In verità non è stato determinato se l'attività inattivante sia dovuta ai batteri come tali o a loro metaboliti, essendo questi inseparabili dalle cellule viventi; sembra comunque che l'azione virulicida sia di breve durata e che i metaboliti inattivanti debbano essere continuamente prodotti e comunque siano strettamente legati ai microrganismi stessi (22,23).

Simili proprietà sono state riscontrate in acque dolci e alcuni autori ritengono che l'attività virulicida sia dovuta ad enzimi proteolitici. Dato che non sono state rilevate differenze significative nel fenomeno di inattivazione virale nelle acque o nei fanghi attivati, si può presupporre che, anche in questi ultimi, la frazione attiva sia quella degli enzimi proteolitici prodotti dai batteri. Se questo fosse vero si potrebbe incrementare l'azione virulicida aumentando, per esempio, la concentrazione di questi enzimi aggiungendo appropriati microrganismi produttori.

In questo modo, oltretutto non dispendioso, potrebbe essere ridotta la carica virale degli effluenti degli impianti di depurazione dei liquami con conseguente diminuzione del rischio di infezioni virali.

L'inattivazione virale non è tuttavia così semplice da raggiungere perchè, accanto ai fattori che ledono l'integrità delle particelle virali, esistono altri fattori che esercitano un'azione protettiva e concorrono a mantenere a lungo l'infettività dei virus enterici. Innanzitutto bisogna ricordare che le particelle virali difficilmente si trovano isolate. Esse tendono per lo più, per effetto delle cariche di superficie, a formare degli ammassi, i cosiddetti clusters, che già di per sé esercitano un effetto protettivo in quanto i virioni che si trovano più all'interno non sono esposti all'azione dei fattori inattivanti naturali o artificiali. Probabilmente i cluster non sono formati da un solo tipo di virus; sperimentalmente è stata dimostrata la possibilità di aggregazioni tra poliovirus e reovirus.

Importante parametro condizionante il fenomeno dell'aggregazione virale è il pH: a pH 7, in soluzione tampone, i virus non si aggregano facilmente, in quanto viene raggiunto il punto isoelettrico. A pH 5 invece le particelle virali tendono a legarsi le une con le altre (24).

Analogamente a causa delle cariche elettriche superficiali, i virus tendono anche a legarsi a tutto il particolato sospeso nei vari tipi di acqua. Si ritiene che circa tre quarti dei virus che contaminano l'ambiente possano trovarsi adsorbiti ai solidi sospesi, risultando da

questa aggregazione un prolungamento della sopravvivenza virale. Esperimenti condotti nella baia di Galveston (USA) hanno dimostrato che si isola un numero molto maggiore di particelle virali dai solidi sospesi e dai sedimenti marini rispetto a quelli rilevati nelle rispettive acque (25).

Anche il virus dell'epatite A, isolato qualche anno fa da campioni prelevati in diversi punti dal Tevere, è stato in realtà isolato non dall'acqua, ma dal materiale solido raccolto durante il procedimento di prefiltrazione (26).

I sedimenti tendono quindi ad accumulare particelle virali che possono rimanere infettive anche per anni e possono poi essere risospese a causa, per esempio, del moto ondoso.

Particolarmente nel mare, questi meccanismi sono importanti in quanto contribuiscono a introdurre i virus nella catena alimentare e ad amplificare il rischio infettivo legato alla contaminazione delle acque.

I molluschi eduli lamellibranchi si nutrono filtrando l'acqua; in tal modo accumulano nell'epato pancreas anche le particelle virali sia in forma libera che associata ai solidi sospesi. I virus non vengono danneggiati e possono essere anche eliminati con le feci che, a loro volta, vengono ingerite dai policheati, che fungono da cibo per i granchi, i quali espellono ancora particelle infettive che possono adsorbirsi a sedimenti, rientrare in sospensione ed essere captati di nuovo dai mitili o dai pesci. I granchi, a differenza dei mitili, non sono sedentari e possono andare a distribuire particelle virali anche in zone batteriologicamente pure per assenza di scarichi.

I granchi, ma soprattutto i frutti di mare, se consumati crudi, costituiscono un importante fattore di rischio per epatite A, epatite E, gastroenteriti virali da virus di Norwalk, astrovirus, Snow Mountain agent (27).

Anche le alghe unicellulari interferiscono con il destino dei virus enterici. E' noto che le microalghe possono produrre sostanze ad azione antivirale; in tal senso sono riportati esperimenti svolti nell'ambito di studi di patologia vegetale.

Esperimenti che riguardano il ruolo delle alghe marine, diatomee e flagellate, sul mantenimento dell'infettività di alcuni enterovirus, sono stati svolti da noi dopo i noti fenomeni di bloom algale nel mare Adriatico. Tali studi, lungi dal fornire spiegazioni definitive, dimostrano però che in presenza di alghe il decadimento del titolo virale è innegabile. Le ipotesi da verificare per chiarire le cause di questo tipo di inattivazione riguardano la produzione di sostanze in grado di danneggiare le particelle virali oppure l'esistenza di un fenomeno di adsorbimento per interazione delle cariche elettriche presenti sia sulla superficie del virione che sulla parete cellulare delle alghe. La seconda ipotesi sembra più probabile, in quanto il filtrato delle colture algali non

provoca decadimento del titolo virale. Le particelle virali, invece, possono essere staccate dalle alghe sia per spostamenti di pH, sia per azione meccanica (28).

Come si può notare la quasi maggioranza degli studi riportati riguarda le acque. Ci sembra però opportuno ricordare l'importanza della contaminazione dei suoli. A parte le considerazioni ovvie sulla contaminazione degli ortaggi destinati ad essere consumati crudi, in tutti i terreni, per effetto del dilavamento delle piogge, le particelle virali percolano attraverso gli strati e possono raggiungere le acque profonde (29).

Nelle acque pure, prive di contaminanti batterici, come quelle minerali, i virus resistono molti mesi. E' stato sperimentalmente dimostrato che a temperatura ambiente il poliovirus resiste in acqua minerale per circa 270 giorni ed il virus dell'epatite A circa 330. A +4°C le particelle virali mantengono ancora più a lungo la loro infettività.(30).

Da quanto esposto si può dedurre come l'analisi del "comportamento ambientale" dei virus enterici sia di estrema importanza ed attualità, in un momento in cui la depauperazione delle fonti idriche rende sempre più necessaria l'utilizzazione di acque superficiali come fonte di acqua potabile, dopo che queste sono già state utilizzate per lo smaltimento dei liquami trattati e non. La grande capacità delle particelle virali di resistere alle sollecitazioni ambientali rende, inoltre, evidente l'insufficienza degli indicatori batterici di contaminazione fecale ad attestare anche una sicurezza virologica. Diviene quindi indispensabile l'analisi virologica dei liquami, anche di quelli trattati negli impianti di depurazione, delle acque destinate al consumo umano o all'allevamento dei frutti di mare o quantomeno l'individuazione di altri indicatori più attendibili degli attuali.

Bibliografia

1. AKIN,E.W., BENTON,W.H., HILL,W.F. 1971. Enteric viruses in ground and surface waters: A review of their occurrence and survival. In: Virus and water quality: occurrence and control. Thirteenth Water Quality Conference Proceedings, Univ. of Illinois, Urbana-Champaign pp.59-74
2. AULICINO, F.A., MUSCILLO, M., PATTI, A.M., ORSINI, P., VOLTERRA, L. 1991. Virus enterici nelle acque: epidemiologia e tecniche di isolamento e di identificazione. RAPPORTI ISTISAN 91/26: 59.
3. PATTI, A.M., PANÀ, A. 1989. Il destino dei patogeni nei liquami. Ann.Ig.Med.Prev.Com. I (6):1329-1336.

4. MELNICK, J.L., GERBA, C.P., WALLIS, C. 1978. Viruses in water. Bull W.H.O., 56 (4): 499-508.
5. EVISON, L.M. 1988. Comparative studies on the survival of indicator organisms and pathogens in fresh and sea water. Wat. Sci. Tech. 20 (11/12): 309-315.
6. HURST, C.J. 1988. Effect on environmental variables on enteric virus survival in surface freshwaters. Wat. Sci. Tech. 20 (11/12) 473-476.
7. LARKIN, E.P., FASSOLITIS, A.C. 1979. Viral Heat Resistance and Infectious Ribonucleic Acid. Appl. Environ. Microbiol. 38 (4): 650-655.
8. SATTAR, S.A. 1981. Virus survival in receiving waters. In: Viruses and Wastewater Treatment M. Goddard and Burler (eds) Pergamon Press New York.
9. KAPUSCINSKI, R.B., MITCHELL, R. 1983. Sunlight-induced mortality of viruses and Escherichia coli in coastal seawater. Environ. Sci. Technol. 17: 1-6
10. CORDS, C.E., JAMES, C.G., MCLAREN, L.C. 1975. Alteration of capsid proteins of coxsackievirus A13 by low ionic concentrations. Virology 15: 244-252.
11. KNOWLTON, D., WARD, R. 1987. Characterization of virucidal agents in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 53: 621-626.
12. PLISSIER, M., THERRE, P. 1961. Recherches sur l'inactivation in vitro du poliovirus dan l'eau de mer. Ann. Ist. Pasteur (Paris), 101: 840-844.
13. MATOSSIAN, A.M., GARABEDIAN, G.A. 1967. Virucidal action of seawater. Am. J. Epidemiol. 85: 1-8.
14. SHUVAL, H.I., THOMPSON, B., FATTAL, S. WEINER, Y. 1971. Natural virus inactivation processes in seawater. San. Eng. Div. AM. Soc. Civ. Eng. 5:587-600.
15. MAGNUSSON, S., GUNDERSEN, K., BRANDERBERG, A., LYCKE, E. 1967. Marine bacteria and their relationships to the virus inactivation capacity of seawater. Acta Pathol. et Microbiol. Scandin. Sect B 71: 274-280.

16. AKIN, E.W., HILL, W.H., CLARKE, N.A. 1975. Mortality of enteric viruses in marine and other waters. In Proceedings of the International Symposium on Discharge of Sewage from Sea Outfalls, Edited by Gameson A, Pergamon Press, New York, pp.1-9.
17. LO, S., GILBERT, J., HETRICK, F.M. 1976. Stability of human enteroviruses in lake water. Appl. Environ. Microbiol 32: 245-249.
18. FUJIOKA, R.S., LOH, P.C., LAU, S. 1980. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian Ocean environment: evidence for virus inactivating microorganisms. Appl. Environ. Microbiol 6: 1105-1110.
19. GUNDERSEN, K., BRANDERBER, A., MAGNUSSON, S., LYCKE, E. 1967. Characterization of a marine bacterium associated with virus inactivating capacity. Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 71: 281-286.
20. PATTI, A.M., SANTI, A.L., GABRIELI, R. ET AL. 1987. Hepatitis A virus and Poliovirus 1 inactivation in estuarine water. Wat. Res 21: 1335-1338.
21. PANÀ, A., CAULETTI, M., DE FILIPPIS, P., ET AL. 1988 Il controllo del virus dell'epatite A nell'ambiente. 33° Congresso nazionale S.I.I.M.P.S.P. Milano, 26-29 aprile
22. WARD, R. 1982. Evidence that microorganisms cause inactivation of viruses in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol 43: 1221-1224.
23. KNOWLTON, D., WARD, R. 1987. Characterization of virucidal agents in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol 53: 621-626
24. FLOYD, R. 1979. Viral aggregation: Mixed suspension of Poliovirus and Reovirus. Appl. Environ. Microbiol 38:980-986.
25. CHALAPATI RAO, V., SEIDEL, K.A., GOYAL, S.M., METCALF, T.G., MELNICK, J.L. 1984. Isolation of Enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of Poliovirus and Rotavirus adsorbed to sediments. Appl. Environ. Microbiol 48: 404-409.
26. PANÀ, A., DIVIZIA, M., DE FILIPPIS, P. ET AL. 1987. Isolation of hepatitis A virus from polluted river water on Frp/3 cells. Lancet II: 1328.

27. GERBA, C.P., GOYAL S.M. 1988. Enteric virus: risk assessment of ocean disposal of sewage sludge. Wat. Sci. Tech., 20, (11/12): 25-31
28. PATTI, A.M., AULICINO, F.A., DE FILIPPIS, P. ET AL. 1990. L'influenza delle alghe sul destino dei virus in acqua di mare. Ig. Moderna 93 (6): 1066-1071.
- 29 YATES, M.V., YATES S.R. 1988. Virus survival and transport in ground water. Wat. Sci. Tech., 20, (11/12): 301-307.
30. BIZIAGOS, E., PASSAGOT, J., CRANCE, JM., DELOINCE, R. 1988. Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus 1 inactivation in mineral water. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2705-2710.

LA RICERCA DI ENTEROVIRUS CON SISTEMI DI FLOCCULAZIONE: VANTAGGI E SVANTAGGI

ANNALaura CARDUCCI

Dipartimento di Biomedicina - Sezione di Igiene ed Epidemiologia -
Università di Pisa.

Introduzione

I metodi di concentrazione dei virus dalle acque sono estremamente vari e basati su principi spesso assai diversi. Inoltre, a seconda del volume e della qualità dell'acqua da concentrare si possono avere una, due o anche più fasi successive, ciascuna delle quali può utilizzare tecniche diverse (1,2,3). I metodi proposti possono basarsi sull'ultrafiltrazione, sull'ultracentrifugazione, sulla separazione bifasica, sull'elettroforesi, sull'elettroosmosi e sull'adsorbimento-eluizione a vari supporti quali filtri carichi, polvere di vetro, polielettroliti, e flocculati di diversa natura. In quest'ultimo caso si parla genericamente di sistemi di flocculazione, che prevedono tre tappe: 1) adsorbimento dei virus al flocculato; 2) raccolta del complesso virus+flocchi; 3) eluizione del virus dai flocchi. Soprattutto le prime due possono presentare difficoltà se il volume del campione è troppo grande, per cui generalmente tali metodi sono utilizzati per piccoli volumi (comunque non superiori a 10 l). Tale limitazione, insieme alla semplicità e discreta efficienza di questi metodi, fanno sì che essi vengano usati come secondo stadio nei processi di concentrazione in due fasi, quando nella prima fase sono usati filtri, poi eluiti con sostanze alcaline.

I metodi di flocculazione si possono genericamente distinguere in organici ed inorganici a seconda della natura chimica delle sostanze flocculanti utilizzate. Sebbene usati già da tempo, tali metodi non sono ancora standardizzati, e ne sono state proposte numerose modifiche, allo scopo di eliminare inconvenienti o aumentare la percentuale di recupero. Alcune delle tecniche più utilizzate, con eventuali variazioni che ne migliorano l'efficienza, sono qui riportate.

Flocculazione inorganica

I metodi di concentrazione dei virus basati sull'adsorbimento a sali inorganici insolubili sono usati ormai da molto tempo. Già nel 1931 Sabin utilizzò flocchi di idrossido d'alluminio per concentrare poliovirus e successivamente fosfato di alluminio o di calcio, solfato di ammonio o di alluminio, cloruro di cobalto o ferrico, ecc., sono stati usati per la concentrazione di herpesvirus, poxvirus, adenovirus, mico e paramixovirus, reovirus, enterovirus, ecc. (1,2,3,4). Negli anni '60 iniziò l'applicazione di tali tecniche allo studio di materiali ambientali, quali liquami, effluenti di impianti di depurazione, acque superficiali, marine o potabili.

Tali metodi sfruttano il fatto che i virus possono essere considerati bio-colloidi con proprietà elettriche che regolano il loro adsorbimento a superfici sia biologiche che non. La loro carica elettrica superficiale deriva dalla ionizzazione di gruppi carbossilici (COO^-) e aminici (NH_3^+) localizzati alla superficie virale ed il loro punto isoelettrico varia secondo i tipi di virus da pH 2,6 a 5 (5): dato che le acque in natura hanno generalmente un pH superiore a tale punto isoelettrico (intorno a 7), i virus in ambiente idrico sono carichi negativamente; si possono così instaurare legami di tipo elettrostatico con particelle solide e superfici di segno opposto quali fiocchi di idrossido di alluminio o di altri sali inorganici.

Fra i fattori che determinano l'efficienza dei metodi di concentrazione basati sull'adsorbimento dei virus a sali inorganici è indubbiamente importante il tipo di sale usato: sono stati descritti esperimenti con fosfato di alluminio, fosfato di calcio, idrossido di alluminio, idrossido di magnesio, cloruro ferrico, ecc. Il confronto dell'efficienza di adsorbimento di alcuni di questi sali su diversi virus ha indicato che il fosfato di alluminio è capace di adsorbire gli herpesvirus, i citomegalovirus, i rhinovirus, gli arbovirus, i mixo- e paramixovirus, ma non appare molto adatto per i virus enterici; il fosfato di calcio adsorbe oltre ai suddetti virus anche gli enterovirus, meno gli adenovirus; l'idrossido di alluminio infine ad-

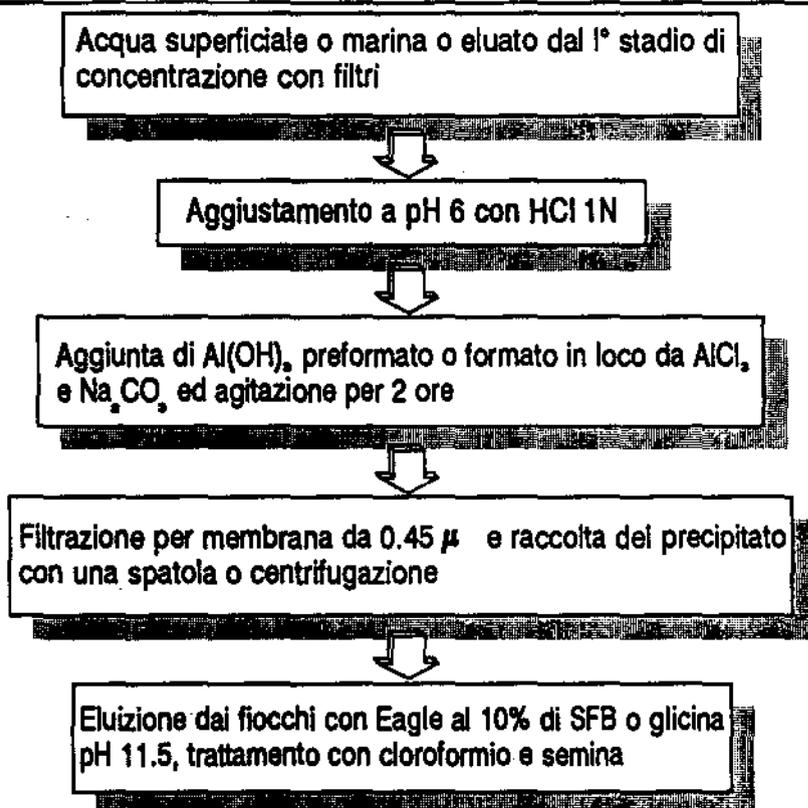


Figura 1. Metodo di adsorbimento all'idrossido di alluminio.

sorbe tutti quelli citati, e sembra il più adatto alla ricerca di virus enterici nelle acque, per quanto mostri scarsa efficienza per i reovirus (4) ed i rotavirus (6). L'uso di questa sostanza è stato proposto anche nella 17a edizione degli Standard Methods dell'American Public Health Association (7) (Figura 1).

Nel campione da saggiare il pH deve essere portato a 6; successivamente i fiocchi di $Al(OH)_3$ possono essere aggiunti o preformati o prodotti direttamente nell'acqua da esaminare aggiungendo un sale di alluminio solubile, come $AlCl_3$ ad una base come carbonato sodico (Na_2CO_3) o idrossido di sodio (NaOH). A tale aggiunta segue una leggera agitazione per 2 ore per facilitare l'adsorbimento dei virus ai fiocchi, che infine vengono raccolti per filtrazione o centrifugazione. Il precipitato raccolto può poi essere inoculato direttamente in colture cellulari oppure i virus possono essere prima eluiti dal precipitato con un tampone alcalino o una soluzione proteica.

Per le acque potabili è stata proposta una variante di questo metodo che consente l'esame di grandi volumi, in cui il precipitato è formato direttamente nel campione e raccolto con un filtro a cartuccia, poi eluito con sostanze alcaline (8).

Un aumento dell'adsorbimento virale può essere ottenuto formando il precipitato direttamente nel campione (9), oppure usando grandi quantità di $Al(OH)_3$. In quest'ultimo caso, tuttavia, cresce anche la difficoltà di eluire i virus adsorbiti, per cui è consigliabile usare concentrazioni intermedie (9 mM/l) (7).

La flocculazione inorganica può essere usata come primo stadio di concentrazione su acque superficiali o marine: in questo caso la forte presenza di solidi sospesi in tali materiali impone una prefiltrazione che riduce l'efficienza del metodo, data la difficoltà di eluire completamente i virus adsorbiti al prefiltro (10). Talora invece la tecnica è usata come secondo stadio dopo una prima fase di concentrazione per filtrazione. Quando l'eluizione dai filtri è fatta

Tabella 1. Efficienza dei metodi di adsorbimento ad $Al(OH)_3$. I recuperi sono calcolati per la sola flocculazione, senza considerare l'eventuale prefiltrazione.

Eluente	Tipo di acqua	Volume	Virus	% Rec.	Rif.
glicina pH 11,5	di estuario	II stadio	polio 1	80	9
"	potabile	II stadio	polio 1	92	11
Siero Fetale Bov.	potabile	II stadio	polio 1	49	11
Eagle al 10% SFB	superficiale	4 l	Cox. B3	98	12
"	marina	10 l	polio 3	90	*
"	effl. II dep.	0,2-4 l	polio 1	81	13
"	effl. III dep.	4 l	polio 1	100	13
Na_2HPO_4 pH 7,2	potabile	II stadio	SA-11	40	14
glic.+SFB pH 11,5	potabile	II stadio	polio 1	0-67	15
	di estuario	II stadio	polio 1	71	9

* : Esperienze personali.

con glicina a pH 10.5-11.5, seguita da neutralizzazione, si usa la flocculazione inorganica formando il flocculato direttamente nel campione per aggiunta di AlCl_3 e Na_2CO_3 (2,16). Il materiale eluito dai fiocchi può essere ulteriormente ridotto mediante idroestrazione.

La fase di flocculazione ed adsorbimento al flocculato è altamente efficiente: nella Tabella 1 sono riportati i risultati di prove di recupero su vari tipi di acque che mostrano come l'efficienza sia in genere abbastanza alta per gli enterovirus, meno per i rotavirus.

Nella nostra esperienza abbiamo potuto osservare come il virus venga quasi per intero trattenuto dal flocculato e non si ritrovi più nel liquido privo dei fiocchi. Tuttavia l'efficienza totale del recupero virale viene abbassata dal fatto che l'eluizione dei virus dal precipitato può essere incompleta. Perciò sono stati proposti diversi eluenti, fra i quali appaiono più efficaci la glicina 1M a pH 11,5, ed il terreno di Eagle al 10% di siero fetale bovino (SFB).

Se la flocculazione inorganica è utilizzata come secondo stadio di concentrazione, l' $\text{Al}(\text{OH})_3$ può essere sostituito con $\text{Mg}(\text{OH})_2$ per ricentrare l'eluato alcalino della prima fase (17): in tale eluato i virus hanno carica negativa e si adsorbono all' $\text{Mg}(\text{OH})_2$ che a pH 9 forma fiocchi ed è caricato positivamente. Dopo raccolta del flocculato per centrifugazione si abbassa il pH alla neutralità ed i fiocchi si dissolvono. I virus non sono quindi trattenuti come nel caso dell' $\text{Al}(\text{OH})_3$ ed il recupero raggiunge il 90%. Tale metodo è stato però sperimentato solo su polio 1.

Confronti con altri metodi hanno indicato che la flocculazione inorganica con idrossido di alluminio è meno efficiente della filtrazione su membrana come primo stadio di concentrazione e della flocculazione organica come secondo stadio (2,15).

I maggiori vantaggi dei metodi che si basano sull'adsorbimento a sali inorganici possono essere così elencati:

- 1) Il fatto che non richiedano valori di pH molto bassi e quindi lesivi per molti virus. Tuttavia, per rendere massima l'eluizione dei virus dai fiocchi, spesso si ricorre a pH fortemente alcalini, con conseguente rischio di inattivazione per alcuni virus (18).
- 2) La notevole sensibilità che li rende capaci di rilevare anche quantità molto piccole di virus, ad es. da 7.5 a 21 PFU/l (13, esperienze personali).
- 3) La semplicità delle procedure e la durata relativamente breve, quando si usino volumi di pochi litri.
- 4) Il basso costo delle apparecchiature e del materiale necessario che li rendono attuabili in comuni laboratori.

I più importanti limiti di questi metodi sono i seguenti:

- 1) Il fatto che le sostanze organiche in soluzione possano ostacolare l'adsorbimento virale, cosicché tali metodi hanno un'efficienza più alta per l'acqua potabile che per acque superficiali o marine (9,11), soprattutto se usati come secondo stadio di concentrazione.
- 2) Il fatto che l' $\text{Al}(\text{OH})_3$ o altri sali inorganici sono adsorbenti relativamente aspecifici, per cui assieme ai virus possono concentrare sostanze talora tossiche per le colture cellulari.
- 3) La necessità di limitare il volume del campione a pochi litri (al massimo 10).

Flocculazione organica

Nel caso della flocculazione organica, proposta nel 1976 (23) e frequentemente usata come seconda fase di concentrazione, si sfrutta la capacità di soluzioni proteiche di flocculare a pH inferiore al loro punto isoelettrico formando fiocchi che intrappolano o adsorbono i virus. Quando l'eluato dei filtri usati nel primo stadio di concentrazione è una soluzione proteica come estratto di carne (Beef Extract: BE), questa viene portata ad una concentrazione del 3%, dopo di che, abbassando il pH a 3.5, si ha la flocculazione. A questo punto si lascia in agitazione per 30 minuti per favorire l'adsorbimento, poi il flocculato viene raccolto per centrifugazione, ed infine sciolto in una soluzione tampone Na_2HPO_4 a pH 9 (Figura 2).

Il recupero riportato va dal 60 al 91% (media 74,4%). Alcuni studi (20,21,22,23,24,25) hanno indicato che la preparazione del BE può influenzare la sua capacità di flocculare, e di adsorbire i virus, riportando percentuali di recupero da 2 a 125%, con variazioni in relazione a diversi virus considerati, alla natura del BE (in pasta o in polvere), alla ditta produttrice ed anche al numero di lotto (Tabella 2). In genere sembra migliore il BE in polvere e taluni consigliano il BBL-V (3).

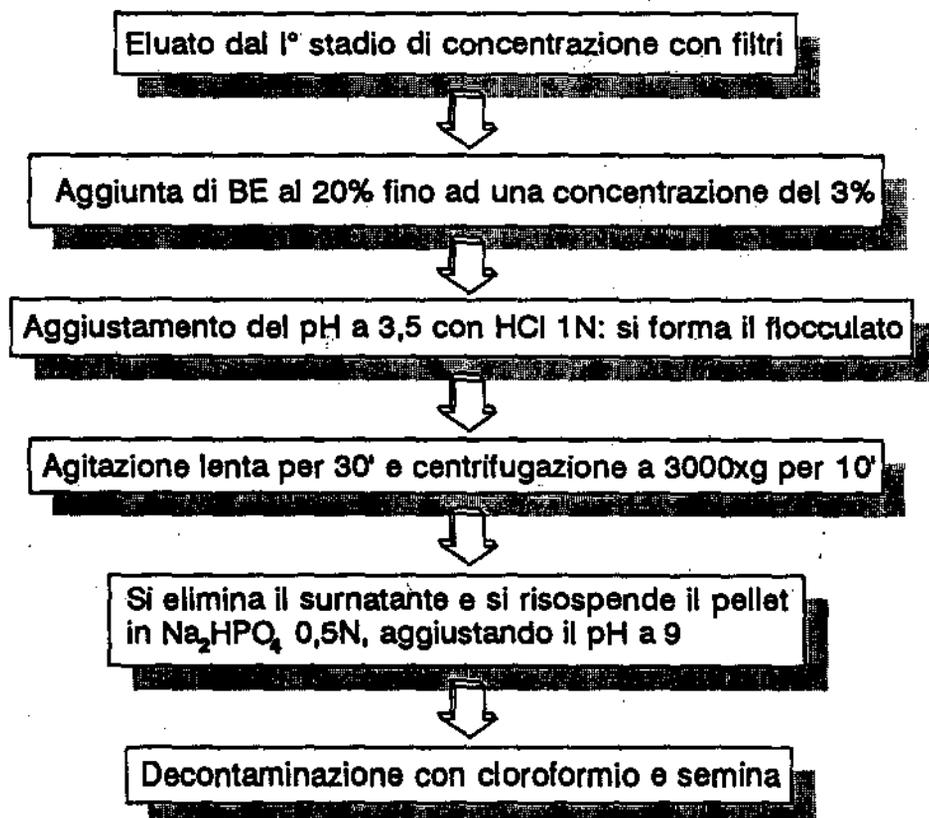


Figura 2. Metodo della flocculazione organica.

Per evitare la scarsa riproducibilità dei risultati dovuta alla variabilità nell'efficienza del BE, è stato suggerito di aggiungere cloruro ferrico (23) o silicati (Celite=silice di diatomee, silicato di magnesio o di calcio) o polielettroliti (PEG, Cat-Floc) o solfato d'alluminio (20) (Tabella 3).

Tabella 2. Percentuale di recupero della flocculazione organica in base al tipo di BE usato ed al virus considerato (modif. da (22)).

Tipo di BE	Prodotto	polio 1	echo 7	Coxsackie A9
pasta	Sampco	54	19	41
	Difco, lotto 674300	6	3	16
polvere	Difco, lotto 791628	6	2	7
	Perny, vecchio proc.	68	16	49
	Perny, nuove proc.	45	4	125
	Gibco, lotto 91190	61	32	48
	Gibco, lotto 98685	60	15	52
	Gibco, lotto 99862	47	6	43
	Oxoid, lotto 4911291	55	11	59
Oxoid, lotto 2815451	49	12	58	

Tabella 3. Efficienza di recupero della flocculazione organica in relazione la flocculante aggiunto ed al virus considerato. (da (20) modif. con (23))

Virus	Materiale	% Recupero (*)
Polio 1	silicato di diatomee	85- 96
	silicato di magnesio	78- 94
	silicato di calcio	37- 73
	Cat Floc	11- 59
	solfato di alluminio	92-117
	cloruro ferrico	56-100
Echo 7	silicato di diatomee	60-104
	silicato di magnesio	35- 82
	silicato di calcio	5- 24
	Cat Floc	32- 50
	solfato di alluminio	72- 84
Coxsackie A9	silicato di diatomee	59-100
	silicato di magnesio	59-113
	silicato di calcio	38- 96
	Cat Floc	6- 33
	solfato di alluminio	13- 96

(*) : l'ampio range è causato da BE di diversa provenienza.

Nella Tabella 4 sono riportate le percentuali di recupero ottenute da vari Autori con il metodo della flocculazione organica.

Tabella 4. Efficienza di recupero del metodo della flocculazione organica usata come secondo stadio di concentrazione.

Metodo	Tipo di acqua	Virus	% Rec.	Rif. Bibl.
B.E. pH 3,5	potabile	polio 1	74.4	19
		polio 1	42	26
		polio 1	96-99	24
		polio 1	110	27
		Coxsackie A9	123	27
		Coxsackie B1	124	27
		echo 7	112	27
		SA-11	47-69	28
		fagi	18	26
		marina	SA-11	15
	effluente	polio 1	52	25
	imp. depur.	echo 5	31	25
		fagi	12	25
B.E.+ (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7	effluente	polio 1	70	25
	imp. depur.	echo 5	84	25
		fagi	85	25
	soluz. B.E.	polio 1	88	30
		Coxsackie B4	87	30
		SA-11	97	30
B.E.+ (NH ₄) ₂ SO ₄ + Tween80	soluz. B.E.	polio 1	100	31
		Coxsackie B4	20	31
		SA-11	80	31
		fagi	100	2
B.E.+ glicina pH 3.5	potabile	HAV	58	32

Un importante problema deriva dalla necessità di abbassare il pH a 3.5, che se non ha importanti effetti sugli enterovirus, può invece essere deleterio per altri virus, quali i rotavirus (28) ed i batteriofagi che, per la loro utilità quali indicatori di contaminazione virale, potrebbe essere interessante ricercare. Per evitare drastici cambiamenti di pH sono stati quindi proposti metodi di precipitazione del BE mediante sali (3,25,30).

La capacità di certe soluzioni saline, come il fosfato di sodio, il citrato di sodio, il solfato d'ammonio, il solfato di sodio ed il solfato di magnesio di precipitare le proteine è ben documentata: fra

questi sali il solfato d' ammonio sembra il più efficiente per la precipitazione del BE, che avviene a pH neutro. Sembra che con questo metodo si ottengano recuperi maggiori che con la flocculazione organica dovuta all'abbassamento del pH (30). Alcuni Autori hanno tentato di migliorare ulteriormente l'efficienza del metodo aggiungendo tensioattivi come il Tween 80 al BE e al solfato d'ammonio (31). Sebbene l'efficienza di recupero sia buona, il materiale che si ottiene è tossico per le cellule a causa dell'alta concentrazione di tensioattivo che può tuttavia essere precipitato con altri sali (solfato di magnesio o tiosolfato di sodio) ed allontanato per centrifugazione. Inoltre si ottiene un precipitato abbondante per cui se si lavora con volumi superiori a 500 ml si deve usare una terza fase dopo che il precipitato è stato risospeso.

Oltre al BE si può utilizzare la flocculazione della caseina isoelettrica (o latte scremato in polvere) che viene aggiunta al campione, poi portato a pH 4,3 (33).

I vantaggi della flocculazione organica si possono così elencare:

- 1) E' un metodo facile da eseguire, economico e rapido, piuttosto efficiente.
- 2) Quando la precipitazione è effettuata mediante sali evita pH troppo bassi.
- 3) Il rendimento non sembra influenzato dalla presenza di acidi umici o fulvici nell'acqua (34), né in genere dalla qualità dell'acqua, salvo dare un minor recupero nell'acqua di mare (27).

I limiti principali di questo metodo sono:

- 1) La necessità di esaminare solo volumi inferiori ad un litro.
- 2) La variabilità nell'efficienza e seconda delle provenienze del BE.
- 3) La diversa efficienza riportata da alcuni Autori, anche se non da tutti, per i diversi enterovirus (27).

Conclusioni

In conclusione, i metodi di concentrazione basati sulla flocculazione, sia organica che non, hanno in comune la semplicità, l'economicità e la rapidità. La loro efficienza è invece variabile in dipendenza delle sostanze usate, dei virus considerati e del tipo di acqua. Sono comunque metodi adatti a piccoli volumi, per cui possono essere presi in considerazione come secondo stadio di concentrazione. Viste le possibili variazioni che si possono apportare, prima di utilizzare uno di tali metodi su campioni ambientali sarebbe consigliabile eseguire prove di recupero preliminari per mettere a punto la tecnica più efficiente ed adatta alle condizioni in esame.

Bibliografia

- 1) BITTON, G. 1980. Virus Detection in Water and Wastewater. In "Introduction to Environmental Virology". Cap. 5: 91-120. Bitton G. editor. John Wiley & Sons New York.

- 2) FARRAH, S.R., BITTON, G., 1982. Methods (other than Microporous Filters) for Concentration of Viruses from Water. In "Methods in environmental virology". Cap. 5: 117-149. Gerba C.P., Goyal S.M. editors. Marcel Dekker New York.
- 3) LUCENA, F., DIVIZIA, M., BIZIAGOS, E., CRANCE, J.M., DELOINCE, R., 1991. Extraction et concentration des virus des milieux hydriques. In " Virologie des milieux hydriques". Cap. 3: 71-106. Schwartzbrod L. editor. Lavoisier Paris.
- 4) WALLIS, C., MELNICK, J.L. 1967. Concentration of viruses on Aluminum and Calcium salts. Am. J. Epidemiol. 85: 459-468.
- 5) GERBA, C.P. 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. Adv. Appl. Microbiol. 30: 133-168.
- 6) FARRAH, S.R., GOYAL, S.M., GERBA, C.P., CONKLIN, R.H., SMITH, E.M. 1978. Comparison between adsorption of poliovirus and rotavirus by aluminum hydroxide and activated sludge flocs. Appl. Environ. Microbiol. 35: 360-363.
- 7) AUTORI VARI. 1989. Detection of enteric viruses. In Standard methods for the examination of water and wastewater, pp: 9/155-9/182. American Public Health Association. Washington D.C. 20036
- 8) FARRAH, S.R., GOYAL, S.M., GERBA, C.P., WALLIS, C., MELNICK, J.L. 1978. Concentration of poliovirus from tap water onto membrane filters with aluminum chloride at ambient pH levels. Appl. Environ. Microbiol. 35: 624-626.
- 9) FARRAH, S.R., GOYAL, S.M., GERBA, C.P., WALLIS, C., MELNICK, J.L. 1977. Concentration of enteroviruses from estuarine waters. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1192-1196.
- 10) SOBSEY, M.D., GERBA, C.P., WALLIS, C., MELNICK, J.L. 1977. Concentration of enteroviruses from large volumes of turbid estuary water. Can. J. Microbiol. 23: 770-778.
- 11) FARRAH, S.R., GERBA, C.P., WALLIS, C., MELNICK, J.L. 1976. Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters. Appl. Environ. Microbiol. 31: 221-226.
- 12) CARDUCCI, A., RUSCHI, A., VANNUCCHI, R., PAMPANA, C. 1987. Isolamenti virali effettuati nell'arco di un anno in acque superficiali e nell'effluente di un impianto di depurazione. Ig. Mod. 87: 34-42.
- 13) MOORE, M.L., LUDOVICI, P.P., JETER, W.S. 1970. Quantitative method for the concentration of viruses in wastewater. J. Water Poll. Contr. Fed. 42 (2): R21-R28.
- 14) TORANZOS, G.A., GERBA, C.P. 1989. An improved method for the con-

centration of rotavirus from large volumes of water. J. Virol. Meth. 24: 131-140.

15) MELNICK, J.L. SAFFERMAN, R., RAO, V.C., GOYAL, S., BERG, G., DAHLING, D.R., WRIGHT, B.A., e Coll. 1984. Round Robin investigation of methods for the recovery of poliovirus from drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 47: 144-150.

16) GERBA, C.P., FARRAH, S.R., GOYAL, S.M., WALLIS, C., MELNICK, J.L. 1978. Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage and seawater. Appl. Environ. Microbiol. 35: 540-548.

17) VILAGINES, P., SARRETTE, B., VILAGINES, R. 1982. Preformed magnesium hydroxide precipitate for second-step concentration of enteroviruses from drinking and surface waters. Can. J. Microbiol. 28: 783-787.

18) FIELDS, H.A. METCALF, T.G. 1975. Concentration of Adenovirus from seawater. Water Res. 9: 357-364.

19) KATZENELSON, E., FATTAL, B., HOSTOVESKY, T. 1976. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. Appl. Environ. Microbiol. 32: 638-639.

20) DAHLING, D.R., WRIGHT, B.A. 1986. Recovery of viruses from water by a modified flocculation procedure for second-step concentration. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1326-1334.

21) DAHLING, D.R., WRIGHT, B.A. 1988. A comparison of recovery of virus from wastewater by beef extract-Celite, ferric chloride, and filter concentration procedures. J. Virol. Meth. 22: 337-346.

22) HURST, C.J., DAHLING, G.R., SAFFERMAN, R.S., GOYKE, T. 1984. Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples. Can. J. Microbiol. 30: 1253-1263.

23) PAYMENT, P., FORTIN, S., TRUDEL, M. 1984. Ferric chloride flocculation for nonflocculating beef extract preparations. Appl. Env. Microbiol. 47: 591-592.

24) SANSEBASTIANO, G., CESARI, C., REBIZZI, V., GUALERZI, L., BELLELLI, E. 1990. Concentration of viruses from water using different types of filters. Iq. Mod. 93: 785-795.

25) SHIELDS, P.A., FARRAH, S.R. 1986. Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. Appl. Environ. Microbiol. 51: 211-213.

26) JOTHIKUMAR, N., DWARKADAS, A., KHANNA, P. 1990. A simple elution

and reconcentration technique for viruses concentrated on membrane filters from drinking water samples. Wat. Res. 24: 367-372.

27) GUTTMAN-BASS, N., NASSER, A. 1984. Simultaneous concentration of four enteroviruses from tap, waste and natural waters. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1311-1315.

28) GUTTMAN-BASS, N., ARMON, R. 1983. Concentration of simian rotavirus SA-11 from tap water by membrane filtration and organic flocculation. Appl. Environ. Microbiol. 45: 850-855.

29) RAO, V.C., METCALF, T.G., MELNICK, J.L. 1986. Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotaviruses from estuarine waters. Appl. Environ. Microbiol. 52: 484-488.

30) PAYMENT, P., TRUDEL, M. 1987. Second-step reconcentration of environmental samples by ammonium sulfate flocculation of beef extract. Can. J. Microbiol. 33: 571-572.

31) ARMON, R., ARELLA, M., PAYMENT, P. 1988. A high efficient second-step concentration technique for bacteriophages and enteric viruses using ammonium sulphate and tween 80. Can. J. Microbiol. 34: 651-655.

32) SOBSEY, M.D., OGLESBEE, S.E., WAIT, D.A. 1985. Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1457-1463.

33) BLOCK, J.C., SCHWARTZBROD, L. 1982. Méthodes de concentration. In "Analyse virologique des eaux". Cap. 3: 37-53. Block J.C., Schwartzbrod L. editors. Lavoisier Parigi.

34) GUTTMAN-BASS, N., CATALANO-SHERMAN, J. 1985. Effects of humic materials on virus recovery from water. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1260-1264.

METODI DI CONCENTRAZIONE UTILIZZABILI PER IL RILEVAMENTO DI VIRUS IN ACQUE SUPERFICIALI E PROFONDE

G. SANSEBASTIANO, V. REBIZZI e E. BELLELLI

Istituto di Igiene dell'Università degli Studi di Parma.

Premessa

La ricerca di virus citopatogeni nelle acque viene condotta per diversi motivi che possono così essere schematizzati:

1) La presenza di virus nelle acque superficiali è un buon indicatore epidemiologico della circolazione di tali microrganismi nella popolazione. Va inoltre sottolineato che la ricerca di virus nelle acque superficiali è importante anche per una valutazione del rischio infettivo legato al contatto diretto o indiretto con tali acque.

2) L'assenza di particelle virali in consistenti volumi di acqua profonda offre, in aggiunta ai risultati delle prove batteriologiche, un'ulteriore garanzia della purezza microbiologica dell'acqua stessa (2).

3) La resistenza che i virus, in particolare gli Enterovirus, presentano nei confronti degli agenti usati nella disinfezione delle acque è notevolmente maggiore di quella presentata dai classici indicatori batterici di contaminazione fecale (1, 6, 7). Se vengono sottoposte a trattamenti di potabilizzazione acque superficiali o profonde contaminate, l'assenza di Enterovirus nel prodotto finito è l'unica garanzia diretta che i trattamenti sono adeguati.

Il maggior problema da risolvere è quello della efficienza di recupero dei virus eventualmente presenti da rilevanti volumi di acqua (circa 100 litri per campione).

Tra i diversi sistemi a disposizione abbiamo scelto per le nostre prove in laboratorio e per l'applicazione sul campo il metodo della filtrazione con l'impiego di filtri (a cartuccia e a membrana) con cariche superficiali negative (elettronegative) o positive (elettropositive).

Riportiamo qui di seguito indicazioni concernenti i tipi di filtri utilizzabili, le metodiche di filtrazione-eluzione e le modalità di semina del concentrato in colture cellulari.

Si riporta poi una appendice tecnica relativa allo strumentario e ai reagenti necessari per le prove sul campo, la disinfezione del materiale e le operazioni da effettuare direttamente sul campo.

Materiali e metodi

Tipi di filtri utilizzabili

- Filtri elettronegativi:**
- a membrana di nitrato di cellulosa, Sartorius SM113064, diametro 293 mm, porosità 0,45 micron;
 - a cartuccia di tipo Balston 100-25 CQ, in resina epossidica e fibra di vetro, altezza 178 mm, porosità 8 micron;
- Filtri elettropositivi:**
- a cartuccia tipo Virosorb 1MDS della CUNO in fibra di vetro trattata con resine (5), altezza 348 mm;
 - a cartuccia tipo Vippy composti da fibra di vetro trattata con un polimero policationico (4), altezza 120 mm.

Tutti i filtri descritti sono disponibili in commercio ad eccezione dell'ultimo che attualmente viene da noi preparato in collaborazione con l'Istituto di Chimica Organica dell'Università di Parma.

Sistemi di pretrattamento delle acque

Prima della filtrazione con filtri elettronegativi, il campione d'acqua deve essere acidificato con HCl 1M fino a pH 3,5 ed addizionato di AlCl₃ fino ad ottenere una concentrazione finale di 0,0005M.

I campioni d'acqua da filtrare sui filtri elettropositivi non necessitano di alcun trattamento a meno che il pH non sia superiore a 8. In tal caso si corregge fino alla neutralizzazione con HCl 1N.

La fase di filtrazione

La velocità di filtrazione viene regolata in modo da ottenere un flusso regolare di 5 litri/minuto. Per le prove su acque superficiali di regola si rende necessario l'uso di un prefiltro a cartuccia di cotone o di polipropilene (porosità nominale 10-15 micron).

La fase di eluizione

Per l'eluizione delle particelle virali adsorbite ai filtri viene utilizzata una soluzione sterile di Beef-Extract (DIFCO) al 3%, portata a pH 9,5 con NaOH 1M.

Per i filtri Balston e Vippy sono usati 500 ml di soluzione eluente e 1000 ml, invece, per i Sartorius e i Virosorb 1MDS.

L'eluente viene fatto ricircolare attraverso il filtro per venti minuti; dopo tale tempo si procede alla neutralizzazione con HCl 1N. Nei casi in cui è stato usato un prefiltro, l'eluente (circa 1500 ml) viene fatto passare in continuo nel sistema prefiltro-filtro sempre per 20 minuti. L'eluato finale viene poi decontaminato per filtrazione su filtri Sartorius a membrana di acetato di cellulosa, porosità 0,45 micron, e ripreso in bottiglie di vetro sterili.

La fase di riconcentrazione

L'eluato ottenuto viene portato a pH 3,5 con HCl 1N e mantenuto in agitazione per 30 minuti fino alla formazione di un evidente flocculato. Dopo centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti il sedimento viene ripreso con tampone fosfato a pH 9 (Na_2HPO_4 0,15 M) e pipettato fino a completa solubilizzazione.

Il volume finale ottenuto è di 10 ml.

Semina in colture cellulari

L'eluato riconcentrato ottenuto dalle prove sperimentali e dalle prove sul campo viene seminato in colture cellulari di rene di scimmia in linea continua (stipite RC37) e di Hep-2 (0,1 ml per tubo di coltura; 1 ml in bottiglie di coltura di 75 cm²).

Il titolo virale viene espresso nelle diverse prove in TCID₅₀ ed in MPN/l.

Risultati

Si riportano brevemente i risultati ottenuti nelle prove condotte in laboratorio (tabelle n.1, 2, 3 e 4) ed anche quelli ottenuti su campioni di acque superficiali (tabella n.5). Vengono altresì presentate le principali caratteristiche fisico-chimiche delle acque saggiate (3,5).

Discussione

I risultati ottenuti dalle prove sperimentali sembrano indicare per tutti i sistemi filtranti provati una buona capacità di recupero, con una modesta perdita nel filtrato; tale perdita è risultata più alta con i filtri a cartuccia tipo Balston. Per quanto riguarda la facilità di impiego dei filtri provati, sembrano non porre problemi particolari

Tab. 1 - Percentuali di poliovirus 1 nell'eluato e nel filtrato in prove condotte su filtri di nitrato di cellulosa

Prove	% di virus tal quale	nell'eluato concentrato	% di virus nel filtrato
1	98,10	98,10	5,06
2	97,47	95,57	0
3	95,57	93,67	0
4	95,73	93,16	0
5	89,24	89,24	0,35
Media	95,21	93,93	1,082
CV%	4,00	3,51	205

Tab. 2 - Percentuali di poliovirus 1 nell'eluato e nel filtrato in prove condotte su filtri Balston

Prove	% di virus tal quale	nell'eluato concentrato	% di virus nel filtrato
1	79,30	70,85	5,52
2	97,50	89,50	6,17
3	89,40	88,40	5,26
4	93,75	93,75	6,87
5	87,10	87,10	8,8
Media	89,41	85,92	6,52
C.V.%	7,74	0,22	21,70

Tab. 3 - Percentuali di poliovirus 1 nell'eluato e nel filtrato in prove condotte su filtri Virosorb

Prove	% di virus tal quale	nell'eluato concentrato	% di virus nel filtrato
1	88,40	80	1,25
2	81,72	79	0,55
3	79,00	72	1,6
4	88,00	88	1,6
5	97,00	95	1,01
Media	86,82	82,8	1,202
C.V.%	8,03	10,70	36,60

Tab. 4 - Percentuali di poliovirus 1 nell'eluato e nel filtrato in prove condotte su filtri Vippy

Prove	% di virus tal. quale	nell'eluato concentrato	% di virus nel filtrato
1	92,96	90,45	0
2	100	100	0
3	95,47	90,45	6,03
4	94,11	92,94	1,29
5	95,56	95,56	0,69
Media	95,62	91,88	1,602
C.V.%	2,79	6,95	158,12

Tab. 5 - Isolamento virus da acque superficiali

Periodo	MPN/l	Virus
apr '87	0	n.i.
mag	0,88	Polio 1
lug	0,34	Cox B5
set	0	n.i.
dic	0,34	Polio 3
gen '88	0	n.i.
mar	8,32	Polio 1
mag	1,75	Polio 1
lug	0,08	Polio 1
set	0	n.i.
nov	0,53	Polio 1 Cox B3
feb '89	4,96	Polio 1,2
mar	6,35	Polio 1,2
apr	0,26	Polio 2
mag	0	n.i.
giu	0	n.i.
ott	0	n.i.
nov	0	n.i.
gen '90	0	n.i.
feb	0	n.i.

n.i.=nessun isolamento

Tab. 6 - Caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua di rete

Parametri	Valori
pH	7,2
Temp °C	14,4
Conduc. uS/cm	640
COD mg/l	0
Nitriti mg/l	0
Nitrati mg/l	3,69
Ammon. mg/l	0
Cloruri mg/l	19
Fosfati mg/l	0
Cloro res. mg/l	0,25

Tab. 7 - Parametri fisico-chimici dell'acqua superficiale

Parametri	Media	C.V.	Minimo	Massimo
pH	7,56	4,43%	7	8,1
Conduc. uS/cm	566,6	21,82%	360	800
BOD mg/l	7,55	39,15%	3,4	14
Ammon. mg/l	4,09	62,64%	0,58	8,8
Nitriti mg/l	0,22	96,18%	0,057	0,9
Nitrati mg/l	3,47	96,40%	0,2	12,2
Cloruri mg/l	23,91	43,55%	11,75	51,5
Fosf. tot. mg/l	0,46	77,75%	0,03	1,7
COD mg/l	20,74	41,37%	10	49,92

per le prove sul campo i filtri tipo Virosorb e i filtri tipo Vippy.

Nelle prove da noi condotte su acque superficiali (sul campo) sono stati utilizzati i filtri Vippy. I risultati ottenuti evidenziano una buona capacità complessiva di recupero anche per acque particolarmente torbide e caratterizzate da un carico organico relativamente elevato. Tale dato sembra indicare che il sistema da noi utilizzato non è particolarmente influenzato dalla qualità fisico-chimica delle acque.

Appendice tecnica

Strumentazione e reagenti occorrenti per le prove sul campo

- pH-metro
- pompa aspirante premente 12V da utilizzare con batteria
- filtri e prefiltri pronti nei loro alloggiamenti con tubi

- di raccordo in plastica o gomma
- vasca di raccolta dell'acqua, circa 120 litri, in polietilene
- HCl 1N
- Tiosolfato sodico
- Beef Extract al 3% (DIFCO) a pH 7 sterile
- Acqua bidistillata sterile

La disinfezione del materiale

I filtri e gli eventuali prefiltri collocati nei loro alloggiamenti con i relativi tubi di raccordo vengono sottoposti a trattamenti termici (a vapore fluente per 30 minuti).

La pompa viene trattata con soluzione di ipoclorito di sodio ad una concentrazione di cloro attivo libero da 1 a 10 mg/l, successivamente risciacquata con acqua bistidillata sterile.

Anche la vasca di raccolta da 120 litri da utilizzare sul campo viene trattata con cloro e risciacquata con acqua bidistillata sterile.

Operazioni sul campo

- direttamente sul campo si procede al riempimento della vasca di raccolta con 100 litri di acqua campione previo lavaggio della pompa.
- si misura il pH dell'acqua e se necessario si aggiungono 50 ml di HCl 1N per portare il pH tra 7 e 7,5 -
- si mescola con bacchetta di teflon sterile e si inizia la filtrazione. A valle del filtro è posto un flussimetro per la misura dell'acqua filtrata.
- finita la filtrazione i filtri vengono staccati dai raccordi, svuotati dell'acqua e riempiti con Beef Extract al 3% a pH 7.
- filtri ed eventuali prefiltri vengono posti in cassette refrigerate.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ENGELBRECHT, R., WEBER, M., SALTER, B., SCHMIDT, C. 1980. Comparative inactivation of viruses by chlorine. - Appl. Environ. Microbiol., 40: 249-256.
- 2) MELNICK, J. L. 1984. Viruses in the water environment: a Review. "Etiologic agents and their potential for causing waterborne virus

- diseases." - Monogr. virol., 15: 1-16.
- 3) REBIZZI, V., GUALERZI, L., SANSEBASTIANO, G. 1990. Indicatori di carico organico e contaminazione da virus nelle acque del torrente Parma. - Tecnica Sanitaria, 28: 155-185.
 - 4) SANSEBASTIANO, G., BELLELLI, E., CESARI GIOVANARDI, C., ZILIOLI, F., GARDINI, G.P. e BOCCHI, V. 1988. Un nuovo tipo di filtro per la concentrazione dei virus nelle acque. - Ann. Ist. Super. Sanità, 24: 607-612.
 - 5) SANSEBASTIANO, G., CESARI, C., REBIZZI, V., GUALERZI, L., BELLELLI, E. 1990. Concentration of viruses from water using different types of filters. - L'Igiene Moderna, 93:785-795.
 - 6) SCARPINO, P.V., LUCAS, M., DANIEL, R.D., BERG, G., CHANG, S.L. 1975. Effectiveness of hypochlorous acid and hypochlorite ion in destruction of viruses and bacteria. - In "Chemistry of water supply, treatment and distribution". - Ed. Rubrier A.J. Ann. Arbor Science, 15.
 - 7) THRAENHART, O., KUWERT, E. 1975. Comparative studies on the action of chlorine and ozone on Polioviruses in the reprocessing of drinking water in Essen. - Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B, 160: 305-322.)

METODI DI RILEVAMENTO DI VIRUS NELL'ACQUA DI RUBINETTO**M. ROMANO**

Istituto di Igiene, Università degli Studi di Padova.

Introduzione

La trasmissione di infezioni virali con l'acqua è una realtà indiscutibile, mentre non è ancora chiara la responsabilità dell'acqua potabile nell'insorgenza di epidemie di malattie virali e di conseguenza non si conosce il rischio derivante, per la Sanità Pubblica, dalla presenza di virus nell'acqua di rubinetto (1,2).

Vari fattori contribuiscono a mantenere un atteggiamento critico, da parte di alcuni Autori, sull'utilità della ricerca di virus nell'acqua potabile. La non completa conoscenza della dose risposta per le singole specie virali, la sintomatologia non particolarmente drammatica in molti casi, l'interposizione della trasmissione uomo-uomo, rendono difficile evidenziare una relazione fra infezioni, malattie virali in una popolazione ed eventuale presenza di virus nell'acqua potabile; le basse concentrazioni, le difficoltà di isolamento e di identificazione dei virus, la molteplicità delle specie virali con caratteristiche diverse rendono d'altra parte complicata e laboriosa la ricerca dei virus.

Dall'acqua potabile sono stati isolati Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus, senza una concomitante presenza evidente nella popolazione di malattie ad essi riferibili, mentre epidemiologicamente più dimostrata è la trasmissione idrica per l'epatite A e per le gastroenteriti da virus di Norwalk e da Rotavirus, per i quali è stata descritta una associazione fra contaminazione dei sistemi di distribuzione idrica e episodi epidemici di epatite A e gastroenteriti (3,4,5,6,7,8,9,10,11).

I virus potenzialmente presenti nell'acqua potabile sono gli stessi che possono essere presenti nelle acque superficiali o profonde, che servono da fonte di approvv-

gionamento idrico; essi appartengono a generi e famiglie diverse; come si può vedere nella tabella 1, per alcuni è possibile l'isolamento in colture cellulari, per altri è necessario ricorrere direttamente ad altre tecniche quali la microscopia elettronica, metodi immunoenzimatici, ibridizzazione molecolare.

Tabella 1: Virus potenzialmente presenti nell'acqua di rubinetto

V I R U S	DIMENSIONI ϕ	ISOLAMENTO IN COLTURE CELLULARI
ENTEROVIRUS Poliovirus Coxsackievirus A* Coxsackievirus B Echovirus	20-30 nm	+
VIRUS DELL'EPATITE A	27-32 nm	±
REOVIRUS	70-90 nm	+
ROTA VIRUS	65-75 nm	±
CALICIVIRUS Virus dell'Epatite E Norwalk virus Calicivirus Snow Mountain virus	35-40 nm	-
ASTROVIRUS	27-30 nm	-
CORONAVIRUS	75-160 nm	-
ADENOVIRUS	70-90 nm	-

* alcuni tipi non si replicano in colture cellulari

I virus nelle acque si trovano in concentrazioni tali, da non essere facilmente svelabili con una inoculazione diretta in colture cellulari o direttamente con altre tecniche, con cui si opera con quantità di materiale minime (dell'ordine di μ l), per cui è necessario che il volume iniziale dei campioni, di dimensioni notevoli (10 litri per acque superficiali, 100-1000 litri per l'acqua potabile), venga ridotto ad alcuni ml, con la minima perdita di unità virali.

Attualmente sono disponibili numerosi metodi di con-

centrazione dei virus nell'acqua, alcuni dei quali con una buona efficienza, ma non è stato ancora individuato un metodo semplice, rapido e ripetitivamente efficiente al 100%, che possa essere indicato come standard. (12,13)

1. Rilevamento di virus nell'acqua potabile

La sequenza metodologica per la ricerca di virus nell'acqua potabile è la stessa di quella applicata agli altri tipi di acqua (acque superficiali, profonde o acque reflue) con variazioni a livello di alcune tappe, conseguenti alle caratteristiche dell'acqua: basse concentrazioni di virus eventualmente presenti, solitamente basse concentrazioni di sostanze organiche e presenza di disinfettanti.

Le tappe da seguire sono:

1.1. Campionamento

1.2. Raccolta, neutralizzazione immediata di eventuali disinfettanti presenti nell'acqua e trasporto del campione

1.3. Concentrazione con un metodo adatto a grandi volumi

1.4. Detossificazione e sbatterizzazione

1.5. Isolamento, determinazione del titolo e identificazione virale

1.1. Campionamento

A seconda dell'obiettivo si rende necessaria una pianificazione dei prelievi in base al tempo, al punto, al volume ed al numero, in particolare in campagne di controllo o di sorveglianza (14,15).

La strategia di campionamento sarà diversa a seconda dell'obiettivo: determinazione della presenza virale in caso di incidenti a livello di impianto di potabilizzazione, nella rete di distribuzione, oppure monitoraggio per il buon funzionamento dell'impianto, campagne di sorveglianza in concomitanza a ricerche epidemiologiche a livello di popolazione.

1.2. Raccolta del campione, neutralizzazione, trasporto e mantenimento

Alcuni presupposti si impongono per una realizzazione corretta:

- Sterilizzazione dei recipienti in autoclave o trattamento con disinfettanti, con lavaggio e controllo di eventuali residui del disinfettante usato
- Controllo di sterilità dei recipienti stessi
- Ricerca di eventuali portatori di virus tra gli operatori

Per Rotavirus ed HAV è consigliabile trattare con silicone le pareti dei recipienti per evitare l'adsorbimento delle particelle virali (14).

La raccolta dell'acqua deve essere eseguita evitando una eventuale contaminazione ed il campione mantenuto fino al momento ed al luogo d'esame in condizioni che impediscano l'inattivazione anche parziale di eventuali virus presenti.

Il campione d'acqua nel volume stabilito può venire raccolto in recipienti di plastica, o venir sottoposto a concentrazione direttamente dal punto di erogazione.

Il volume da raccogliere è dell'ordine di decine-centinaia di litri; non esistono attualmente valori limite standard per la presenza di virus nell'acqua potabile: sono stati proposti valori massimi di una unità infettante in 378-3780 litri da Melnick, meno di una unità infettante in 100 litri da WHO, virus assenti in 378 litri da Shuval (12).

Per aver quindi buone probabilità di evidenziare 1 PFU in 400 litri di acqua sarebbe opportuno esaminare una quantità molto maggiore di 400 litri, fino a 2000 litri (13).

Volumi di tal genere pongono problemi sia per la raccolta e soprattutto per il trasporto durante il quale e fino al momento dell'inizio della concentrazione l'acqua deve essere mantenuta per non più di 48 h a temperatura compresa fra 2 e 10 C°; nel caso di concentrazione in loco, gli eluati o i filtri possono venire mantenuti durante il trasporto e per alcune settimane a -26°C o a -70°C (14,16).

Il disinfettante più frequentemente usato nella potabilizzazione è il cloro che è presente, nell'acqua finita, sotto forma di cloro residuo libero. Questo dovrà essere neutralizzato con tiosolfato sodico ad una concentrazione finale di 50 mg/l, eventualmente potrà essere eseguito un calcolo della quantità necessaria di tiosolfato in funzione della quantità di cloro libero. L'operazione può essere effettuata mettendo già prima della raccolta il tiosolfato nei recipienti o, in caso di filtrazione in loco, può essere aggiunto continuamente con un iniettore situato prima del filtro. In questo caso è necessario un monitoraggio continuo dell'avvenuta neutralizzazione del cloro.

Un momento delicato è rappresentato dal trasporto in laboratorio, che sarà facilitato se la filtrazione viene eseguita al punto di prelievo, poichè diventa più agevole il trasporto del concentrato e dei soli filtri.

In ogni caso, che si tratti del concentrato, dei filtri o dell'acqua prima della concentrazione, il mantenimento dei campioni dovrà essere a basse temperature. La temperatura di mantenimento per l'acqua raccolta nei recipienti è a +4°C, per il concentrato e i filtri a +4°C o meglio -70°C (12,14).

L'acqua mantenuta a +4°C dovrà essere sottoposta a concentrazione entro 48 ore. E' preferibile invece trasportare le cartucce filtranti a -70°C in sacchetti di plastica sterili e dovranno essere eluite dopo essere state mantenute per trenta minuti a temperatura ambiente e 30 minuti in bagno a +36 °C, entro 1 o 2 giorni. (16)

L'aggiunta di sostanze che possono proteggere le particelle virali è consigliata da alcuni A.A., ma va valutata la specie virale che può essere presente. Il siero bovino, per esempio, sembra essere vantaggioso per gli enterovirus ma può contenere anticorpi antirotavirus. (12)

1.3. Concentrazione

I metodi di concentrazione disponibili e sperimentati presentano in misura variabile limiti nell'efficienza, che possono influire pesantemente quando si tratta di acqua di

rubinetto, viste le basse concentrazioni di virus e le grandi quantità di acqua da trattare (600, 1000, 2000, 3000 litri). Caratteristiche favorevoli sono invece basse concentrazioni di sostanze organiche e bassi livelli di torbidità.

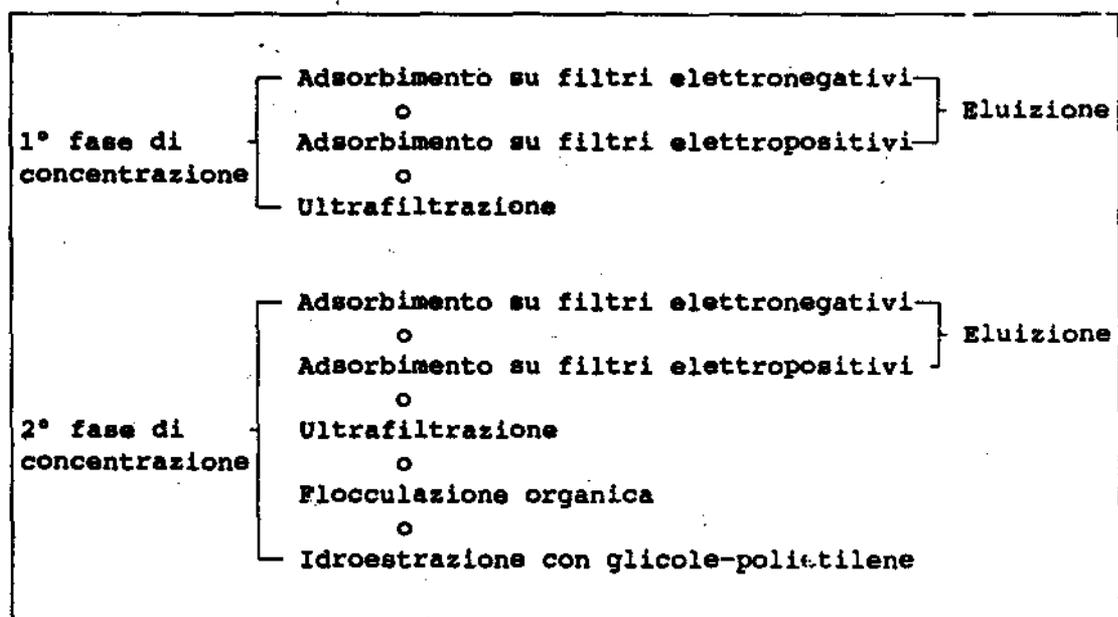
Visti i volumi di acqua da esaminare è necessario sottoporre i campioni a due o addirittura tre fasi di concentrazione: per l'acqua potabile si tratta di concentrare, a 10-30 ml, volumi iniziali di 200-400-1000 litri e più.

Come già detto questa può essere attuata sul campo, con successivo trasporto dei filtri carichi in laboratorio, oppure si può trasportare l'acqua, alla quale sia stato aggiunto, immediatamente dopo il prelievo, tiosolfato per neutralizzare il cloro residuo.

I metodi di concentrazione più adatti per l'acqua di rubinetto sono essenzialmente tre elencati nella tabella 2:

- due basati sull'adsorbimento ed eluizione (su filtri elettronegativi, o elettropositivi)
- uno sull'ultrafiltrazione.

Tabella 2: Fasi e metodi di concentrazione per l'acqua potabile



La scelta del metodo di concentrazione per l'acqua di rubinetto è conseguente alle caratteristiche di questo tipo di acqua rispetto alle altre: basse concentrazioni di virus, di particelle sospese, di sostanze organiche, grandi volumi da concentrare.

Il sistema di concentrazione dovrà rispondere all'esigenza di trattare tali volumi, senza che intervengano variazioni nell'efficienza di filtrazione, in un tempo di durata ragionevole.

E' preferibile anche per l'acqua di rubinetto far precedere una prefiltrazione.

1.3.1. 1° fase di concentrazione

1.3.1.a Adsorbimento su filtri elettronegativi.

E' un metodo che sfrutta la carica superficiale delle particelle virali prive di rivestimento. I virus enterici che sono oggetto di ricerca sono (ad eccezione dei Coronavirus) virus nudi, presentano all'esterno un capsido proteico, ed il loro punto isoelettrico è a pH 6,5-7. A pH acidi presentano una carica superficiale positiva, mentre a pH maggiori di 7 presentano una carica superficiale negativa. Essi si adsorbono su superfici a carica negativa in pH acido.

I filtri sono costituiti da esteri di cellulosa o da fibre di vetro legate a resine e presentano una carica negativa. Possono essere sotto forma di membrane o di cartucce.

L'adsorbimento dei virus su membrana carica negativamente è sostenuto da interazioni elettrostatiche e idrofobiche (17,18) ed è influenzato da vari fattori, fra i quali il pH e la natura della soluzione rivestono maggior importanza. L'aggiunta di sali cationici polivalenti, quali $AlCl_3$, $NaCl$, $MgCl_2$, favoriscono l'adsorbimento di virus diminuendo l'interferenza di componenti solubili o colloidali presenti nell'acqua (19,20).

Si è notato che con $AlCl_3$ l'efficienza di recupero risulta minore, probabilmente per la formazione di solfato di alluminio $Al_2(SO_4)_3$ (16,20).

Dopo aver acidificato a pH 3,5 e avere aggiunto uno di

questi sali si fa passare l'acqua attraverso i filtri elettronegativi con taglio di 0.2, 0.45 μm . I virus sospesi nell'acqua che a questo pH sono carichi positivamente si adsorbono sulla superficie filtrante che presenta una carica negativa.

L'efficienza di adsorbimento è risultata maggiore per i Poliovirus, che per Echovirus e Reovirus. Tale differenza è probabilmente dovuta alle caratteristiche fisico-chimiche dei virus (21).

Variando la dimensione dei filtri questo metodo può essere applicato come prima fase di concentrazione a volumi diversi di acqua; si presta bene per grandi volumi; la sua efficienza è risultata del 75% per Poliovirus, 79%-80% rispettivamente per Coxsackievirus A e B, 72% per Echovirus, 78% per la miscela dei quattro virus suddetti, del 97% per il virus dell'Epatite A (22,23).

Con questo metodo è stato possibile isolare, da acque in uscita da un impianto di potabilizzazione Coxsackie B3, B4, Poliovirus 1,2,3 Echovirus 7 e Picornavirus non identificati (24).

1.3.1.b 1° fase di concentrazione per adsorbimento su filtri elettropositivi

I filtri sono costituiti da cellulosa o fibre di vetro con resine polimeriche caricate positivamente.

Su questi filtri, i virus si adsorbono a pH naturale dell'acqua, sempre che non superi il valore di 8, senza l'aggiunta di sali cationici. Quindi non è necessario acidificare l'acqua. Per il resto si opera come per i filtri elettronegativi.

L'efficienza di adsorbimento è risultata maggiore fra pH 3,5 e pH 7. Enterovirus, Reovirus e Adenovirus sembrano assorbirsi con la massima efficienza su questi filtri a pH 7,5 (21).

Entrambi i tipi di filtri positivi e negativi sembrano avere una potenzialità di concentrazione di 10.000 volte ed in alcuni casi è riportata una efficienza maggiore del 90%; entrambi i metodi sono adatti ad operare su grandi volumi però con i filtri elettropositivi il processo

to è molto più semplice (25,26).

Eluizione

Si attua per entrambi i tipi di filtri con soluzioni alcaline: tampone-glicina NaOH pH 10,5 (20) o estratto di carne al 3% pH 9,5 o con glicina-estratto di carne pH 10 (3,5,22), facendo passare goccia a goccia (da 0,4 ml a 1600 ml e oltre), o facendo ricircolare, l'eluente in quantità diverse a seconda della superficie filtrante e quindi del volume d'acqua filtrato.

La soluzione glicina-NaOH a pH 11,5 (25) sembra provocare inattivazione degli enterovirus.

Le particelle virali vengono quindi asportate dal filtro per mezzo dell'eluente, per distruzione sia delle forze idrostatiche che di quelle idrofobiche. Il concentrato così ottenuto potrà venire nuovamente sottoposto a concentrazione (2° Fase).

1.3.1.c. 1° fase di concentrazione per mezzo di ultrafiltrazione a flusso tangenziale

Una tecnica alternativa a quelle basate sull'adsorbimento ed eluizione, è l'ultrafiltrazione con cui si effettua una separazione delle molecole presenti nell'acqua a seconda del loro peso molecolare.

L'acqua viene fatta circolare secondo un flusso parallelo ad una membrana di nitrocellulosa o di polietere-solfone, la cui porosità permette il passaggio dell'acqua e di molecole a basso peso molecolare (ultrafiltrato), trattenendo macromolecole e virus con dimensioni maggiori al taglio molecolare della membrana. I virus così rimangono concentrati nella frazione di liquido che non passa attraverso il filtro (27,28,29,30,31).

I filtri possono essere di taglio molecolare diverso, definito empiricamente e denominato NMWL, (nominal molecular weight limit) le molecole con peso molecolare superiore a tale limite non attraversano la membrana.

Esistono oltre alle membrane anche filtri a fibre ca-

ve.

Il taglio molecolare ottimale per concentrare i virus nell'acqua è di 10.000. Con tagli molecolari più alti 20.000-100.000 NMWL, la concentrazione è più rapida, ma si può verificare perdita di virus nell'ultrafiltrato, soprattutto per gli Enterovirus, non per i Reovirus e Rotavirus che hanno dimensioni maggiori come si può vedere dalla tabella 1.

Queste superfici filtranti presentano però dei siti attivi, su cui possono adsorbirsi le particelle virali, che diversamente si troverebbero al centro della corrente di flusso; per ovviare a tale inconveniente, si possono saturare questi siti attivi con proteine, condizionando così la membrana prima del procedimento di concentrazione, con estratto di carne al 3%.

Un lavaggio del filtro delle membrane filtranti sempre con estratto di carne alla fine, assicurerà il recupero di eventuali particelle virali adsorbite (30,31); nel liquido di lavaggio il recupero di virus è di solito maggiore che non nel concentrato.

Esistono tipi diversi di concentratori ad ultrafiltrazione adatti a grandi o a piccoli volumi, e ultrafiltri in provetta per volumi piccolissimi. Questi ultimi possono essere usati in una eventuale terza fase di concentrazione.

I momenti più delicati per un buon rendimento sono costituiti dal controllo del flusso del concentrato e dell'ultrafiltrato, dalla sanitizzazione, dalla conservazione delle membrane e del sistema.

La prima fase di concentrazione è effettuata in apparecchi che possono trattare fino a 50-100, 300-400-1000 litri di acqua. Una pompa spinge l'acqua attraverso una serie di membrane, il cui numero può essere aumentato rendendo possibile la concentrazione di volumi maggiori di acqua in tempi minori. Può essere usato un serbatoio da cui viene pescata l'acqua oppure può essere fatta scorrere l'acqua direttamente dal punto di prelievo. Il tempo del procedimento varia in funzione del volume iniziale e del numero di moduli usati, ma in ogni caso è un metodo rapido (30).

Partendo da grandi volumi come nel caso dell'acqua di

rubinetto si ottengono 1 litro-250 ml di concentrato che deve essere ulteriormente ridotto di volume.

L'efficienza di questo metodo è buona per tutti i tipi virus e per tutti i tipi di acqua (29,31,32).

1.3.2. 2° fase di concentrazione

Con qualsiasi dei tre metodi descritti si può attuare una seconda fase di concentrazione a partenza da volumi da 200 ml, 1 litro, 1,5 litri ottenuti dalla prima fase, usando filtri e sistemi di ultrafiltrazione adatti a piccoli volumi; in alternativa si prestano bene anche la flocculazione organica e l'idroestrazione con glicolepolietilene.

1.3.2.a. Adsorbimento su filtri elettronegativi

Si procede come per la prima fase di concentrazione (1.3.1.a.)

1.3.2.b. Adsorbimento su filtri elettropositivi

Si procede come per la prima fase di concentrazione (1.3.1.b.)

1.3.2.c. Ultrafiltrazione a flusso tangenziale

Si procede come per la prima fase di concentrazione (1.3.1.c.)

1.3.2.d Flocculazione organica

La flocculazione organica può essere effettuata solo su eluati proteici. I concentrati ottenuti dalla prima fase con i tre metodi precedentemente descritti contengono estratto di carne per cui il metodo della flocculazione organica può essere usato per la seconda fase di concentrazione senza aggiunta di materiale proteico. L'aggiunta di HCl fino ad un pH 3,5 provoca la formazione di floc -

lati costituiti dalle proteine precipitate in ambiente acido; i virus intrappolati in questi fiocchi dovranno essere successivamente recuperati per centrifugazione e aggiungendo una soluzione di fosfato sodico (Na_2HPO_4).

Il recupero sperimentale di virus con questo metodo è variabile nell'efficienza a seconda della specie virale e delle caratteristiche dell'acqua (33).

1.3.2.e. Idroestrazione con glicole-polietilene

Consiste nell'esporre la sospensione acquosa virale contenuta in un sacchetto di cellulosa semipermeabile, a materiale igroscopico (PEG) per una notte a $+4^\circ\text{C}$.

L'acqua richiamata dal materiale igroscopico attraverso la membrana ed i virus vengono concentrati all'interno del sacchetto e recuperati con lavaggio con PBS o con soluzioni al 3% di estratto di carne (32,33). Questo metodo presenta una buona efficienza, ma esige tempi piuttosto lunghi.

1.4. Detossificazione

Il concentrato ottenuto da uno qualsiasi di questi sistemi, eventualmente portato a pH 7-7,2 sarà sottoposto a saggio virale previa detossificazione e sbatterizzazione con cloroformio e aggiunta di antibiotici.

1.5. Isolamento, titolazione e identificazione virale

Per la determinazione del titolo virale, l'isolamento e l'identificazione virale, si applicano le stesse tecniche usate per gli altri tipi di acqua, cioè inoculo in colture cellulari, metodi immunologici e immunoenzimatici, ibridizzazione molecolare.

2. Conclusioni

Le procedure lunghe, complesse e costose rendono difficile l'attuazione della ricerca di virus nell'acqua di rubinetto routinariamente, come avviene per la determinazione della eventuale presenza batterica, almeno fino a che non siano disponibili tecniche semplici, rapide con cui evidenziare pochi unità virali con caratteristiche diverse in grandi volumi di acqua. La mancata identificazione di un indicatore costituisce una ulteriore difficoltà. Sono stati candidati fino ad oggi Poliovirus, batteriofagi o indicatori batterici, ma nessuno presenta le caratteristiche utili in tal senso. La loro presenza infatti può far supporre la presenza di virus, ma la loro assenza non la fa escludere.

Le ragioni che possono essere contrapposte a quelle che concorrono all'atteggiamento critico cui si è accennato all'inizio sono molteplici.

La purezza microbiologica dell'acqua presuppone anche l'assenza di virus, ma dall'acqua di rubinetto sono stati isolati virus di specie diverse malgrado i trattamenti in alcuni casi adeguati e completi (2,3,34); la richiesta idrica va continuamente aumentando e sempre più spesso le fonti di approvvigionamento sono costituite da acque superficiali dove vengono riversati liquami trattati e non; le acque profonde non sono risultate esenti da contaminazione virale. Probabilmente le conseguenze della presenza di virus nell'acqua potabile sono sottovalutate.

Una applicazione della ricerca di virus in acqua di rubinetto può risultare estremamente utile, oltre che in caso di contaminazione incidentale della rete idrica di distribuzione, in progetti di ampio respiro che abbiano come obiettivi:

la conferma o la negazione di una relazione fra presenza di virus nell'acqua e incidenza di malattie virali nella popolazione, nel controllo di qualità e funzionamento nei sistemi di potabilizzazione, in particolare nei riguardi di HAV, Rotavirus, virus di Norwalk.

BIBLIOGRAFIA

- 1) IAWPRC STUDY GROUP ON WATER VIROLOGY. 1983. The health significance of viruses in water. Water Res. 17: 121-132.
- 2) BITTON, G., FARRAH, S.R., MONTAGUE, C.L., AKIN, E.W. 1986: Viruses in drinking water. Environ. Sci. Technol. 20 (3): 216-222.
- 3) PAYMENT, P. 1981. Isolation of viruses from drinking water at Pont-Viau water treatment plant. Can. J. Microbiol. 27: 417-420.
- 4) DEETZ, T.R., SMITH, E.M., GOYAL, S.M., GERBA, C.P., VOLLET, J.J. III, TSAI, L., DUPONT, H.L., KESWICK, B.H. 1984. Occurrence of Rota- and Enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. Wat.Res. 18(5): 567-571.
- 5) KESWICK, B.H., GERBA, C.P., DUPONT, H.L., ROSE, J.B. 1984. Detection of enteric viruses in treated drinking water. Appl. Environ. Microbiol., 47 (6): 1290-1294.
- 6) HEJKAL, T.W., KESWICK, B., LABELLE, R.L., GERBA, C.P., SANCHEZ, Y., DREESMAN, G., HAFKIN, B. and MELNICK, J.L. 1982. Virus in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. J. Am. Water Works. Ass. 74: 318-321.
- 7) GOODMAN, R.A., BUEHLER, J.W., GREENBERG, H.B., MCKINLEY, T.W., SMITH, J.D. 1982. Norwalk gastroenteritis associated with a water system in a rural Georgia Community. Arch. environm. health. 37 (6): 358-360.
- 8) HOPKINS, R.S., GASPARD, G.B., WILLIAMS, F.P., KARLIN, R.J., CUKOR, G., BLACKLOW, N.R. 1984. A community water-borne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. Am J. Public Health 74 (3): 263-265.

- 9) KAPLAN, E.J., GOODMAN, R.A., SCHONBERGER, L.B., LIPP, E.C. and GARY, G.W. 1982. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. J. Infect. Dis. 146 (2): 190-197.
- 10) TAYLOR, J.W., GARY, G.W.Jr. and GREENBERG, H.B. 1981. Norwalk-related viral gastroenteritis due to contaminated drinking water. Am. J. Epidemiol., 114 (4): 584-592.
- 11) CLIVER, D.O. Literature Review - 1991. WHO collaborating centre on food virology. Food Research Institute, University of Wisconsin 1925 Willow Drive, Madison, WI 53706, U.S.A.
- 12) GOYAL, S.M., GERBA, C.P. 1982. Concentration of viruses from water by membrane filters. In Methods in Environmental Virology, pp. 59-116, Gerba C.P., Goyal S.M. (Eds.), Dekker M., New York.
- 13) AUTORI VARI. 1985. Standards Methods for Examination of Water and Waste Water, pp. 9/155-9/182. American Public Health Association, Washington DC 20005.
- 14) MAUL, A. 1991. Echantillonnage et inference statistique. in Virologie de Milieux Hydriques, pp. 35-69, L. Schwartzbrod (Ed.), Tec. e Doc. Lavoisier, Paris.
- 15) MAUL, A., VAGOST, D., BLOCK, J.C. 1989. Stratégies d'échantillonnage pour analyse microbiologique sur réseaux de distribution d'eau. Methods et programmes informatiques. Tec. & Doc. Lavoisier, Paris
- 16) DAHLING, D.R., WRIGHT B.A. 1984. Processing and transport of environmental virus samples. Appl. Environ. Microbiol. 47 (6): 1272-1276.
- 17) FARRAH, S.R., SHAH, O.D., INGRAM, L.O. 1981. Effects of chaotropic and antichaotropic agents on elution of poliovirus adsorbed on membrane filter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (2): 1229-1232.

- 18) SHIELDS, P.A., FARRAH, S.R. 1983. Influence of salts on electrostatic interactions between Poliovirus and membrane filters. Appl. Environ. Microbiol. 45 (2): 526-531.
- 19) WALLIS, C., HENDERSON, M., MELNICK, J.L. 1972. Enterovirus concentration on cellulose membrane, Appl. Microbiol. 23: 476-480.
- 20) SOBSEY, M.D., GLASS, J.S., JACOBS, R.R., RUTALA, W.A. 1980 Modifications of the tentative standard method for improved virus recovery efficiency J. Am. Water Works Ass. 350-355.
- 21) SOBSEY, M.D., GLASS J.S. 1984. Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. Appl. Environ. Microbiol. 47 (5): 956-960.
- 22) GUTTMAN BASS, N., NASSER, A. 1984. Simultaneous concentration of four enteroviruses from tap, waste, and natural waters. Appl. Environ. Microbiol. 47 (6): 1311-1315.
- 23) SOBSEY, M.D., OGLESBEE, S.E., WAIT, D.A.. 1985. Evaluation of methods for concentrating Hepatitis A virus from drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 50 (6): 1457-1463.
- 24) PAYMENT, P., TRUDEL, M., and PLANTE, R. 1985. Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 49 (6): 1418-1428.
- 25) SOBSEY, M.D., GLASS, J.S. 1980. Poliovirus concentration from water with electropositive adsorbent filters. Appl. Environ. Microbiol. 40 (2): 201-210.
- 26) SANSEBASTIANO, G., CESARI, C., REBIZZI, V., GUALERZI, L., BELLELLI, E. 1990. Concentration of viruses from water using different types of filters. Ig. Mod. 93: 785-795.

- 27) STROHMAIER, K. 1967. Virus concentration by ultrafiltration. In *Methods in virology*, pp. 245-274. Marmorosch and Koprowski N. Eds., Academic Press. New York.
- 28) BELFORT, G., ROTEM, Y., KATZNELSON, E. 1974. Virus concentration using hollow fiber membranes. Wat. Res. 9: 79-85.
- 29) JANSONS, J., BUCENS, M.R. 1986. Concentration of rotavirus by ultrafiltration Wat. Res. 20 (1): 79-83.
- 30) JANSONS, J., BUCENS, M.R. 1986. Virus detection in water by ultrafiltration. Wat. Res. 20 (12): 1603-1606.
- 31) MONTOLI, M.; L'ultrafiltrazione: una valida metodica di recupero. Millipore S.p.A., pp. 1-6.
- 32) LUCENA, F., DIVIZIA, M., BIZIAGOS, E., CRANCE, J.M., DELOINCE, R. 1991. Extraction et concentration des virus des milieux hydriques in *Virologie des Milieux Hydriques*. L. Schwartzbrod Ed., pp. 71-106, Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- 33) KATZNELSON, E., FATTAL, B., HOSTOVSKY, T. 1976. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. Appl. Environ. Microbiol. 32 (4): 638-639.
- 34) AULICINO, F.A. 1991. Il rilevamento dei virus in virus enterici nelle acque: epidemiologia e tecniche di isolamento e indentificazione. Aulicino F.A., Muscillo M., Patti A.M., Orsini P., Volterra L. (Eds.), pp. 56-93, *Rapporti Istisan 91/26*

PERICOLOSITA' DEI VIRUS ENTERICI NEI FANGHI DI DEPURAZIONE DELLE ACQUE REFLUE URBANE.

A. COLOMBI - L. GIUBILEO

Istituto di Medicina del Lavoro - Clinica "L. Devoto" -
Università degli Studi - Milano.

1. Introduzione

Si conoscono più di 100 diversi tipi di virus che possono essere eliminati con le feci dell'uomo infetto: virtualmente tale numero coincide con quello dei virus potenzialmente presenti nei liquami fognari.

La trasmissione dei virus per via fecale è infatti una delle principali forme, in termini di frequenza, per la diffusione delle più comuni infezioni virali, seconda solo alla via respiratoria.

Si consideri che solitamente la concentrazione di virus nelle feci di un individuo non infetto è pari a zero. Dai pochi dati disponibili si stima in mediamente $10^6 + 10^{10}$ unità virali per grammo la concentrazione di virus nelle feci di individui infetti. Ciò porta a valori estremamente variabili di virus nelle acque fognarie, in funzione dell'incidenza delle malattie, del periodo dell'anno e del livello igienico della comunità.

Nella tabella seguente (Tabella 1), sono presentati i virus enterici umani isolati dalle acque reflue e nei fanghi di depurazione.

Tabella 1. Virus umani che possono essere presenti nei liquami

Enterovirus (Polio, Echo, Coxsackie)
Virus dell'Epatite A
Rotavirus
Adenovirus
Reovirus
Papovavirus
Astrovirus
Calicivirus
Coronavirus
Virus "Agente di Norwalk"

I virus presentano una maggiore resistenza ai trattamenti di igienizzazione dei fanghi rispetto ai batteri, e hanno inoltre un diverso comportamento anche nell'ambiente esterno. Per esempio i virus sono meno facilmente rimossi nei processi di trattamento e presentano una maggiore sopravvivenza durante il loro passaggio nel terreno.

A differenza di quanto accade per i batteri, dove è in genere necessaria una elevata dose infettante, nel caso dei virus si pensa siano sufficienti poche particelle virali per produrre infezioni in condizioni favorevoli, anche se l'ipotesi secondo cui è sufficiente una singola particella virale per dare infezione è oggi contrastata da numerosi Autori.

Stime sulla concentrazione dei virus nei liquami negli USA, variano ampiamente: in generale tendono ad essere maggiori nella tarda estate, in relazione all'aumento di infezioni virali enteriche in quel periodo. Valori medi relativi agli USA indicano una concentrazione compresa fra le 1000 e le 10000 unità virali per litro di liquame grezzo (1).

La contaminazione virale dei fanghi può raggiungere valori anche elevati. Per es. Sattar e Westwood (2) in uno studio effettuato su un impianto la cui produzione giornaliera di fanghi era nell'ordine di 340.000 kg (con componente solida pari al 5%) sulla base del trattamento quotidiano di 2.7×10^8 litri di scarichi urbani, riferiscono di avere isolato virus nell'84% (62 su 74) dei campioni di fango crudo, nel 53% (18 su 36) di quelli digeriti anaerobicamente a 35° C. per 20 gg e nel 39% (11 su 28) di quelli sottoposti a lagunaggio; in due di questi ultimi la ricerca dei virus ha dato esito positivo anche dopo un periodo di 8 mesi, con valori di carica virale totale compresi tra poche migliaia a decine di migliaia di PFU/grammo sostanza secca a seconda del tipo di trattamento subito dal fango (vedi Tabella 2).

Per quanto concerne la possibilità di sopravvivenza dei virus, Rao e al. (3) riferiscono che un'alta percentuale della carica virale presente negli effluenti trattati dei 30000 milioni di litri di scarichi urbani che si riversano giornalmente nelle acque costiere degli USA viene adsorbita a particelle solide sedimentarie, situazione protettiva nei confronti della inattivazione con cloro. Nel mare si passa infatti da una concentrazione virale nell'ordine di 0.3 PFU/100 l nell'acqua a 3160 PFU/100 l nei sedimenti, così come a livello di un estuario fluviale da 160 a 2000 PFU/100 l, sempre rispettivamente in acqua e sedimenti.

TAB.2 - Concentrazioni virali in fanghi sottoposti a diversi trattamenti

TIPO DI FANGO	ORIGINE DEL FANGO	CONCENTRAZIONE IN VIRUS
Digeriti anaerobicamente (mesofila)	Madison, Wisconsin, U.S.A.	0,8 to 0,8 plaque forming units (PFU)/ml
Grezzo	Copenaghen, Denmark	10 to 1000 tissue culture infective dose (TCID ₅₀)/ml
Grezzo	Non indicato	1660 PFU/100 ml
Digeriti anaerobicamente (mesofila)	Non indicato	198 PFU/ml
Digeriti anaerobicamente (termofila)	Non indicato	6,2 PFU/ml
Grezzo	Tre impianti in Houston, Texas, U.S.A.	57 PFU/10 g peso secco (PS)
Grezzo	Los Angeles, California, U.S.A.	380 to 11500 PFU/100 ml
Digeriti anaerobicamente (mesofila)	Los Angeles, California, U.S.A.	30 to 360 PFU/100 ml
Digeriti anaerobicamente (termofila)	Los Angeles, California, U.S.A.	1,7 to 16,7 PFU/100 ml
Grezzo	San Antonio, Texas, U.S.A.	4,8 PFU/mg di solidi totali sospesi (TSS)
Digeriti anaerobicamente (mesofila) (40 giorni trattamento)	San Antonio, Texas, U.S.A.	0,64 PFU/mg TSS
Digeriti anaerobicamente (mesofila) (100 giorni trattamento)	San Antonio, Texas, U.S.A.	0,04 PFU/mg TSS
Grezzo	Gainesville, Florida, U.S.A.	380 to 1160 PFU/L
Grezzo	Sei differenti localita' degli U.S.A.	6,9 to 215 PFU/g TSS
Digeriti anaerobicamente (mesofila)	Sei differenti localita' degli U.S.A.	0,2 to 17 PFU/g TSS
Sottoposti a lagunaggio	Sei differenti localita' degli U.S.A.	1,1 to 1,2 PFU/g TSS
Grezzo	Sei impianti nel Southwest Ohio, U.S.A.	910 to 2320 PFU/100 ml
Sottoposti ad attivazione	Sei impianti nel Southwest Ohio, U.S.A.	125 to 821 PFU/100 ml
Digeriti anaerobicamente (mesofila)	Sei impianti nel Southwest Ohio, U.S.A.	63 to 377 PFU/100 ml
Grezzo	Tre impianti in UK	Superiore a 1400 PFU/g
Digeriti anaerobicamente (mesofila)	Tre impianti in UK	Superiore a 200 PFU/g
Digeriti anaerobicamente	Pensacola, Florida	14 to 26 TCID ₅₀ /g
Digeriti anaerobicamente (mesofila)	Pensacola, Florida	2 to 7 TCID ₅₀ /g
Grezzo	Cinque differenti impianti in U.K.	38 to 1400 PFU/g peso secco
Grezzo piu' humus	Cinque differenti impianti in U.K.	4 to 540 PFU/g peso secco
Digeriti anaerobicamente (mesofila)	Cinque differenti impianti in U.K.	6 to 190 PFU/g peso secco
Digeriti anaerobicamente (termofila)	Cinque differenti impianti in U.K.	9 to 64 PFU/g peso secco

2. Modalita' di esposizione

L'isolamento di microorganismi patogeni e tra essi i virus nei liquami e nei fanghi biologici di depurazione pone il problema della valutazione degli eventuali rischi connessi con l'esposizione umana e la possibilita' di contrarre malattie di natura infettiva ad essi conseguenti.

Nel settore della biodepurazione dei liquami e del trattamento e smaltimento dei fanghi, vari sono i gruppi di soggetti ipoteticamente esposti ai microorganismi: dai lavoratori addetti (intesi tanto come coloro che svolgono mansioni negli impianti di biodepurazione, trattamento e smaltimento, quanto coloro che operano in ambito agricolo e che utilizzano i fanghi in qualità di ammendante), alla popolazione generale, comprendente sia coloro che risiedono in zone viciniori agli impianti medesimi, sia i consumatori di prodotti di coltivazione provenienti da terreni trattati o di carni di animali che su essi vi abbiano pascolato.

Va tuttavia tenuta presente la distinzione esistente fra pericoli teorici, legati alla presenza dei patogeni nei fanghi, e pericoli dimostrabili, funzione del contatto con un numero sufficiente di essi a provocare un'infezione (4).

In generale le vie di esposizione umana ai microorganismi potenzialmente patogeni sono rappresentate da contatto, ingestione ed inalazione, con effetti sulla salute che comprendono manifestazioni allergiche oppure di tipo infettivo a livello cutaneo, gastroenterico e respiratorio (5,6,7).

L'esposizione ai patogeni per contatto o per ingestione puo' condurre ad affezioni sia cutanee che gastrointestinali.

L'esposizione per inalazione, puo' invece condurre sia ad infezioni dirette delle vie respiratorie, sia ad affezioni gastrointestinali conseguenti al movimento mucociliare e successiva deglutizione degli agenti penetrati a livello delle prime vie respiratorie (1).

Sono indubbiamente piu' note e studiate le modalita' di trasmissione che danno successivamente luogo alle manifestazioni cutanee o inerenti all'apparato digerente; ha quindi assunto, in tempi recenti, una particolare rilevanza il problema della immissione in aria, mediante aerosolizzazione, di microorganismi patogeni originariamente contenuti nei liquami, anche in considerazione del fatto che tale modalita' di diffusione risulta la piu' importante nel ciclo lavorativo considerato, e che di conseguenza la via inalatoria risulta la via prevalente di esposizione

agli agenti patogeni (8,9).

Questa via di diffusione, interessa prevalentemente batteri e virus, poiché protozoi e uova di elminti non sono aerodispersibili a lunghe distanze dalla sorgente di diffusione per le loro dimensioni (1).

Per quanto riguarda l'esposizione per via inalatoria la sede di deposizione delle particelle di aerosol nel polmone, e quindi la possibile via di penetrazione nell'organismo, dipende principalmente dalle dimensioni delle particelle. Quelle superiori a 5 μm si depositano principalmente nelle vie respiratorie superiori, da dove, veicolate dal muco, possono arrivare all'orofaringe e da qui all'apparato gastrointestinale; mentre per diametri inferiori a 1.0 micron, a parità di frazione respirabile, analogamente a quanto visto per le polveri, il rischio sarà chiaramente maggiore per diametri compresi fra 0 e 0.5 micron, valori che consentono una penetrazione nei polmoni ed una deposizione definitiva a livello alveolare.

Quanto detto concerne sia la penetrazione di batteri che di virus. Alcuni enterovirus possono anche moltiplicarsi nello stesso apparato respiratorio (1).

La formazione di aerosol liquidi o solidi contenenti microorganismi si verifica in molti processi che avvengono spontaneamente in natura, come per esempio in seguito all'azione del moto ondoso del mare, o del vento che partecipa all'erosione dei suoli; in questi casi è documentata la possibilità che il trasporto dei microorganismi veicolati possa avvenire anche sulle lunghe distanze.

Nell'ambito degli impianti di depurazione di fanghi invece l'aerosolizzazione dei microorganismi ha luogo principalmente per due motivi: il primo consiste nel gorgogliamento dell'aria fornita ai liquami per supportarne la popolazione microbica attiva nella depurazione (la vasca di ossidazione appare come la fonte più rilevante di aerosol microbici nell'ambito di impianti di depurazione a fanghi attivi, avendosi a questo livello la maggiore aerazione). Il secondo è rappresentato dalla presenza negli impianti di salti d'acqua, vortici, organi meccanici in movimento capaci di nebulizzare parte dei liquami stessi (10,11).

Anche gli aerosol prodotti dagli impianti possono mostrare alta persistenza ambientale. Così ad esempio coliformi aerodispersi sono stati rilevati (quando la loro concentrazione era nell'ordine dei $10^3/\text{ml}$ o più nelle acque di depurazione) nell'aria a 350 mt sottovento rispetto al punto di erogazione (12).

Durante la formazione dell'aerosol i microorganismi subiscono una importante riduzione nel loro numero rispetto alle acque che li generano, riduzione che può essere

ricondata agli sbalzi di pressione che si verificano nel processo di aerosolizzazione (1).

La sopravvivenza dei microrganismi, dopo dispersione è prevalentemente legata a vari fattori ambientali quali umidità relativa, presenza di radiazioni U.V. e temperatura, (13,14).

Per quanto riguarda in particolare i virus, successivamente alla riduzione iniziale legata all'impatto da aerosol e valutata nell'ordine di 0.5 unità logaritmiche, si determina una riduzione approssimativamente nell'ordine di 1 unità log ogni 40 secondi, in funzione prevalentemente della presenza di radiazioni solari, temperatura elevata e bassa umidità relativa (1).

Nella valutazione dei fattori determinanti la potenziale esposizione degli addetti agli aerosol veicolanti agenti virali in ambienti non confinati, accanto alla sopravvivenza dei microrganismi negli aerosol, si deve considerare anche il comportamento fisico dell'aerosol stesso, ossia la sua diffusione nell'ambiente, che viene limitata da processi di deposizione e dalla distanza dalla sorgente di disseminazione.

La diffusione dei virus nell'atmosfera degli impianti di depurazione sarebbe pertanto condizionata nella fase iniziale prevalentemente dal processo di deposizione degli aerosol, successivamente dal decadimento biologico e dalla entità della diffusione orizzontale delle particelle, quest'ultima ovviamente legata ai fattori fisici segnalati quali velocità e turbolenze dell'aria sovrastante l'impianto e altezza raggiunta dagli aerosol.

3. Studi di effetti sulla salute

Sino a dieci anni fa le conoscenze sugli effetti sulla salute ipotizzabili, conseguenti ad esposizione a microrganismi patogeni in impianti di depurazione dei liquami e, in fasi successive, di trattamento e smaltimento dei fanghi di risulta erano scarse.

Più recentemente vari studi sono stati condotti per verificare l'esposizione professionale, sia in impianti di depurazione che nel riutilizzo dei liquami in agricoltura, nonché il possibile interessamento di popolazioni residenti nei pressi degli stessi impianti. Riportiamo una breve rassegna dei principali lavori relativi agli effetti indagati conseguenti all'esposizione a virus.

Sackla e al. (15) hanno effettuato uno studio a Manito-

ba (Canada') per valutare l'esposizione professionale ad agenti biologici patogeni in impianti di trattamento secondario dei liquami a fanghi attivi. Lo studio comprendeva l'esame di circa 70 operatori dell'impianto locale (gruppo dei soggetti "esposti"), associati a due gruppi di controllo, il primo "non esposto" costituito da personale amministrativo, il secondo "malato", costituito da pazienti ospedalizzati il cui siero era stato inviato per analisi al laboratorio dell'ospedale. Le indagini condotte comprendevano accanto alla ricerca di virus nelle feci e dei tassi di immunoglobuline sieriche, l'esame sierologico dei tassi anticorpali per virus respiratori (Adenovirus, Virus Respiratorio Sinciziale, Parainfluenzale 1,2,3, Influenza A e B), virus enterici (Poliovirus 1,2,3, Coxsackie B2, B5, B6, Echovirus 7 e Reovirus), virus dell'Epatite A e B e Antigene Australia. Gli esami condotti all'inizio dello studio erano stati successivamente controllati dopo un anno. L'unica apparente differenza rilevata fra i gruppi ha riguardato un aumento del tasso anticorpale per Reovirus, statisticamente significativo negli operatori rispetto al gruppo di amministrativi e di poco superiore al gruppo di ospedalizzati. Veniva però anche rilevata una riduzione dei tassi per i virus parainfluenzali negli esposti, di difficile interpretazione.

Nell'indagine furono osservate infine due sole sierconversioni in tecnici di laboratorio, rispettivamente per la comparsa di anticorpi per l'Epatite A e per la *Brucella abortus*; i tassi di immunoglobuline non presentavano variazioni, e non fu rilevata la presenza di virus nelle feci.

Clark et al. (16) confrontarono in una indagine sieroepidemiologica trasversale un gruppo di addetti alla conduzione di impianti di depurazione di liquami urbani con il personale addetto alla manutenzione dell'impianto stesso e con netturbini. I tassi anticorpali specifici per Adenovirus, Reovirus e Citomegalovirus non presentarono nei tre gruppi significative differenze, che erano invece presenti per alcuni Enterovirus: più precisamente avevano registrato un incremento quelli relativi al Coxsackie B3 e B5, rispettivamente negli addetti al trattamento ed alla manutenzione, mentre risultavano ridotti i tassi anticorpali per i virus Echo 6 negli stessi addetti al trattamento. Analogamente il livello di immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) non presentava differenze statisticamente significative nei gruppi a confronto, tranne per le IgG che risultavano più alte nei netturbini.

Clark e al. (17) successivamente in un ampio studio sieroepidemiologico, prospettico, hanno esaminato l'esposizione professionale degli addetti di impianto di depurazione di tre grosse città statunitensi. L'indagine com-

prende una studio sieroepidemiologico, mirato ad infezioni batteriche e virali, la determinazione dei livelli di immunoglobuline e la ricerca di virus e batteri in materiale fecale. I test sierologici comprendevano l'analisi di campioni di siero raccolti dallo stesso individuo in tempi successivi per verificare il tasso di anticorpi contro specifici agenti infettivi. Un incremento significativo dei tassi anticorpali fra prelievi successivi era ritenuto indicativo di avvenuta infezione. Gli agenti virali comprendevano virus respiratori (Adenovirus), virus enterici (Reovirus, Poliovirus 1,2,3, Coxsackie A7, A9, A16, A21, B1, B6, Echovirus, 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 19, 24, 30) Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Epatite A, Epatite B e Antigene Australia. I gruppi allo studio erano costituiti da operatori degli impianti, in parte di nuova assunzione e in parte dipendenti da tempo. Gli esposti erano stati suddivisi per le caratteristiche della mansione e per rilievi ambientali in gruppi ad alta e bassa esposizione agli aerosol prodotti sia da liquami che da fanghi. Complessivamente avevano preso parte allo studio più di 500 volontari, sia esposti che controlli.

Nell'indagine vennero rilevate varie modificazioni nei tassi anticorpali sia nei controlli che negli esposti e tre sier conversionsi nel gruppo di esposti prevalentemente per enterovirus. Tuttavia le modificazioni segnalate non presentavano significatività statistica, non dimostrando così un incremento delle infezioni da enterovirus nel gruppo di addetti.

In un'altra indagine (18) l'analisi delle variazioni dei tassi anticorpali specifici per il virus "Agente di Norwalk" un virus capace di causare disturbi gastrointestinali, risultarono indicative per una maggiore tendenza ad ammalare negli operatori di nuova assunzione, rispetto agli operatori assunti da lungo tempo ed al gruppo di controllo.

I lavoratori esposti a livelli medio alti di aerosol presentavano inoltre titoli anticorpali più elevati rispetto a lavoratori con bassa esposizione.

Uno studio prospettico di due anni, condotto in Romania (19) riporta un'aumentata incidenza di anticorpi contro vari virus in lavoratori con esposizione sia a liquami che a fanghi. Lo studio venne condotto su tre gruppi denominati A, B, C che presentavano un frequente, saltuario o assente contatto con i liquami. L'incidenza di tre virus respiratori (Adenovirus, Parainfluenzale 1, e Influenza tipo A) venne rilevata significativamente più alta nel gruppo A rispetto al gruppo C, indicando così possibili effetti correlati all'esposizione a liquami. Non vennero al contrario rilevate differenze per la frequenza di anticorpi, anti Herpes Virus, Rickettsie e virus dell'Epa-

tite B.

Accanto ad effetti sulla salute negli operatori degli impianti, dobbiamo anche considerare la possibilita' di effetti sfavorevoli in popolazioni residenti nei pressi. Un ampio studio e' stato condotto negli anni 1979-1980 in un'area residenziale di 1,6 km², vicino a un impianto a fanghi attivi, nel distretto municipale di Chicago (20).

Circa 1200 volontari residenti furono sottoposti ad indagini sanitarie. Di questi in 161 venne eseguita la ricerca nelle feci e in tamponi faringei di virus e batteri patogeni. 318 volontari effettuarono invece prelievi ematici all'inizio e al termine dello studio; vennero in particolare valutate la prevalenza e l'incidenza a 5 virus Cocksackie (B1, B2, B3, B4, B5) e 4 Echovirus (3, 6, 9, 12). Gli autori riferiscono di non avere rinvenuto alcuna correlazione rilevante tra gli indicatori di esposizione adottati nello studio sulla base di indagini ambientali, e la frequenza di infezioni virali (e batteriche) rilevate attraverso le sierconversioni osservate, concludendo che questo impianto non aveva comportato effetti per la salute nella popolazione dell'area residenziale allo studio. D'altro canto l'impianto venne riconosciuto come fonte di dispersione di aerosol contaminati attraverso la misura di coliformi totali e particelle aerodisperse nell'area residenziale considerata.

Gli Autori affermano inoltre che le conclusioni andavano temperate dal numero esiguo dei soggetti sottoposti allo studio. Nell'impianto non rilevarono inoltre alte concentrazioni di particelle, gas o metalli ed inoltre le concentrazioni di contaminanti diffuse come aerosol non presentavano valori molto piu' bassi rispetto a quelli rilevati in altri impianti similari.

Un'ultima condizione di esposizione a virus di origine enterica per gli operatori e la popolazione generale e' rappresentata dal riutilizzo agricolo dei liquami fognari.

Lo smaltimento di liquami non o poco trattati, direttamente sul terreno, e' poco diffusa in Italia per vincoli legislativi. Tuttavia e' interessante per definire i rischi da patogeni presenti nei liquami esaminare alcune indagini condotte negli Stati Uniti.

Dorn (21) ha condotto uno studio prospettico di tre anni su agricoltori di alcune fattorie dell'Ohio in cui venivano utilizzati fanghi trattati sparsi sul terreno come ammendanti, nella misura di 2-10 tonn./secco per ettaro, corrispondente ad un quantitativo limitato.

Nell'indagine non vennero osservati effetti sulla salute attribuibili alle quantita' applicate; gli Autori d'altro canto suggeriscono prudenza nell'estrapolare i dati verso situazioni caratterizzate da uno spandimento di quantitativi maggiori di fanghi, da piu' elevate concen-

trazioni di patogeni, da maggiori estensioni di terreno trattato oppure da una maggiore permanenza degli operatori sui terreni trattati.

In un altro ampio studio sieroepidemiologico, sui residenti nei pressi degli impianti, e sugli operatori del Sistema sperimentale di trattamento del terreno con liquami e fanghi di Lubbock, Camann et al. (22) hanno riscontrato tassi di affezioni di origine virale piu' alti rispetto ai gruppi di controllo fra coloro che avevano un alto grado di esposizione ad aerosol contaminati. Cio' si era verificato nel 1983, all'inizio della primavera, in concomitanza con fanghi sparsi sul terreno che eccedevano i limiti di contaminazione da enterobatteri (Coliformi fecali) consigliati per tale uso. Nessun episodio infettivo, d'altro canto, sfocio' in gravi malattie.

Un'ampia indagine sui sieri di operatori di una stazione di trattamento e distribuzione dei liquami per irrigazione nel Muskegon County (Ohio), non ha rilevato differenze prevalenze dei titoli anticorpali per diversi enterovirus rispetto ai gruppi di controllo (23). Gli enterovirus testati erano; Poliovirus 1, 2, 3, Coxsackie B2, B5, Echovirus 7 e 11.

Nella stessa indagine un sottogruppo del gruppo di esposti con mansione di pulizia dei diffusori, per i quali era ipotizzabile un rischio maggiore conseguente ad una piu' alta esposizione al liquame, ha presentato un titolo superiore di anticorpi contro il virus Coxsackie B5 rispetto ai controlli. Lo stesso virus e' stato isolato nelle feci e nel tampone faringeo di un lavoratore del gruppo di controllo, testimoniando cosi' la presenza del virus nella comunita'.

Negli anni 1980/81 venne condotto in Israele un ampio studio sieroepidemiologico per valutare l'incidenza di affezioni virali in kibbutzim che utilizzavano i liquami trattati per fertirrigazione ed acquacoltura. I lavoratori allo studio e le famiglie di residenti furono suddivisi in relazione al grado di utilizzazione dei liquami (24,25).

Fra i vari esami eseguiti, il solo tasso anticorpale per Echovirus 4 mostro' una prevalenza significativamente superiore negli esposti rispetto ai controlli. L'aumento del tasso fu successivo ad un periodo di forte incidenza di affezioni gastroenteriche nel corso di un epidemia estesa a tutto il territorio nazionale.

Il fatto che nella popolazione allo studio non vennero verificati altri aumenti di tassi anticorpali in momenti differenti, suggerisce, a detta degli Autori, che la potenziale esposizione ai liquami non comporta in condizioni normali un'incremento nella prevalenza di anticorpi antivirali. Un rischio doppio di affezioni gastroenteriche venne invece rilevato nello stesso studio nella popolazio-

ne con età compresa tra 0 a 4 anni, durante il periodo estivo; lo stesso aumento non venne tuttavia confermato nell'arco dell'intero anno.

Riassumendo quanto segnalato, benché negli studi occupazionali siano stati riportati negli addetti, aumenti isolati di tassi anticorpali specifici per virus enterici interpretabili come indicatori di potenziale esposizione, evidenze che tuttavia necessiterebbero, in tale senso, di ulteriori conferme, gli autori nel complesso non rilevano la presenza di un rischio infettivo significativo per gli addetti conseguente alla potenziale esposizione agli agenti virali nell'attività lavorativa.

Analoghe conclusioni vengono riportate dagli studi condotti sulla popolazione residente e sugli operatori nell'ambito del riutilizzo agricolo dei liquami, non essendo emerso, anche in questo caso, un rischio significativo nel corso di normali condizioni operative.

In queste stesse indagini sono tuttavia riportati risultati positivi, riferiti, dagli autori, a inusuali forti esposizioni degli operatori ai liquami, oppure a casi in cui vennero utilizzati liquami fortemente contaminati, o, infine, in concomitanza di epidemie virali nella popolazione generale, aspetti che segnalano l'esistenza di rischi latenti nell'uso di liquami in modo non controllato.

4. Conclusioni

Il problema del rischio igienico nei confronti dell'uomo e dell'ambiente per il riutilizzo agricolo delle acque reflue e dei fanghi di depurazione delle acque reflue stesse risulta di notevole rilevanza sia per gli aspetti di sanità pubblica che di agroeconomia che esso riveste.

Numerose sono le segnalazioni presenti nella letteratura scientifica sull'argomento al seguito di indagini condotte con l'intento di valutare le reali possibilità di trasmissione delle diverse forme patogene comprese quelle virali, ad ospiti intermedi e successivamente all'uomo. Questi studi forniscono informazioni sufficienti per definire la esistenza dei presupposti di una pericolosità infettiva nel riutilizzo indiscriminato e incontrollato dei fanghi biologici in agricoltura. E' da sottolineare che i dati disponibili soffrono però di scarsa generalizzazione e limitata confrontabilità per il grande numero di variabili capaci di interferire o modificare la sopravvivenza ambientale, la capacità infettante e la risposta biologica all'infezione delle numerose specie di microrga-

nismi potenzialmente patogeni, presenti nei fanghi, in particolare virus enterici. Le evidenze sperimentali ed epidemiologiche sino ad ora raccolte non permettono di stabilire un rapporto di casualità tra distribuzione dei fanghi nel terreno agricolo ed insorgenza di patologie infettive nella popolazione generale.

La mancanza di evidenze epidemiologiche rilevabili in condizioni ordinarie di uso agricolo dei fanghi, se da un lato lascia presumere che una buona gestione delle operazioni di distribuzione dei fanghi possa permettere un efficace controllo del rischio igienico (ad esempio attraverso il rispetto di intervalli di tempo fra distribuzione e pascolo, l'interramento dei fanghi, il non uso su colture destinate crude al consumo umano ed il rispetto di fasce di territorio con corsi d'acqua e pozzi), dall'altro non autorizza a minimizzare le pur limitate evidenze sperimentali che segnalano la presenza di numerosissimi patogeni virali, (oltre a quelli batterici protozoari e parassitari) capaci, con diverse modalità, di migrare in vari ecosistemi e di pervenire all'uomo e agli animali. Alla luce di queste evidenze appare più che giustificato lo sforzo tecnologico per sviluppare processi economicamente sostenibili efficaci nel conseguire una riduzione della carica potenzialmente patogena e il raggiungimento di validi standard di qualità igienica dei fanghi, efficaci per la tutela della salute dell'uomo e dell'ambiente.

Bibliografia

- 1) U.S.EPA. 1985. Health effects of land application of municipal sludge. EPA/600/1-85/015.
- 2) SATTAR, S.A. e WESTWOOD, J.C.N. 1979. Recovery of viruses from field samplers of raw, digested, and lagoon-dried sludges. Bulletin of the WHO, 57 (1):105-108.
- 3) RAO et al. 1986. Human viruses in sediments, sludges and soils. Bulletin of the WHO, 64 (1): 1-14.
- 4) WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 1981. The risk to health of microbes in sewage sludge applied to land. Report of a WHO Working Group, Stevanage. EURO Reports and Studies n.54 WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- 5) AVIO, C.M. et al. 1979. Aerodiffusione batterica e virale negli impianti di depurazione ossidativa dei liqua-

mi a mezzo turbina. Rivista Italiana d'Igiene, XXXIX: 5-6.

6) BUTELLI, P. 1988. Impatto da aerosols batterici negli impianti di depurazione. Ingegneria Ambientale, 17 (1):18-31.

7) MAGLIANO, B. 1980. Problemi di igiene e sicurezza nelle stazioni di depurazione dei rifiuti liquidi urbani. Igiene e Sanità Pubblica, XXXVI: 129-155.

8) HICKEY, JLS. et al. 1975. Health significance of airborne microorganisms from wastewater treatment processes. Part I: Summary of investigation. J. Water Pollut. Control Fed., 47 (12):2741-2757.

9) LUNDHOLM, M. e RYLANDER, R. 1983. Work related symptoms among sewage workers. British J. Industr. Medic., 40:325-329.

10) BLANCHARD, DC. e SYZDEK, L. 1970. Mechanism for the water-to-air transfer and concentration of bacteria. Science, 170: 626-629.

11) CRONHOLM, LS. 1980. Potential health hazard from microbial aerosols in densely populated urban region. Appl. Environ. Microbiol., 39:6-12.

12) BOVALLIUS, A. e al. 1978. Long-range air transmission of bacteria. Appl. Environmental Microbiology, 35, (6): 1231-1232.

13) CARNOW, B.R. et al. 1979. Health effects of aerosols emitted from an activated sludge plant. EPA-600/1-79-019. U.S.EPA, Cincinnati, (Ohio).

14) TELTSCH, B., KATZENELSON, E. 1978. Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 35: 290-296.

15) SEKLA, L. e al. 1980. Sewage treatment plant workers and their environment: a health study. In: "Wastewater Aerosols and Disease". EPA-600/9-80-028, U.S. EPA, Cincinnati (Ohio).

16) CLARK, C.S. et al. 1977. Sewage worker's syndrome. The Lancet, 1:1009-1010.

17) CLARK, C. S. et al. 1981. Health risks of human exposure to wastewater. Project Summary EPA-600/1-81-069 U.S. EPA, Cincinnati (Ohio).

- 18) CLARK, C. S. et al. 1985. Serologic survey of rotavirus, Norwalk Agent and Proctotheca Wickerhamii in wastewater workers Am. J. Pub. Hlth., 75:83-85.
- 19) IFTIMOVICI, R. et al. 1980. Prevalence of antiviral antibodies in workers handling wastewater and sludge. Revue Roumanie de Medicine - Virologie 31 (3):187-189.
- 20) NORTHROP, R.L. et al. 1980. Health effects of aerosols emitted from an activated sludge plant In: "Wastewater Aerosols and Disease". EPA 600/9-80-028.
- 21) DORN, C. R. et al. 1985. Municipal sewage sludge application in Ohio farms: health effects. Environ. Res., 38:332-359.
- 22) CAMANN, D.E. et al. 1985. Health effects study for the Lubbock land treatment project. EPA 600/1-85-023, U.S. EPA, Cincinnati (Ohio).
- 23) LINNEMAN, C.C. Jr. et al. 1984. Risk of infection associated with a wastewater spray irrigation system used for farming. J. Occup. Med., 26:41-44.
- 24) SHUVAL, H.I. et al. 1984. Retrospective epidemiological study of disease associated with wastewater utilization. EPA-600/1-84-006. U.S.EPA, Cincinnati (Ohio).
- 25) FATTAL. 1986. Health risks associated with wastewater irrigation: an epidemiologic study. Am. J. Public Health, 76:977-983.

CONTAMINAZIONE VIRALE DI UN BACINO LACUSTRE

A. MOIRAGHI RUGGENINI , A. MAIELLO* , O. OSSOLA*

Dipartimento di Igiene e Medicina di Comunità - Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università degli Studi di Torino

* Laboratorio di Sanità Pubblica - USSL 51 Novara

Il tema dei rischi per la salute correlati alla polluzione dell'ambiente idrico è stato ripetutamente affrontato e discusso: indubbiamente l'aspetto di maggior pregnanza è quello relativo al fatto che molte acque di superficie, in Italia e all'estero, sono attualmente utilizzate a scopo potabile; tuttavia oggi sono segnalati anche altri problemi sempre in ambito alimentare, o relativi ad un diverso utilizzo dell'acqua. Le differenti problematiche privilegiano gli aspetti dell'inquinamento fisico-chimico o di quello batteriologico, talora regolamentati da ben precise disposizioni legislative ed altre volte oggetto di attività di ricerche tutto sommato ancora " pionieristiche ".

Uno degli aspetti che ogni anno viene indagato e genera commenti compiaciuti o, invece, allarmati è quello relativo alle acque di balneazione per le quali sono stabiliti parametri di accettabilità, almeno batteriologici, sufficientemente precisi.

I problemi delineati sono oggetto di attenzione e di dibattito, anche acceso, tra Autorità istituzionalmente preposte alla sorveglianza ed Associazioni che si ritengono, a torto o a ragione, custodi dell'ambiente e tutrici della sua salubrità. Basti pensare alle annuali diatribe tra USSL e battelli Verdi in tema di caratteristiche di balneabilità dei nostri mari.

E' comunque interessante notare come comincia ad attivarsi su questi temi un coinvolgimento importante dell'opinione pubblica, e non solo nel nostro Paese.

Va citato, quale esempio, un lavoro comparso su British Medical Journal (1) nel quale, dopo aver ricordato le differenze tra standard europei, meno rigorosi, e nord americani (Stati Uniti e Canada) e sollecitato la Commissione CEE a rivedere gli standard medesimi, si riferiscono i risultati di uno studio commissionato dal Department of Environment, mirante a valutare i rilievi clinici, soggettivi ed oggettivi, che determinano il rischio per la salute in rapporto ai bagni di mare in acqua contaminata. (Tabella 1)

Tabella 1. Rischio relativo di sintomi riportati, corretti per età e sesso, in rapporto ai bagni in acqua di mare. Ramsgate, agosto 1990 (1)

			Sintomi	segnalati	Rischio	Intervallo di
			n.	%	relativo	confidenza del 95%
Almeno un sintomo segnalato	non bagnanti*		180	21.5	1.00	
	bagnanti**		275	26.3	1.31	da 1.04 a 1.64
		totale	142	25.3	1.25	da 0.96 a 1.62
		che hanno bagnato solo le gambe °				
		nuotatori °°	105	26.3	1.31	da 0.98 a 1.75
		surfisti o subacquei^	28	33.3	1.81	da 1.09 a 2.99
Sintomi gastrointestinali (inclusa la diarrea)	non bagnanti		68	8.1	1.0	
	bagnanti		116	11.1	1.47	da 1.06 a 2.04
Diarrea	non bagnanti		30	3.6	1.00	
	bagnanti		61	5.8	1.88	da 1.18 a 2.99
Sintomi oculari	non bagnanti		41	4.9	1.00	
	bagnanti		62	5.9	1.24	da 0.81 a 1.90
Sintomi di gola, orecchio e naso	non bagnanti		110	13.1	1.00	
	bagnanti		148	14.2	1.08	da 0.82 a 1.43
Sintomi respiratori	non bagnanti		47	5.6	1.00	
	bagnanti		77	7.4	1.40	da 0.94 a 2.07

* n = 1044 ** n = 839 ° n = 561 °° n = 399 ^ n = 84

Da questo studio, effettuato su 1883 soggetti, emerge un aumento dose correlato del rischio di malattie autodiagnosticate da bagno in acqua di mare, rischio che, anche se per ora calcolabile su un numero relativamente piccolo di soggetti (turisti di giornata) sembra associato alla qualità microbiologica dell'acqua.

I risultati emersi confermano quanto osservato in ricerche analoghe, condotte nel 1990 (1) e forniscono la certezza dell'associazione esistente tra patologie di diverso tipo e localizzazione ed utilizzo di acque improprie all'uso balneare. Ciò sembra particolarmente importante, in quanto, in effetti, nonostante disposti legislativi comunitari e dei singoli stati fissino standard, peraltro non sempre corrispondenti a razionalità basata su criteri scientifici, non sempre esiste universalità di consensi sulla reale pericolosità associata al bagno in acque inidonee.

I problemi delineati e le divergenze di opinione sono presenti anche nel nostro Paese, nel quale esiste, peraltro, una legislazione che stabilisce i criteri di balneabilità sufficientemente precisi solo per quanto riguarda i limiti microbiologici.

Da qualche tempo, su indicazioni CEE (2) recepite anche dalle nostre Amministrazioni, si è cominciato a parlare anche di contaminazione da virus enterici, sia relativamente ai problemi posti dall'uso a scopo potabile di acque di superficie, sia in riferimento agli aspetti della balneazione o delle altre attività ludiche o sportive che possono essere esercitate a contatto con l'acqua di grandi serbatoi naturali.

In merito a quest'ultimo aspetto l'ISS ha attivato un gruppo di studio con l'obiettivo di affrontare il problema in maniera il più possibile standardizzato da parte degli operatori, fornendo, dopo una serie di incontri, un protocollo operativo.

Contrariamente a tutte le altre unità coinvolte nel citato gruppo di studio ed interessate ai problemi delle acque marine, il nostro ha affrontato il problema relativo ad un grande bacino lacustre qual è il lago Maggiore.

Si tratta com'è noto di una superficie di 212 km² che riceve, oltre all'immissario Ticino, numerosi fiumi e torrenti, alcuni dei quali vettori di scarichi di insediamenti urbani ed industriali. Il fiume Ticino funge anche da emissario.

In un precedente lavoro, non ancora pubblicato, erano stati indagati, relativamente al problema della contaminazione virale, gli affluenti del lago della sponda piemontese. Questa limitazione era determinata dal fatto che il laboratorio di appoggio era quello di Sanità Pubblica di Novara; la ricerca comunque si inquadra in un più ampio contesto di sorveglianza microbiologica sulle acque del lago, patrocinata dalla Commissione italo-svizzera, attiva da oltre un ventennio.

I risultati emersi consentirono di individuare per l'acqua di alcuni di questi fiumi la capacità di determinare, su monostrati cellulari, effetto citopatico, probabilmente attribuibile ad Enterovirus, con una frequenza di circa 10%.

I risultati positivi alla prima semina ma non confermati nei passaggi successivi, erano più numerosi (circa il triplo); tuttavia non essendo stati convalidati, almeno relativamente alla presenza di Enterovirus, neppure con metodi diversi dalla semina su colture cellulari e dotati di elevata sensibilità (PCR), non vengono considerati.

I campioni sicuramente positivi erano concentrati nella stagione inverno-primaverile (febbraio-marzo) (t°C 5-10) e dal punto di vista batteriologico erano caratterizzati da cariche elevate (10⁴ - 10⁵) o medio alte (10³ - 10⁴), sia di flora totale che di indicatori fecali: coliformi termotolleranti, coliformi fecali, Escherichia coli, streptococchi fecali. (Tabella 2)

Tabella 2. Relazioni tra contaminazione virale e batterica di 5 affluenti della sponda piemontese del Lago Maggiore

FIUME	CPE * N° / TOT	CBT 37	CT 41	CF	Ec	SF
VEVERA	1 / 7	10 ⁴ -10 ⁵				
ERNO	1 / 7	10 ³ -10 ⁴				
STRONA	1 / 7	10 ³ -10 ⁴				
S.BERNARDINO	1 / 7	10 ⁴ -10 ⁵				
S.GIOVANNI	1 / 7	10 ⁴ -10 ⁵	10 ³ -10 ⁴			

* CAMPIONI CON EFFETTO CITOPATICO PRESENTE / n° CAMPIONI ESAMINATI

CBT 37 = Carica batterica a 37°C

CT = Coliformi totali a 41°C

CF = Coliformi fecali

Ec = Escherichia coli

SF = Streptococchi fecali

Questo primo approccio ci indusse ad affrontare il problema della balneabilità delle acque del lago, inserendoci nei controlli batteriologici che vengono effettuati ogni anno da aprile a settembre.

Nel 1991 vennero effettuati 30 prelievi, ma non fu possibile ricavarne alcun dato per l'elevatissima tossicità che i campioni dimostrarono, tanto da provocare il distacco e la distruzione del tappeto cellulare, ancora in fase di contatto (entro 60-120 minuti).

L'ISS confermò l'osservazione su alcuni dei campioni in oggetto; tuttavia non venne identificata la causa, anche se, essendosi intensificato il fenomeno nella stagione più calda, si è ipotizzato che potessero essere coinvolte tossine algali. Le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua nel momento di maggiore tossicità denunciavano aumento della temperatura e del pH. Non fu osservato alcun inconveniente per quanto concerne le determinazioni batteriologiche, che consentirono di verificare la maggior concentrazione di esiti sfavorevoli appunto nei mesi più caldi. (Tabella 3)

Tabella 3. Lago Maggiore - acque di balneazione: percentuale esiti sfavorevoli e mese in cui si sono manifestati

Comune	USSL	Località	%campioni sfavorevoli	Mesi campioni sfavorevoli
Castelletto Ticino	Arona	Cicognola	58.33	apr, mag, giu
Dormelletto	Arona	La Rotta	50	mag, giu, lug
Dormelletto	Arona	Campeggio Smeraldo	0.00	
Arona	Arona	Lido Nautica	16.67	giu, lug
Arona	Arona	Lido Rocchette	16.67	giu, lug

Fu deciso di ripetere i prelievi ed i relativi controlli nella stagione 1992. Anche dal punto di vista metodologico l'attività ha subito un'evoluzione diversa dalla precedente: infatti inizialmente si era partiti utilizzando per la filtrazione di 10 litri di acqua cartucce Balston 100-12C, trattate con resina epossidica e caricate negativamente. L'eluizione veniva effettuata con estratto di carne in soluzione alcalina, giungendo attraverso acidificazione dell'eluato, centrifugazione e risospensione del precipitato in tampone fosfato (pH 7.2) al materiale usato per la semina.

Con il metodo qui sommariamente descritto venne effettuato il primo lavoro sui fiumi, ma la difficoltà dell'impiego dell'estratto di carne altamente schiumogeno, ci indusse a ricorrere ad un diverso sistema di eluizione che utilizza una soluzione a pH 9 ottenuta con urea (1.5M), arginina (0.5M), e fosfato acido di sodio (0.2M). La risospensione del pellet da precipitazione con $MgCl_2 \times 6H_2O$ (1M) e centrifugazione a 3000 rpm per 15 min, è stata effettuata con tampone Mc Ilvaines (acido citrico + fosfato di sodio) a pH5. Il pH del campione è stato portato alla neutralità, quando necessario, con bicarbonato di sodio 8.8% .(3)

Questa procedura, applicata a campioni sperimentali fornì ottimi risultati per maneggevolezza e capacità di recupero di cariche contaminanti (circa il 100%). Essa venne successivamente impiegata in campo per i campioni della balneazione 1991 che, per le ragioni citate, non condussero tuttavia ad alcun risultato concreto.

Successivamente, accogliendo l'invito dell'ISS si decise di uniformarsi il più possibile alla metodica da esso proposta con il cui impiego è stata condotta la ricerca 1992, sempre su campioni di acque di balneazione, di cui vengono successivamente riferiti modalità e risultati.

Materiali e metodi

Lo studio è stato effettuato su acque di balneazione prelevate a fronte delle spiagge di Arona e del Ticino emissario, là dove esso esce dal lago. Si tratta di una zona lacustre molto frequentata anche per l'esistenza di numerosi campeggi che, nella stagione estiva, accolgono molti turisti italiani e stranieri. Ci è sembrato interessante indagare le caratteristiche delle acque di questa parte del lago perchè esso qui si restringe notevolmente, in particolare nella zona di Cicognola, dove la sporgenza dell'antistante penisola di S. Anna crea una struttura che immette in un bacino di piccole dimensioni, da cui esce il Ticino. (Figura 1)

La situazione del Ticino emissario, per la sua caratteristica di effluente, è da considerarsi come lo specchio della qualità delle acque del tratto terminale del bacino lacustre. Esso ripete, sia pure in senso peggiorativo, il quadro presentato dalle acque della stazione di Arona ed è ovvio che ciò accada perchè nell'ultimo tratto del lago, precedente l'uscita del fiume, quando il corpo idrico progressivamente si restringe e perde di profondità, è presumibile che sversino ancora liquami provenienti da modesti insediamenti civili (Lisanza, S. Anna), insistenti sulla sponda lombarda.

I prelievi sono stati eseguiti con cadenza quindicinale, da aprile a settembre, dai vigili sanitari della USSL di Arona per un totale di 36 campioni.

Il volume di acqua prelevato ammontava a 10 litri; la consegna al laboratorio è avvenuta a qualche ora di distanza (2-3) dal prelievo medesimo. Alla consegna dei campioni, gli addetti provvedevano a rifornirsi dei contenitori (in polipropilene) sterilizzati ad hoc per i successivi prelievi. Nella stessa mattinata in cui i campioni erano stati prelevati si è proceduto direttamente alla concentrazione mediante filtrazione su membrane elettropositive Virosorb di 142 mm di diametro (AMF/CUNO Division Meriderm - USA).

L'eluizione è stata effettuata utilizzando 40 ml di estratto di carne al 3% a pH9 fatto ricircolare tre volte attraverso i filtri, riportando di volta in volta il pH a 9 con NaOH o HCl 1N. Il concentrato è stato neutralizzato e sottoposto a decontaminazione con cloroformio.

Risultati

Nella tabella 4 vengono indicati i risultati ottenuti dai campioni di acque di balneazione esaminati nella stagione 1992 dopo la prima semina su colture cellulari.

Tabella 4. Risultati ottenuti dopo la prima semina su colture cellulari

Totale campioni	Positivi	Negativi	Contaminati
36	15	14	7

I 7 campioni contaminati sono stati nuovamente trattati con cloroformio, decontaminati per tre ore a 37°C con miscela antibiotica e riseminati su colture cellulari: 2 campioni sono risultati negativi e 5 ancora contaminati.

Nella tabella 4a vengono riassunti i risultati ottenuti al secondo passaggio su colture cellulari dei campioni positivi al primo mentre nella tabella 4b quelli dei campioni negativi

Tabella 4a. Risultati ottenuti al secondo passaggio, dei campioni positivi al primo

positivi 1° passaggio	Positivi	Negativi	Contaminati
15	5	10	--

Tabella 4b. Risultati ottenuti dal passaggio cieco, dei campioni negativi al primo

negativi 1° passaggio	Positivi	Negativi	Contaminati
16	3	13	--

I tre campioni risultati positivi al passaggio cieco non si sono riconfermati e vengono pertanto considerati negativi.

Discussione

Prima di procedere alla valutazione dei dati emersi dal lavoro sembra opportuno soffermarsi su alcuni problemi di ordine metodologico.

Si è detto che si è cercato di attenersi il più possibile al protocollo proposto dall'ISS, anche se l'aderenza non è stata assoluta. Anzitutto le nostre colture sono costituite da monostrati cellulari di cellule Vero anziché BGM: solo nel corso della stagione balneare abbiamo avuto la disponibilità di queste ultime cellule ma si è ritenuto opportuno proseguire con l'impiego del medesimo substrato.

Un punto problematico della metodica è rappresentato dalla decontaminazione; infatti l'aggiunta di cloroformio in ragione di 1/10 del volume del campione non ci ha consentito praticamente mai di ottenere la sterilità (verifica mediante semina su tioglicolato). Anche l'aumento della percentuale di cloroformio dal 10 al 30%, come indicato da Block e Schwartzbrod (4), non è riuscita sempre a decontaminare il campione, per cui si è deciso di aggiungere nel terreno la miscela di antibiotici prevista dal protocollo, ma non impiegata abitualmente fino a quel momento per l'allestimento delle nostre colture.

Operando in tal modo si è limitato il numero e l'entità delle contaminazioni che si è tentato di controllare senza successo con il cambio del terreno antibiotato.

Un altro aspetto metodologico che non figura nel protocollo, ma che siamo stati costretti ad introdurre, ricordando l'esperienza dell'anno precedente è relativo alla tossicità. Infatti onde evitare sprechi di materiale abbiamo operato come segue: terminata la fase di decontaminazione, il campione veniva posto a -80°C dopo prelievo di una aliquota di 1 ml messa a contatto per 2 ore con il monostrato cellulare adeso a fiaschette di 25 cm^2 ; in parallelo 0.5 ml erano inoculati in tioglicolato.

L'incubazione successiva effettuata a 37°C e l'osservazione delle cellule e dei tubi di tioglicolato fornivano garanzia dell'assenza di tossicità e di contaminazione.

Solo a questo punto si procedeva all'inoculo vero e proprio di 10 ml di campione su fiasche da 75 cm^2 .

I risultati sono stati considerati criticamente in funzione di:

- 1) frequenza di osservazioni positive - sensibilità del metodo
- 2) collocazione cronologica
- 3) provenienza geografica
- 4) caratteristiche organolettiche, chimiche e fisiche, batteriologiche
- 5) aspetti qualitativi della contaminazione virale
- 6) ricadute pratiche sulla definizione di balneabilità

1) Il numero di campioni risultati positivi al 1° passaggio rappresenta circa 40% (15/36) di quelli esaminati. Solo una parte di essi si è finora riconfermata al secondo (30%).

A fronte del numero contenuto di risultati positivi è stata effettuata una verifica della sensibilità del metodo per risolvere il dubbio circa l'impossibilità di evidenziare cariche virali.

Si è pertanto proceduto ad un prelievo di acqua superficiale che al momento del prelievo è stata contaminata con virus Polio 1 in quantità rispettivamente di 46 e 4600 ID₅₀ in 10 litri.

I campioni così allestiti hanno subito tutti i passaggi cui erano soggetti i prelievi delle balneazioni, fino alla semina.

In tutte le fiasche è stato osservato effetto citopatico intenso, a rapida comparsa con distruzione completa del substrato cellulare dopo 48 ore di incubazione. L'effetto si è confermato al 2° passaggio.

Il limite di sensibilità del metodo da noi osservato corrisponde pertanto a 4.6 ID₅₀/litro, per cui la negatività dei campioni sembra rispecchiare con buona probabilità, la realtà della situazione.

I campioni positivi che si sono riconfermati hanno manifestato la comparsa di un evidente effetto citopatico dopo 6 - 8 giorni e nello stesso arco di tempo è comparsa la positività del 2° passaggio.

5 campioni risultati positivi al 1° passaggio, in quarta giornata non si sono riconfermati. Questi campioni erano stati prelevati subito dopo 48 ore di fenomeni temporaleschi; potrebbe essere formulata l'ipotesi di una tossicità tardiva dell'acqua, dipendente forse da rimescolamento; 2 dei campioni in oggetto presentavano particolato in sospensione.

Un campione positivo tardivamente (11 giorni) al 1° passaggio non si è riconfermato; ci è difficile darne una interpretazione.

Dei campioni negativi al 1° passaggio, 3 sono risultati positivi al passaggio cieco dopo circa 7 giorni; questi tre campioni inoculati su nuove colture cellulari, si sono confermati negativi.

5 campioni sono risultati persistentemente contaminati nonostante ripetuti trattamenti.

2) I campioni positivi sono distribuiti sull'intero arco della stagione, da aprile a luglio. Non sembrerebbe pertanto esistere una relazione con la temperatura esterna.

3) 3 dei 5 campioni positivi sono stati prelevati in località Castelletto Cicognola che si trova nel punto più stretto del lago, in corrispondenza dell'uscita del Ticino emissario. In questa località sono presenti spiagge e campeggi con piscina. Il reperto sembra confermare l'ipotesi inizialmente formulata.

Per i campioni di Arona (Nautica e Rocchette), escludendo le ipotesi che si potrebbero fare in relazione al depuratore che serve la città (situato a sud rispetto ai suddetti punti), si potrebbe pensare alla presenza di scarichi non censiti che sfuggono a qualsiasi tipo di controllo.

Tra l'altro è noto che in caso di precipitazioni abbondanti il depuratore della città di Arona scarica direttamente a lago l'acqua che si raccoglie nelle vasche di compensazione, senza procedere al loro trattamento.

Gli stessi campioni non sono molto distanti dalla foce del Vevera, affluente risultato ripetutamente positivo nei controlli effettuati nel 1990, 1991 e 1992.

4) Per quanto riguarda i caratteri organolettici, le acque dei prelievi in questione erano limpide, con pH intorno alla neutralità e dal punto di vista batteriologico erano giudicate idonee alla balneazione.

5) Secondo il protocollo dell'ISS non è prevista una identificazione, sia pure preliminare, dei virus isolati, da parte dei singoli centri. Ci sembra opportuno proporre alla discussione l'eventuale rilievo di alcuni parametri orientativi (dimensioni, resistenza all'etere, individuazione RNA).

6) Un altro aspetto da dibattere sembra essere quello relativo alle ricadute della presenza di virus sulla definizione della balneabilità delle acque.

Finora infatti non è stata data da parte nostra alcuna comunicazione formale dei risultati, anche se la normativa vigente afferma che nelle acque di balneazione non debbono essere presenti Enterovirus (5).

Questo modo di procedere è determinato anzitutto dalla mancanza di disposizioni circa la ricaduta della comunicazione di contaminazione da Enterovirus, che determinerebbe la revoca o la concessione del permesso di balneazione.

Tenendo presente la normativa in atto relativamente agli aspetti batteriologici, esso potrebbe essere nuovamente ripristinato solo dopo ricontrollo della situazione che, per forza di cose, non potrebbe condurre tempestivamente a disporre dei risultati, anche se liberatori.

Infatti, questo modo di procedere applicato ai virus, comporterebbe almeno un mese di ritardo, tenendo conto del tempo necessario per portare a termine le semine su tappeto cellulare, con l'eventuale conferma dei positivi.

Un'altra ragione che ha determinato la mancanza di comunicazione ufficiale è rappresentata dalla carenza di identificazione, sia pure presuntiva.

Il disposto legislativo parla infatti di Enterovirus e pertanto nessuna posizione ufficiale deve essere presa fino alla identificazione certa.

Al di là di questa affermazione, altri virus, per esempio Adenovirus, non potrebbero essere altrettanto dannosi alla salute? la risposta può emergere da una proficua discussione che si ponga anche in termini propositivi.

Conclusioni

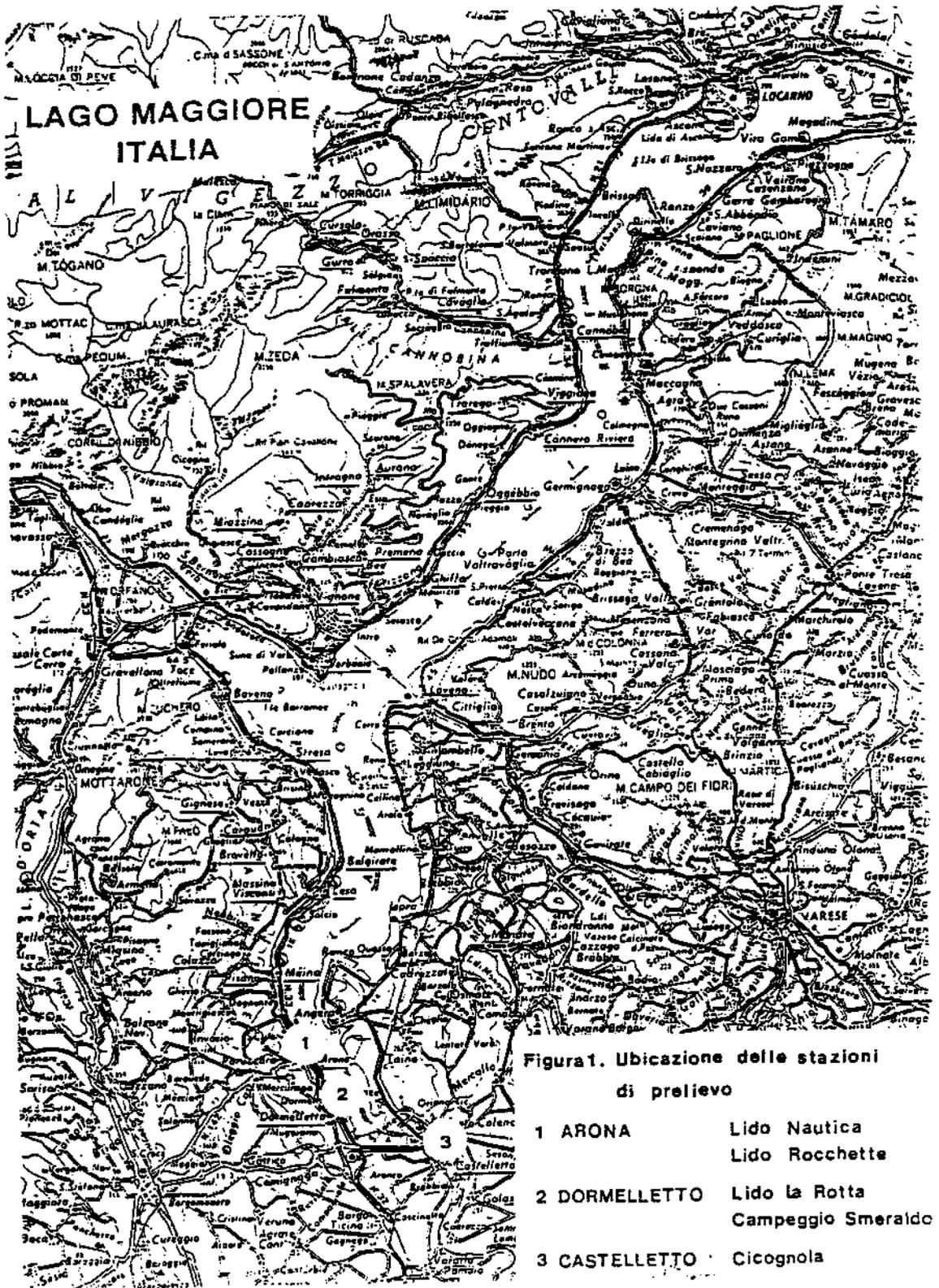
Nel corso della stagione balneare 1992, a fronte di 36 prelievi effettuati nelle acque della parte meridionale del Lago Maggiore, sono stati individuati 5 campioni positivi per virus.

Di questi, la maggior parte proveniva dalla zona terminale del lago che, secondo l'ipotesi iniziale ci si aspettava soggetta a maggiore contaminazione e gli altri erano stati prelevati dalla zona antistante la città di Arona e forse potevano aver risentito dell'influsso di due affluenti del lago che sfociano nei pressi.

Dal punto di vista batteriologico questi stessi campioni erano stati giudicati idonei alla balneazione.

Bibliografia

1. BALARAJAN,R., SONIRALEIGH,V., YUEN,P., WHEELER,D., MACHIN, D., Cartwright R. 1992. Rischi per la salute connessi con il bagno in acqua di mare. Br Med J. Ed. Italiana. 16: 197-198.
2. Direttiva CEE n.76/160 dell'8 Dic.1975 concernente la qualità delle acque di balneazione. Gazzetta ufficiale della Comunità Europea 5 Feb.1976 (L31/1)
3. JOTHIKUMAR,N., DWARKADAS,A., KHANNA,P. 1990. A simple elution and reconcentration technique for viruses concentrated on the membrane filters from drinking water samples. Wat. Res. 24 (3) :367-372.
4. BLOCK,J.C., SCHWARTZBROD,L. 1988. Decontamination of the samples. In : "Viruses in Water Systems". Cap.8: 33-49. VCH Publishers, Inc.(Ed.). New York, New York.
5. Decreto legge N° 155 del 14.5.1988 - Gazzetta Ufficiale N°113 del 16.5.1988 in attuazione della Direttiva CEE N° 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione



VIRUS ENTERICI RICERCATI NELLE ACQUE DI BALNEAZIONE DEL LITORALE ROMAGNOLO: CAMPAGNE DI MONITORAGGIO

G.BUCCI

Presidio Multizonale di Prevenzione - U.S.L. 31 - Ferrara

Introduzione

Il programma conoscitivo volto a raccogliere dati sulla presenza di virus nelle acque di balneazione è iniziato presso il P.M.P. di Ferrara in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità nel 1989 ed è proseguito negli anni 90-91 e 92 (AULICINO F.A.. 1991.). Negli anni 1989 e 90 sono stati campionati 8 punti scelti tra le stazioni della normale rete di monitoraggio delle acque di balneazione previsti dalla Regione Emilia Romagna sulla base delle disposizioni contenute nel DPR 470/82. I prelievi sono stati effettuati a cura dei S.I.P. delle UU.SS.LL. 33,35,40,41. Nei successivi anni 91 e 92 i punti di prelievo sono stati ridotti a 4 ed i prelievi sono stati tutti effettuati dal S.I.P. dell'USL 33, con frequenza mensile, nel periodo Aprile-Settembre. Ciscun punto è stato campionato 6 volte nel 1989 e 90 per un totale di 64 prelievi, 6 volte nel 91-92 per un totale di 48 prelievi.

Materiali e metodi

Ogni campione era costituito da 15 litri di acqua; di questi 10 sono stati utilizzati per la ricerca dei virus, sui rimanenti 5 litri sono stati ricercati altri parametri accessori, non previsti dal DPR 470/82, quali Pseudomonas, Vibrioni, Miceti e Batteriofagi.

La metodica seguita per la concentrazione del campione è quella consigliata dall'I.S.S. che prevede l'impiego della filtrazione su membrane elettropositive, e successiva eluizione con estratto di carne al 3% pH 9,5. L'eluato così ottenuto è stato trattato con antibiotici e inoculato su linee cellulari BGM ed Hep2. Le cellule sono state osservate giornalmente al microscopio ottico per 10-12 giorni con sostituzione del terreno di mantenimento ogni 4 giorni. Trascorso il periodo di osservazione i monostrati cellulari sono stati congelati e scongelati per 3 volte e successivamente una aliquota del lisato cellulare è stata reinoculata sulle stesse linee cellulari. Con questa tecnica sono stati eseguiti 3 passaggi. Si sono considerati negativi i campioni che, al terzo passaggio, non hanno evidenziato effetto citopatico (Tabelle 1 e 2).

I rimanenti parametri microbiologici sono stati ricercati con le metodiche previste nel DPR 470/82 oppure con le metodiche di routine.

Per la ricerca dei batteriofagi ci si è attenuti alle metodiche consigliate dall'I.S.S..

Risultati e conclusioni

Sono stati esaminati complessivamente n. 24 campioni di acqua di mare nei quali abbiamo riscontrato presenza di virus solo in 8 aliquote, tutte comprese nell'anno 1989. Tutti i campionamenti effettuati nel corso del 1990, 91 e 92 non hanno mai dato risultati positivi per la presenza di virus.

I lisati ottenuti sono stati inviati all'Istituto Superiore di Sanità che ci ha confermato la presenza di virus solo in 2 campioni (tabella n. 3). Uno di questi campioni è stato da noi confermato anche con la microscopia elettronica.

Nelle Tabelle 4-5-6-7 abbiamo riportato i valori massimi e minimi da noi riscontrati per Coli totali, Coli fecali, Streptococchi fecali, Batteriofagi. Sono anche indicati il numero dei campioni positivi per Vibrioni e Virus.

Nel 1989 la ricerca è stata eseguita indipendentemente dalle condizioni del mare ed i valori massimi per C.totali, C.fecali e Streptococchi fecali previsti dal DPR 470/82 sono stati superati 3 volte per ciascun parametro.

Nel 1990,91,92 i prelievi sono stati sempre eseguiti nelle condizioni metereologiche previste dal DPR 470/82 e nessuno dei parametri sopra riportati ha mai superato i limiti indicati.

Allo stesso modo la ricerca di Batteriofagi ha rilevato livelli molto alti (con un massimo di 2936 unità formanti placca) in 4 campionamenti contemporaneamente ai massimi valori riscontrati per Coli e Streptococchi, mentre nel 1990 solo 2 campioni hanno superato le 150 U.F.P. e nel 1991-92 nessun campionamento ha mai superato le 100 U.F.P.. La presenza di Vibrioni è costante, variabile dal 15 al 50% dei campioni. La notevole diversità di risultati ottenuti nel 1989 rispetto agli anni successivi ci ha convinti della opportunità di operare nelle prossime stagioni inserendo nei futuri campionamenti anche i sedimenti superficiali del fondo del mare. (CHALAPATI RAO V.. 1986. GERBA C.P.. 1979. SAGAR M.G.. 1984. SHUVAL H.I.. 1988. VIVIAN C.M.G.. 1986.). Infatti una assai cospicua differenza di positività è stata segnalata da diversi autori che hanno avuto modo di studiare sia l'acqua che i sedimenti del mare (BIRCH.. C. 1989. BERGH O.. 1989. BRATBAK G.. 1990. MELNICK J.L.. 1978. O.M.S.. 1979.).

Bibliografia

1) AULICINO F.A., PATTI A.M., MUSCILLO M. et al.. 1991. Viruses in marine waters. L'Igiene Moderna 96: 583-592.

2) BIRCH C., GUST I.. 1989. Sewage pollution of marine waters: the risks of viral infection. The med. j. of Australia. 151: 609-610.

- 3) BERGH O., BORSHEIM K.Y., BRATBAK G., HELDAL M.. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature. 340: 467-468.
- 4) BRATBAK G., HELDAL M., NORLAND S., THINGSTAD T.F.. 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. Applied and environ. microb. 56: 1400-1405.
- 5) MELNICK J.L., GERBA C.P., WALLIS C.. 1978. Viruses in water. Bull. W.H.O. 56: 499.
- 6) O.M.S.. 1979. Rapport technique n.639.
- 7) CHALAPATI RAO V., METCALF T.G., MELNICK J.L.. 1986. Human viruses in sediments, sludges, and soils. Bull. W.H.O. 64: 1-14.
- 8) GERBA C.P.. 1979. Da Methodology for biomass determination and microbial activities in sediments. Ed. American Society for Testing and Materials. 64-74
- 9) SAGAR M.G., WILLARD N.A., O'MALLEY M.L., LEAR D.W.. 1984. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle atlantic region. Appl. and environ. microbiol. 48: 758-763.
- 10) SHUVAL H.I.. 1988. The trasmission of virus disease by the marine environment. Schriftenreihe des vereins fur wasser, boden, und lufthygiene. 78: 7-23.
- 11) VIVIAN C.M.G.. 1986. tracers of sewage sludge in the marine environment: a review. The science of the total environ. 53: 5-40.

Tabella 1. Tecnica per la concentrazione di campioni di acqua con membrane elettropositive.

CONCENTRAZIONE CON MEMBRANE ELETTROPOSITIVE

Campione di 10 l di acqua di mare conservato a 4°C fino all'analisi

Controllo e correzione del pH a 6,5 con HCl 0,1 N

Filtrazione sotto pressione positiva di azoto su due membrane elettropositive

Eluizione con 25 ml di estratto di carne al 3% pH 9,5

Due passaggi a pressione normale dell'eluato attraverso set di filtri mantenendo il pH a 9,5

Neutralizzazione del pH e trattamento con miscela di antibiotici 1 h a T ambiente

Centrifugazione a 2000 rpm per 30 minuti

Tabella 2. Tecnica per l'isolamento di virus su colture cellulari.

ISOLAMENTO VIRALE SU COLTURE CELLULARI

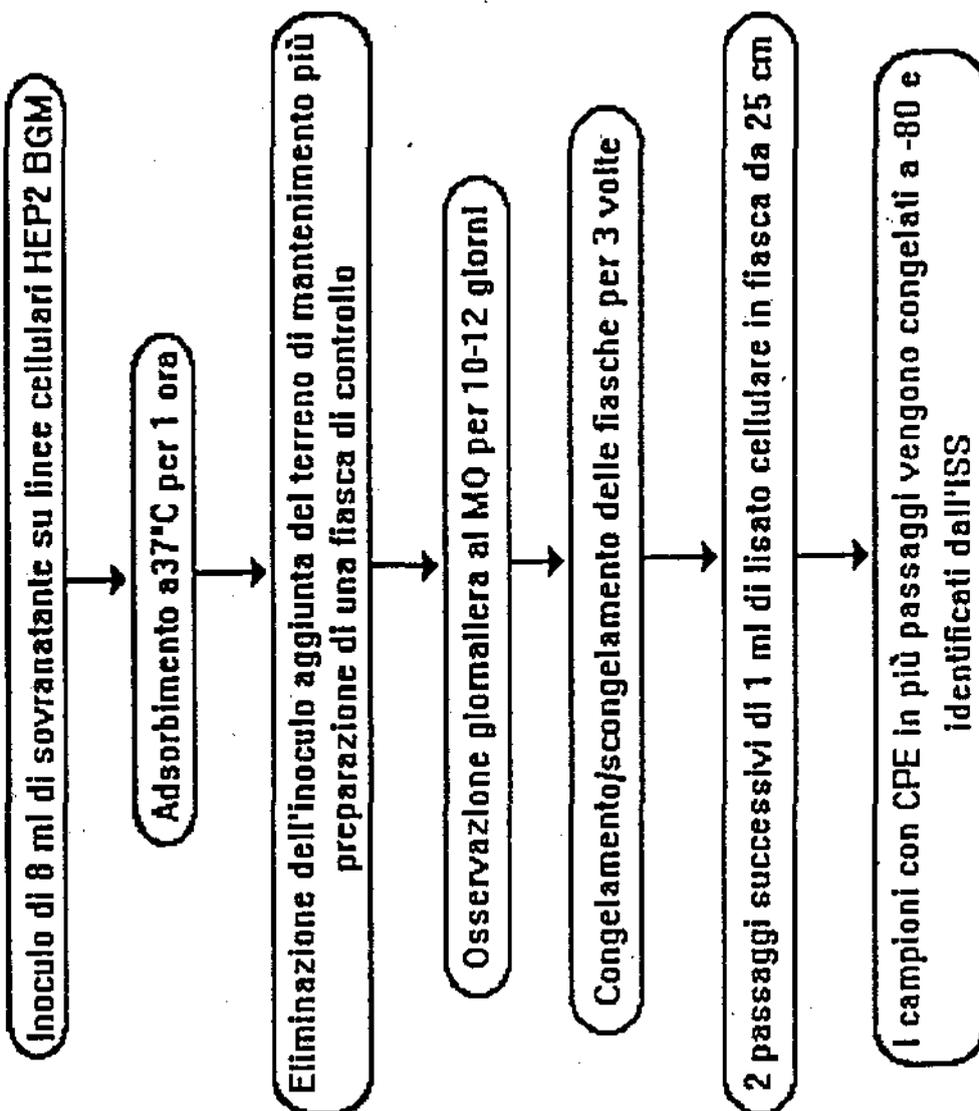


Tabella 3. Campioni positivi per virus secondo il P.M.P. di Ferrara e confermati o meno dall'I.S.S...

CAMPIONI POSITIVI

DATA	PUNTO-USL	Hep 2	BGM	ISS
25/5/89	17 - 35	pos	neg	non confermato
29/5/89	54 - 40	pos	neg	non confermato
29/5/89	63 - 40	pos	neg	non confermato
26/6/89	63 - 40	pos	neg	non confermato
3/7/89	66 - 41	pos	pos	confermato *
3/7/89	76 - 41	pos	neg	non confermato
13/7/89	3 - 33	pos	neg	confermato
8/8/89	8 - 33	pos	neg	non confermato

* Campione confermato con microscopia elettronica

Tabella 4. Risultati dei campionamenti eseguiti nel 1989.

ANNO 1989

punto camp.	range coli tot.	range coli fec.	range strepto.	range bat. fagi.	n° pos. vibrio	n° pos. entero	N° cam
3/USL 33	< 2 - 30	< 2 - 2	< 2 - 6	2 - 68	2	*1	4
8/USL 33	2 - 8	< 2 - 2	< 2	< 2	2	1	4
17/USL 35	< 2 - 6	< 2 - 2	< 2 - 2	< 2 - 5	1	1	4
33/USL 35	< 2	< 2	< 2 - 10	< 2	0	0	4
54/USL 40	< 2 - 300	< 2 - 20	< 2 - 10	< 2 - 208	3	1	4
63/USL 40	< 2 - 25000	< 2 - 8000	< 2 - 2000	< 2 - 623	1	2	4
66/USL 41	10 - 6000	4 - 4000	< 2 - 600	2 - 1266	1	#*1	4
76/USL 41	10 - 6000	6 - 4000	2 - 320	12 - 2936	0	1	4

* Campioni positivi confermati dall'ISS

Campione confermato alla microscopia elettronica

Tabella 5. Risultati dei campionamenti eseguiti nel 1990.

ANNO 1990

punto camp.	range coli tot.	range coli fec.	range strepto.	range bat.fagi	n°pos. vibrio	N°pos. entero	No Cam.
3 / USL 33	< 2 - 76	< 2 - 6	< 2	< 2 - 10	3	0	4
8 / USL 33	< 2 - 4	< 2	< 2	< 2 - 12	3	0	4
17 / USL 35	< 2 - 4	< 2 - 2	< 2	< 2 - 14	1	0	4
33 / USL 35	< 2	< 2	< 2	< 2 - 10	1	0	4
54 / USL 40	8 - 700	< 2 - 200	< 2 - 8	< 2 - 344	2	0	4
63 / USL 40	< 2 - 2	< 2	< 2	< 2	2	0	4
66 / USL 41	< 2 - 10	< 2 - 4	< 2 - 16	< 2 - 6	1	0	4
76 / USL 41	< 2 - 100	< 2 - 22	< 2 - 6	< 2 - 184	3	0	4

Tabella 6. Risultati dei campionamenti eseguiti nel 1991.

ANNO 1991

punto camp.	range coli tot.	range coli fec.	range strepto.	range bat.fagi	n°pos. vibrio	n°pos. entero	n° cam.
3 / USL 33	10 - 500	< 2 - 96	< 2 - 4	10 - 80	1	0	6
6 / USL 33	< 2 - 200	< 2 - 40	< 2 - 17	< 2 - 44	2	0	6
11 / USL 33	< 2 - 130	< 2 - 13	< 2 - 7	< 2 - 56	1	0	6
16 / USL 33	< 10 - 320	2 - 25	< 2	< 2 - 46	4	0	6

Tabella 7. Risultati dei campionamenti eseguiti nel 1992.

ANNO 1992

punto camp.	range coli tot.	range coli fec.	range strepto.	range bat.fagi	n°pos. vibrio	n° entero	n° cam.
3 / USL 33	< 10 - 510	0 - 30	0 - 9	< 2 - 52	1	0	6
6 / USL 33	< 10 - 40	0 - 4	0 - 1	< 2 - 28	6	0	6
11 / USL 33	< 10 - 120	0 - 4	0 - 5	< 2 - 18	3	0	6
16 / USL 33	< 10 - 1900	0 - 80	0 - 14	< 2 - 50	2	0	6

METODI DI RILEVAMENTO DI VIRUS ENTERICI NELLE ACQUE DI MARE: ESPERIENZE MATURATE

F.A. AULICINO, Istituto Superiore di Sanità, Roma

1. Il significato della presenza di virus enterici nelle acque di mare.

E' noto che i virus escreti con le feci e presenti nei liquami depurati e non e nei fanghi di impianti di depurazione di liquami domestici si possono ritrovare nell'ambiente marino, quando questo tipo di rifiuti viene scaricato in esso.

Una volta che le particelle si ritrovano in questo ambiente per un effetto di diluizione si riducono di numero. La tabella 1 mostra come, nelle acque marine, i numeri delle particelle virali sono molto bassi se si paragonano a quelli mediamente rilevati nei corpi idrici ad esse afferenti.

Tabella 1. Virus enterici enumerati in diversi tipi di campioni

CAMPIONE	VIRUS
Feci	fino a $10^{10}/g$
Liquami	$1 - 10^4$ (fino a 10^6)/L
Fiumi e laghi	$0,1 - 10^2/L$
Mare	$0,01 - 10$ (fino a 10^2)/L

La riduzione dei virus nell'ambiente marino è imputabile oltre all'effetto della diluizione anche all'azione di "fattori inattivanti". Tra i fattori inattivanti esplicano attività antivirale: la salinità, la temperatura, la luce solare, sostanze tossiche, come i metalli pesanti e l'antagonismo microbico. L'inattivazione virale esplicata da questi "fattori" ha un denominatore comune: danneggiamento del capsido e/o degli acidi nucleici con conseguente inibizione del virus ad attaccarsi alle cellule e ad attuare la trascrizione tramite la quale si riproduce nelle cellule ospiti (1,2). La luce esplica questi effetti sulle proteine del capsido e sugli acidi nucleici a lunghezze d'onda più basse di 370 nm (2). Alcuni ossidanti possono essere formati fotochimicamente nell'acqua marina e molecole naturali come lignine e acidi umici possono agire da fotosensibilizzatori. Aumenti di temperatura inducono aumenti dell'ossigeno disciolto

nelle acque, per cui si verificano incrementi dei fenomeni di ossidazione a carico dei virus con conseguenti decrementi (3). I metalli pesanti sono tossici per i virus. Ad esempio, il decremento dell'attività antivirale di campioni di acqua di mare autoclavata è, probabilmente, una conseguenza della formazione di un precipitato di aragonite, che elimina i metalli in tracce presenti nei campioni (4). L'antagonismo microbico, noto come effetto MAVA (Microbial AntiViral Activity) è esplicato da batteri ed alghe che agiscono contro i virus per effetto dei loro enzimi proteolitici. Incrementi della luce, della temperatura e dell'ossigeno disciolto sono direttamente correlati con l'attivazione della microfauna (batteri ed alghe) e quindi dei prodotti di essi, che poi agiscono direttamente sui virus (2,4,5).

Nonostante l'ambiente marino attui nei confronti dei virus azioni tendenti a ridurre il numero, ed in parte ci riesca, è nota e dimostrata la notevole persistenza e la diffusione secondaria, anche a lunghe distanze, delle particelle virali in questo ambiente. I numerosi studi sulla sopravvivenza dei virus nell'ambiente marino, condotti in laboratorio riportano tempi di sopravvivenza variabili tra 2 e 130 giorni ed in ogni caso superiori a quelli dei coliformi e degli streptococchi (6,7).

I virus una volta giunti nell'ambiente marino vanno incontro a due particolari fenomeni, che hanno la maggiore responsabilità nella persistenza e diffusione di questi microrganismi: l'aggregazione e l'adsorbimento.

Già nelle cellule ospiti essi si trovano in forma di aggregati pseudocristallini e anche dopo la lisi cellulare gli aggregati tendono a rimanere parzialmente uniti. Dopo trattamenti con il freon è stato dimostrato come il 5% della popolazione virale si aggrega in "clumps" costituiti da 2 a 10 unità (2,8). I virus formano aggregati anche nelle acque, per cui una riduzione del loro numero in questo ambiente è solo apparente e può essere scambiata per inattivazione (9). I "clumps" sono reversibili ed influenzati dal pH e dalla salinità. Gli effetti del pH si traducono in cambiamenti nella configurazione delle proteine del capsido. Si suppone che nelle acque che ricevono i virus avvengano costantemente fenomeni di aggregazione e disaggregazione.

La presenza nelle acque di particelle virali sotto forma di aggregati ha importanti conseguenze. L'aggregazione garantisce a questi microrganismi una maggiore resistenza alle condizioni ambientali avverse. E' ampiamente riportata l'impossibilità di inattivare con il cloro virus aggregati: quando sono assemblati essi possono sopravvivere a trattamenti con biocidi e provocare aberrazioni nelle curve di inattivazione. Inoltre, quando i virus sono in forma di aggregati la qualità dell'acqua risulta piuttosto eterogenea e si può verificare che campioni raccolti nello stesso punto di prelievo a distanza di poco tempo mostrino quantità di virus estremamente variabili. Alcuni Autori hanno rilevato che in diversi campioni di acque di fiume prelevati nello stesso sito, a distanza di qualche minuto gli uni dagli altri, i numeri dei virus presenti variavano notevolmente, essendo stati evidenziati valori minimi e massimi rispettivamente di 0 e 283 UFP/L (10).

I virus sono biocolloidi con cariche elettronegative e un grande potenziale di adsorbimento nei confronti di qualunque tipo di materiale particolato (organico ed inorganico).

Una volta scaricati nell'ambiente marino essi tendono spontaneamente ad adsorbirsi a materiale particolato ed a sedimenti (11). I fenomeni di adsorbimento

risultano preponderanti nei confronti di particelle argillose, silicati, batteri, cellule algali e particolato organico (12). Le molecole organiche aumentano la sopravvivenza dei virus nelle acque estuariali e nei sedimenti, probabilmente perchè li "avvolgono" e/o adsorbono e rendono inefficaci i fattori e le sostanze inattivanti (2,4). Goyal ha isolato enterovirus da sedimenti marini in un sito influenzato da scarichi anche dopo 18 mesi che gli scarichi erano stati fermati (13). E' stato verificato che, quando i virus sono adsorbiti a sedimenti di acque pulite, il tasso di inattivazione si riduce di circa 4 volte rispetto a quello riscontrato nell'acqua; in acque contaminate il tasso si riduce di 96 volte (4).

Questi microrganismi riuscendo a sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente marino riescono a percorrere anche lunghe distanze rispetto ai punti di scarico. Enterovirus sono stati rilevati in un canale fino a 13 km dallo scarico (2). Studi condotti su Tanana River (Alaska) hanno rilevato che il 30% dei virus enterici presenti presso uno scarico di origine domestica si ritrovavano dopo circa 7 giorni e a 300 km a valle dello scarico (14). Virus sono stati ritrovati in mare a 200 m dalla spiaggia, ma anche a 5 km (2).

Le particelle virali presenti nei sedimenti possono facilmente essere risospese a seguito di eventi meteorologici (venti, temporali, ecc) oppure per la presenza di correnti ed essere trasportate in altri siti ed essere quindi diffuse, da un punto di scarico, in larghe zone geografiche. Di conseguenza, nessuna fonte di contaminazione può e deve essere considerata insignificante.

E' da più parti riferita la difficoltà nello stabilire quali sono i rischi reali dipendenti dalla presenza di virus negli ambienti acquei e nel caso particolare nell'ambiente marino. E' possibile che questi microrganismi possano essere trasmessi nell'ambito di attività come il nuoto ed altre attività acquatiche di tipo ricreazionale. Alcuni Autori riferiscono su aumenti di casi di gastroenteriti in bagnanti (15,16).

Le prove epidemiologiche di virus enterici umani trasmessi attraverso acque di balneazione sono limitate all'epatite A (17) e ad infezioni da adenovirus associate all'uso di piscine (18). Le acque utilizzate ad uso ricreazionale, in certe condizioni, possono avere un ruolo importante come veicolo per la trasmissione di gastroenteriti virali in ragazzi tra i 4 ed i 15 anni. (19). Virus identificati come coxsackie B5 responsabili di un'epidemia tra gli ospiti di un camping sono stati isolati anche dall'acqua che gli ospiti avevano utilizzato per il nuoto (20).

La dose minima infettante per gli enterovirus è molto bassa: 1-2 Unità Formanti Placca (UFP) (21). Per echovirus 12 la dose minima infettante è di 17 UFP, mentre 1 UFP risulta essere quella associata a rotavirus (21,22,23). Non tutti gli individui che si infettano con enterovirus si ammalano clinicamente, dipendendo la malattia clinica dal tipo e virulenza dei virus, dalla modalità dell'infezione, dallo stato immunitario e dall'età dell'ospite. L'Epatite A, come malattia clinica, ha una frequenza negli adulti variabile dal 75 al 97%, mentre è inferiore al 5% nei bambini. Il contrario avviene per i rotavirus. Per gli enterovirus la frequenza di infezioni sintomatiche va dallo 0,1 al 50%. Il rischio di mortalità per Epatite A è, negli Stati Uniti dello 0,6% (7); per gli enterovirus il rischio varia dallo 0,1% all'1,8% (24).

Sebbene i dati epidemiologici disponibili sembrano indicare che l'acqua, generalmente, non ha un ruolo importante nella trasmissione di malattie virali vi è una

serie di motivi che devono portare a non sottovalutare il significato per la salute pubblica della presenza di virus enterici nelle acque (19). Teoricamente ogni virus escreto con le urine e con le feci e capace di produrre infezione può essere trasmesso attraverso acque non sufficientemente trattate. Questo dipende anche da una serie di fattori tra cui la dose infettiva dell'acqua, la quantità di acqua che si ingerisce, le difese immunitarie dell'individuo. I dati epidemiologici, per vari motivi, tra cui l'esiguo numero degli studi effettuati, la subclinicità delle infezioni, la lunghezza dei periodi di incubazione, la trasmissibilità dell'infezione che può avvenire anche per contatto interumano, non riescono a dare un quadro chiaro e completo del ruolo dell'acqua nella trasmissione di malattie virali. Considerando, però, l'elevata resistenza di questi microrganismi e la loro capacità di percorrere lunghe distanze nonché la bassa dose infettante, se non si può ancora parlare di rischio provato, si deve considerare la loro presenza in ambienti come quello marino con molta attenzione.

L'introduzione della legislazione europea, recepita dall'Italia, dello standard relativo agli enterovirus, che è 0/10 litri di acqua, indica come il problema sia attualmente considerato con attenzione. Lo standard virologico ha la funzione di indicare la presenza di contaminazione virale delle acque, che se presente indica la possibilità di un pericolo diretto per la salute del fruitore delle acque così contaminate. Inoltre lo standard virologico permette di evidenziare fonti di contaminazione anche lontane dal punto di rilevamento dei virus, lontane sia spazialmente che temporalmente. Analisi virali delle acque consentono la individuazione di scarichi fognari sconosciuti o illeciti ed anche di scarichi che funzionano in modo discontinuo e puntuale.

2. Le tecniche per il rilevamento di virus enterici dalle acque di mare.

Le indagini virali per ambienti acquatici marini non sono numerosissime, in dipendenza delle difficoltà di disporre di metodologie di rilevamento capaci di concentrare idoneamente le particelle virali da grandi volumi di campione. Le tecniche attualmente disponibili sono essenzialmente di due tipi: quelle basate sul principio dell'adsorbimento-eluzione e quelle basate sull'ultrafiltrazione tangenziale (Tabella 2).

2.1 Adsorbimento-eluzione

Le tecniche basate sull'adsorbimento-eluzione prevedono l'uso di filtri microporosi, che consentono di processare anche grandi volumi di campione (fino a 100-1.000 L), e l'utilizzo di altri materiali adsorbenti come polielettroliti, argille, ossidi di metalli o fibre di vetro.

Attrazioni elettrostatiche e idrofobiche regolano l'adsorbimento dei virus alle superfici adsorbenti microporose e non. I virus sono biocolloidi e la metodica dell'adsorbimento-eluzione sfrutta la capacità di questi microrganismi di adsorbirsi a substrati caricati (positivamente o negativamente) per effetto di interazioni elettrostatiche e idrofobiche (25). Il capsido virale proteico in soluzioni neutre e nella

maggior parte delle acque naturali è di norma caricato negativamente, per la preponderanza dei gruppi COO^- . Conseguentemente i virus, in queste situazioni, possono facilmente essere adsorbiti a substrati caricati positivamente. Idonei pretrattamenti dei campioni da concentrare rendono, invece, queste particelle capaci di adsorbirsi a substrati carichi negativamente. Tali pretrattamenti prevedono l'acidificazione del campione, per variazione del pH, che deve essere portato a valori inferiori a 5, meglio se intorno a 3,5. In questo caso il capsido proteico mostrerà una preponderanza di cariche positive, per cui una volta a contatto con i substrati con cariche del segno opposto, i virus risulteranno adsorbiti ad essi, per effetto dell'attrazione tra cariche di segno opposto. Quando vengono utilizzate membrane in nitrocellulosa per la concentrazione virale l'aggiunta al campione acidificato di cationi polivalenti come Mg^{++} e Al^{+++} , che viene realizzata introducendo AlCl_3 nel rapporto 1:100 (soluzione 0,15N/campione) o MgCl_2 nel rapporto 1:50 (soluzione 10N/campione), migliora notevolmente l'adsorbimento dei virus (26).

Una volta che si è verificato l'adsorbimento dei virus ai substrati, sia positivi che negativi, occorre applicare procedimenti idonei ad ottenerne il distacco. I processi di eluizione si attuano ponendo a contatto dei materiali adsorbenti soluzioni di composti come: caseina, brodo nutritivo, albumina di siero bovino, agenti caotropici, urea, ecc. Gli eluenti più comuni sono: soluzioni al 3% o al 10% di estratto di carne a pH 9-9,5 o soluzioni tamponate di glicina a pH intorno a 10,5-11 (27).

Nella tabella 2 sono riportati i diversi tipi di membrane microporose o di materiali utilizzati per adsorbire i virus.

2.1.1 Adsorbimento a filtri microporosi

a. Filtri microporosi caricati negativamente.

Metcalf nel 1961 ha introdotto per la prima volta i filtri microporosi caricati negativamente per la concentrazione di virus da sospensioni acquose (28). Successivamente Cliver (29) ha utilizzato le membrane in nitrocellulosa della Millipore. Il metodo dell'adsorbimento-eluzione con questo tipo di filtri fu applicato all'acqua ed ai liquami (30). Successivamente è stata migliorata l'efficienza dell'adsorbimento con l'aggiunta al campione di cationi polivalenti (Al^{+++} ed Mg^{++}). Sono riportati recuperi di virus polio aggiunti artificialmente a campioni di acqua di rubinetto pari all'80%. Il sistema è stato migliorato utilizzando membrane a cartuccia in fibre di vetro o in acetato di cellulosa ed operando prefiltrazioni con membrane a cartuccia in orlon o poliestere, aggiungendo al campione MgCl_2 . Il sistema, commercialmente con il nome di "Aquella virus concentrator" (Carborundum Comp., Niagara Falls, N.Y. USA), prevede l'utilizzo di questi tipi di membrane. Successive modifiche sono state ancora operate per superare problemi di occlusione delle membrane: acidificazione del campione fino a pH 3,5, utilizzo di cartucce in fibra di vetro (K-27)(Carborundum Co.- Lebanon, Ind. USA) e di membrane di fibre di vetro e resine epossidiche e asbesto di 0,65 μm (Cox, serie AA) (Cox Instrument Corp.- Detroit, Mich. USA). Con l'uso di questa metodica sono stati registrati recuperi di polio aggiunto a 378 litri di acqua di rubinetto pari al 77%.

Tabella 2. Membrane microporose ed altri materiali utilizzati per l'adsorbimento e la concentrazione di virus da campioni di acqua.

METODO	MATERIALI UTILIZZATI	COMPOSIZIONE
	Filtri microporosi elettropositivi	Resine con cariche modificate in cellulosa e farine fossili. Resine con cariche modificate in fibra di vetro cellulosa. Resine in nylon 66. Asbesto-cellulosa.
Adsorbimento- Eluizione	Filtri microporosi elettronegativi	Nitrocellulosa. Fibre di vetro epossidiche. Fibre di vetro-asbesto. Copolimeri in acrilonitrile polivinil-cloruro.
	Polielettroliti	Copolimeri di anidride isobutilene-maleica con siti di adsorbimento costituiti da gruppi carbossilici e radicali di ammonio.
	Minerali	Silicato di magnesio idrato (polvere di talco).
	Polvere o fibre di vetro	Colonne di fibre di vetro (caricate negativamente).
	Membrane piatte	Acetato di cellulosa, polisulfone.
Ultrafiltrazione (tangenziale/ortogonale)	Capillari	Polisulfone
	Fibre cave	Gel di alginato di alluminio contenente ioni di lantanio.

Il processo dell'adsorbimento a filtri microporosi può essere inficiato dalla presenza di acidi umici e di altri composti organici che si adsorbono ai filtri insieme ai virus e che tendono a non rilasciare questi ultimi quando viene attuata la fase dell'eluizione. Inoltre queste sostanze possono interferire nei processi di riconcentrazione degli eluati, poichè, in fase di acidificazione dell'eluato si può verificare la flocculazione di questi composti, per cui le membrane utilizzate per la seconda fase

di concentrazione si occludono facilmente. Questi componenti, infine, possono formare precipitati insolubili nel corso dei processi di neutralizzazione degli eluati.

L'introduzione di membrane a cartuccia in fibra di vetro (Filterite-Duo Fine) (Filterite Corp.- Timonium, Md. USA), con una superficie di adsorbimento 280 volte più elevata di quelle "Cox", ha risolto i problemi dell'intasamento. Sono riportati recuperi di poliovirus aggiunto artificialmente ad acqua di mare pari al 53%.

b. Filtri microporosi elettropositivi.

I filtri microporosi caricati positivamente hanno il vantaggio di adsorbire i virus senza che nel campione debbano essere aggiunte sostanze oppure operate modifiche del pH, purchè il pH del campione rientri nel "range" della neutralità. Sono misture di resine in cellulosa e farine fossili a cariche modificate (Zeta Plus S) (CUNO Div.- Md. USA) che a pH 7,5 possono adsorbire più del 99% dei poliovirus presenti in un campione. L'80% dei virus si deadsorbe con piccoli volumi di glicina 0,05M a pH 9,5-10 (2).

Altri tipi di filtri elettropositivi, IMDS Virosorb (CUNO Div.), possono essere utilizzati per la concentrazione di grossi volumi di acqua (31). Per questo tipo di membrane sono riportate percentuali di recupero dal 30 al 75%, fino anche al 90%, utilizzando eluenti a base di estratto di carne, glicina oppure urea. Le percentuali di recupero più basse sono state rilevate per adenovirus e più basse ancora per reovirus (32).

2.1.2 Adsorbimento a polielettroliti.

I polielettroliti sono polimeri, come il PE60, costituiti da anidride isobutilene maleica. L'adsorbimento avviene per legami idrogeno tra virus e gruppi carbossilici e radicali di ammonio, mentre gruppi di ammonio quaternario interagiscono elettrostaticamente con le cariche negative dei virus. L'eluizione dal PE60 avviene con eluenti, che sono soluzioni isotoniche a pH 8-9. L'eluizione è migliorata dall'aggiunta di soluzioni proteiche come il siero di vitello fetale.

2.1.3 Adsorbimento a flocculi di idrossido di alluminio.

Questo metodo può essere utilizzato per la concentrazione di piccole quantità di campioni oppure per la riconcentrazione di eluati di glicina o per la riconcentrazione di eluati torbidi, cioè con materiale organico in sospensione (33). Il metodo consiste nell'indurre, nel campione, la formazione di flocculi di idrossido di alluminio che precipitano con i virus adsorbiti. Questi flocculi devono essere raccolti dopo filtrazione del campione su membrane (dalle membrane stesse) oppure dopo centrifugazione. Si può aggiungere direttamente idrossido di alluminio al campione nel rapporto 1:100 nel caso in cui si disponga di un precipitato preformato preparato portando 100 mL di AlCl_3 0,075N a pH 7,2 con Na_2CO_3 e agitando, centrifugando e recuperando il flocculato che va risospeso in 50 mL di NaCl 0,14N dopo una serie di risospensioni e centrifugazioni. Si può aggiungere MgCl_2 0,9N nel rapporto 1:100 mL di campione,

portando il pH del campione a 6 con NaOH o HCl. Ciò induce la formazione di flocculi di idrossido di alluminio che precipitano. Si opera una successiva centrifugazione o filtrazione per recuperare i flocculi ai quali si aggiunge glicina 1M in siero di vitello fetale a pH 11,5 (1:100 o 1:20 del volume iniziale), centrifugando ancora, recuperando il sovranatante nel quale sono i virus neutralizzandolo. Per la risospensione dei flocculi si può anche aggiungere una soluzione di estratto di carne al 3% a pH 7,4 (1:100 o 1:20 del volume iniziale del campione).

2.1.4 Adsorbimento a polvere di vetro.

La polvere di vetro è utilizzata mettendovi a contatto il campione da concentrare, modificando il pH a 3,5 e aggiungendo cloruro di alluminio 0,005M. Si effettua la successiva eluizione con glicina tamponata 0,0005M finale pH 11,5. Sono registrati recuperi di poliovirus del 55%.

2.2 Ultrafiltrazione

Il sistema di concentrazione della ultrafiltrazione molecolare è basato sul principio per cui il campione è forzato a passare perpendicolarmente o tangenzialmente a membrane particolari, che presentano pori di dimensioni tali da lasciare passare solo sostanze di peso molecolare inferiore ad un certo valore (34,35,36). Scegliendo membrane con opportuna porosità, i virus ed altre macromolecole sono trattenuti sulle membrane (ultrafiltrazione ortogonale), oppure nella porzione di campione che non è passata attraverso le membrane (ultrafiltrazione tangenziale). Le membrane sono generalmente in cellulosa, poliammide o in polisulfone. E' importante nel caso della filtrazione tangenziale, alla fine del processo di concentrazione, attuare il lavaggio ed il controlavaggio delle membrane con una soluzione di estratto di carne o con altri tipi di soluzioni per eluire virus rimasti adesi sulle membrane.

3. Indagini effettuate per il rilevamento di virus enterici nelle acque di mare.

Il rilevamento di virus enterici nelle acque di balneazione ed, in particolare, nelle acque di mare, è un campo di ricerca abbastanza recente. I primi studi dei virus enterici nelle acque di mare, come sporadici tentativi, risalgono alla fine degli anni sessanta (37,38). Agli inizi dagli anni settanta Crovari et al. dell'Università di Genova, per la prima volta e con un'indagine approfondita, hanno dimostrato la presenza di virus enterici come Polio, Echo e Coxsackie nelle acque del Mar Tirreno (39).

Indagini sulla contaminazione virale delle acque di mare successivamente sono state effettuate in diversi Paesi. Per gli Stati Uniti sono state interessate la costa atlantica: Texas (40,41,42,43), Florida (44,45), New York (46) e la costa del Pacifico: Hawaii (47). In Europa oltre che sulle coste mediterranee italiane: Mar Tirreno (48,49,50) e Adriatico (51), sono state effettuate indagini sulle coste mediterranee

francesi (52,53) e israeliane (54), e sulle coste del Mar Nero (55). L'Atlantico europeo è stato interessato con il Mar Baltico (56) e il Mare del Nord (57) (Tabella 3).

Tabella 3. Paesi che hanno condotto indagini virali sulle proprie aree costiere a partire dagli anni settanta

PERIODO	PAESE	ANNO
ANNI '70	Italia	1974
	U.S.A. (Golfo del Messico)	1977
	Europa (Mar Baltico)	1977
	U.S.A. (Florida - Golfo del Messico)	1978-'79
	Europa (Nizza)	1979
	U.S.A. (New York)	1979
ANNI '80	U.S.A. (Florida)	1980
	Asia (Israele)	1984
	U.S.A. (Golfo del Messico)	1984
	Europa (Francia)	1988
	Italia	1987-'88-'89
	Africa (Sud Africa)	1989
ANNI '90	Italia	1990
	Europa (Olanda)	1990

Le tecniche utilizzate nell'ambito del rilevamento dei virus enterici nelle acque di mare sono soprattutto quelle basate sull'adsorbimento-eluzione (40,41,42,44,45,46,47). Negli Stati Uniti è diffuso l'uso del sistema di concentrazione che prevede l'uso di

prefiltri e filtri in fibre di vetro e di asbesto-vetro, In Europa sono stati utilizzati i metodi di adsorbimento-eluizione, che prevedono l'utilizzo di polvere di vetro di cartucce in esteri di cellulosa (57) e polielettroliti (PE60) (39,48,55). Più recentemente sono utilizzati sistemi di adsorbimento a filtri microporosi elettropositivi (50,51) ed ultrafiltrazione tangenziale (58,59).

Dall'esame dei dati bibliografici riportati nella tabella 4 si evidenzia come i numeri dei virus rilevati in 10 litri di acqua di mare sono risultati variabili da 1 a 10 per le coste atlantiche americane, mentre per le coste atlantiche europee i valori si aggirano da 1 a 100 unità. Nel Mediterraneo i numeri più elevati sono stati registrati per il Mar Ligure (da 20 a 1.200 TCID50/10L), mentre per Israele e Francia rispettivamente 700 e 220 sono i valori massimi. Per il Sud Africa sono state rilevate fino a 2.000 particelle virali su 10 litri di acqua di mare concentrata con il sistema dell'ultrafiltrazione tangenziale. Altri dati numerici non sono disponibili poiché, in molte indagini sono state effettuate solo prove qualitative.

Tabella 4. Numeri di virus enterici rilevati nelle acque costiere di diversi Paesi

PAESE	Virus (n/10L)	ACQUA CONCENTRATA
U.S.A. (Texas)	2 - 160	20 L
(Florida)	0 - 1	1 - 800 L
(Texas)	0,4 - 4	378 L
(New York)	2 - 20	378 L
Europa (Italia)	20 - 1.200	5 - 10 L
(Mar Baltico)	5 - 130	10 L
(Francia)	10 - 220	20 L
(Olanda)	0,1 - 1	100 - 200 L
(Italia)	Presenti	3 - 10 L
Asia (Israele)	20 - 700	non riportato
Africa (Sud Africa)	2.000	10 L

Gli esami di identificazione, condotti nell'ambito di molte delle indagini riportate, hanno messo in evidenza la presenza, nelle acque marine, di enterovirus (polio, echo e coxsackie) e di reovirus (Tabella 5).

Tabella 5. Specie di virus enterici isolati nelle acque costiere di diversi Paesi

ZONA	PAESE	SPECIE VIRALI
U.S.A.	(Golfo del Messico)	Polio - Echovirus
	(Florida)	Enterovirus
	(New York)	Polio - Echovirus
	(Hawai)	Polio - Echo - Coxsackievirus
EUROPA	(Italia)	Polio - Echo - Coxsackie - Reovirus
	(Italia)	Echo - Coxsackievirus
	(Francia)	Enterovirus
	(Italia)	Reovirus
	(Italia)	Polio - Coxsackie - Reo - Enterovirus
ASIA	(Israele)	Polio - Echovirus
AFRICA	(Sud Africa)	Polio - Echo - Coxsackie - Reovirus

Nell'ambito di alcune delle indagini citate, sono stati esaminati, oltre che le acque, i sedimenti ed è stato rilevato che le particelle virali sono più numerose nei sedimenti che nelle acque prelevate negli stessi siti: ciò conferma il potere di assorbimento del materiale particolato (Tabella 6).

Le metodiche utilizzate per il rilevamento dei virus nell'ambito di tutte le indagini citate sono molto diverse tra loro. Inoltre sono stati messi a confronto dati rilevati in un arco di tempo di 16-18 anni. Non si può, però, fare a meno di notare, dai dati riportati, che quanto più elevate sono le quantità dei campioni esaminati tanto più piccoli sono i numeri dei virus rilevati. Ovviamente questo può dipendere dalla qualità dell'acqua che è stata analizzata. Ma non si può escludere la possibilità che la filtrazione

di grossi volumi di acqua concentri anche sostanze come acidi umici e particolato organico che tendono a trattenere i virus stentando poi a rilasciarli e quindi diminuiscano l'efficienza del recupero.

Tabella 6. Virus enterici rilevati nei sedimenti marini e nelle acque degli stessi siti di prelievo.

VIRUS (acqua n/L)	VIRUS (sedimenti n/L)	PAESE
2 - 160	4 - 400	Italia (Mar Tirreno)
0,1 - 8	0,5 - 10	U.S.A. (Texas)
0 - 0,08	0 - 36	U.S.A. (Florida)
0,01 - 0,1	0,1 - 1	U.S.A. (Texas)

4. Esperienze maturate

Con la finalità di verificare la diffusione di enterovirus nelle acque di mare, in ottemperanza alla legislazione che ne prevede il rilevamento, nel 1989, in occasione di una campagna di campionamenti che si protrasse per l'intero periodo estivo da giugno a settembre, furono effettuati prelievi di acque in due zone del mare Adriatico, una antistante la foce del fiume Rubicone, che riceve scarichi di natura cloacale non trattati, ed una antistante il Porto Canale Cesenatico, che riceve scarichi trattati da impianti di depurazione (Figura 1) (51).

Furono anche effettuati prelievi alla foce del canale ed a quella del fiume. Ciascun campione fu analizzato dopo opportuna concentrazione per passaggio ortogonale su membrane elettropositive, 1MDS Virosorb (143 mm di diametro), e successiva eluizione dei virus adsorbiti con 30 - 40 mL di estratto di carne al 3% ed a pH 9 (51).

Gli eluati furono saggati su colture di cellule BGM per l'evidenziazione dell'effetto citopatico.

I risultati sono mostrati nella tabella 7.

L'86% dei campioni di acqua di mare è risultato contaminato da virus. Le acque di Porto Canale Cesenatico presentavano particelle virali nel 100% dei campioni, mentre 1 campione sui 3 prelevati alla foce del fiume Rubicone risultava positivo per presenza virale.

Le acque della foce del Rubicone sono acque non trattate da impianti di depurazione e di conseguenza sono più ricche di materiale particellato che non quelle di Porto Canale Cesenatico. E' probabile, quindi, che i virus non siano stati rilevati in tutti i campioni di acqua prelevati dalla foce del Rubicone perchè adsorbiti a particellato depositatosi come sedimento.

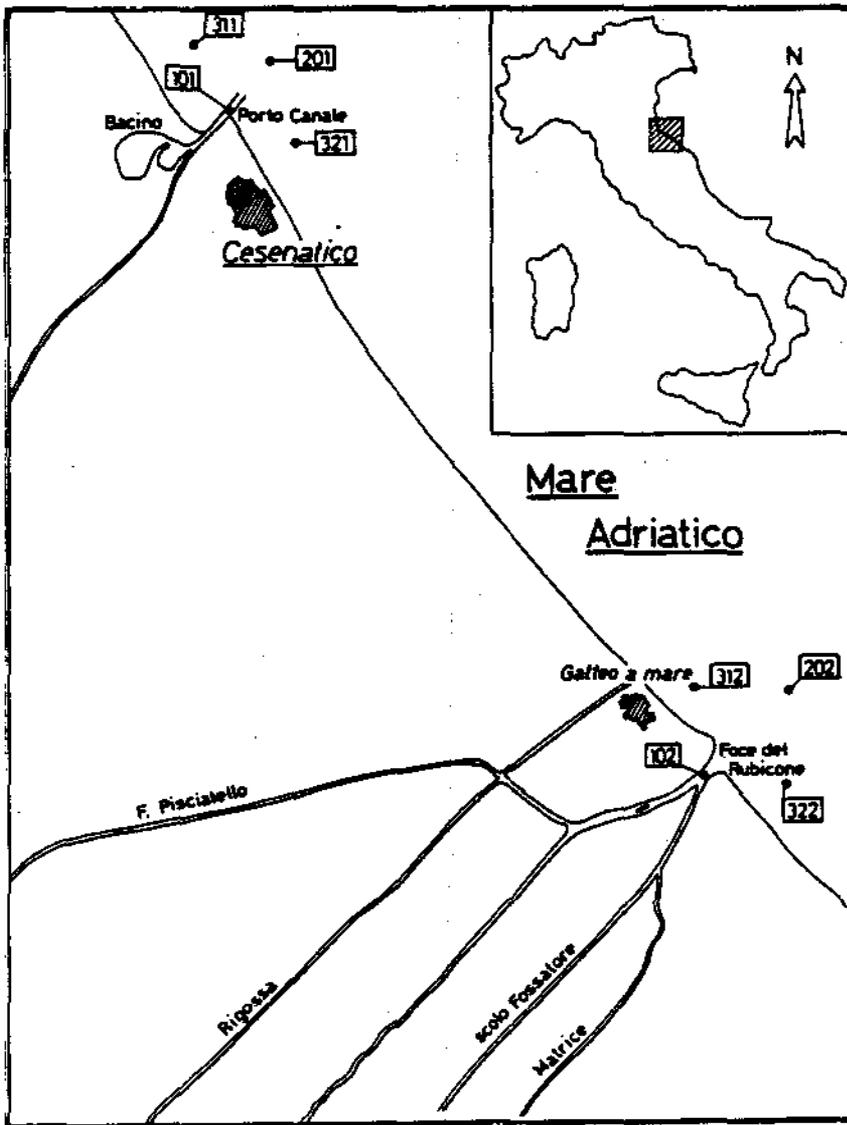


Figura 1. Stazioni di campionamento lungo una zona del litorale adriatico

Tabella 7. Presenza/assenza (+/-) di effetto citopatico indotto su cellule BGM da campioni prelevati da una zona costiera del mare Adriatico nell'estate 1989.

Stazioni di prelievo	Numero totale di campioni prelevati per stazione di prelievo	Numero di campioni positivi per effetto citopatico
Porto Canale Cesenatico		
101*	4	4
311**	4	3
321**	4	3
201**	4	3
Foce del Rubicone		
102*	3	1
312**	3	3
322**	3	3
202**	3	3

* Acque estuariali ** Acque marine

Da ciò si evidenzia l'importanza, nel caso di indagini virali, dell'esame concomitante del materiale particellato in sospensione e dei sedimenti. Questi ultimi dovrebbero essere analizzati specialmente in quei casi in cui le caratteristiche del luogo, tra cui il clima (venti, correnti) o il particolare uso che se ne fa (nuoto, natanti, ecc) fanno pensare ad un rimescolamento continuo dell'acqua e dei sedimenti del fondo, perché proprio a causa di questo rimescolamento possono verificarsi contaminazioni dell'acqua di superficie.

I virus isolati ed identificati sono risultati reovirus (60).

I reovirus (Respiratory Enteric Orphan viruses) sono così denominati perché isolati dal tratto respiratorio e gastrointestinale di persone ed animali senza una relazione eziologica con malattie. E' stata evidenziata solo un'epidemia di influenza in bambini causata da reovirus. Sono stati rilevati in quantità elevate ($>10^6/g$) in feci di bambini affetti da diarree e lievi affezioni respiratorie. Il 50-80% ed anche il 90% della popolazione adulta ha anticorpi contro i reovirus 1,2,3. Anche tra gli animali vi è

un'alta incidenza di individui che possiedono anticorpi contro i reovirus. L'elevata distribuzione di anticorpi antireo tra la popolazione umana ed animale è la probabile causa della contaminazione degli ambienti idrici. Questi virus hanno tassi di sopravvivenza maggiori degli enterovirus. Sono endemici nella popolazione e la loro presenza nell'acqua può essere considerata come causa di ulteriori infezioni nell'ambito della popolazione che fruisce dell'acqua, anche se essi non possono, attualmente, essere considerati un rischio come altri virus. Da più Autori essi sono visti come possibili indicatori della qualità virale delle acque per la loro resistenza e per la loro abbondanza nell'ambiente, in relazione alle altre specie virali

Nel 1990, è stata effettuata un'indagine sulle coste del mar Tirreno. Sono stati effettuati, durante il periodo estivo, prelievi di acqua alla foce del Tevere e prelievi di acque di mare, da diverse zone del litorale romano: Pomezia, Civitavecchia, S.Marinella, Cerveteri, Roma, Ardea, Nettuno (Figura 2).

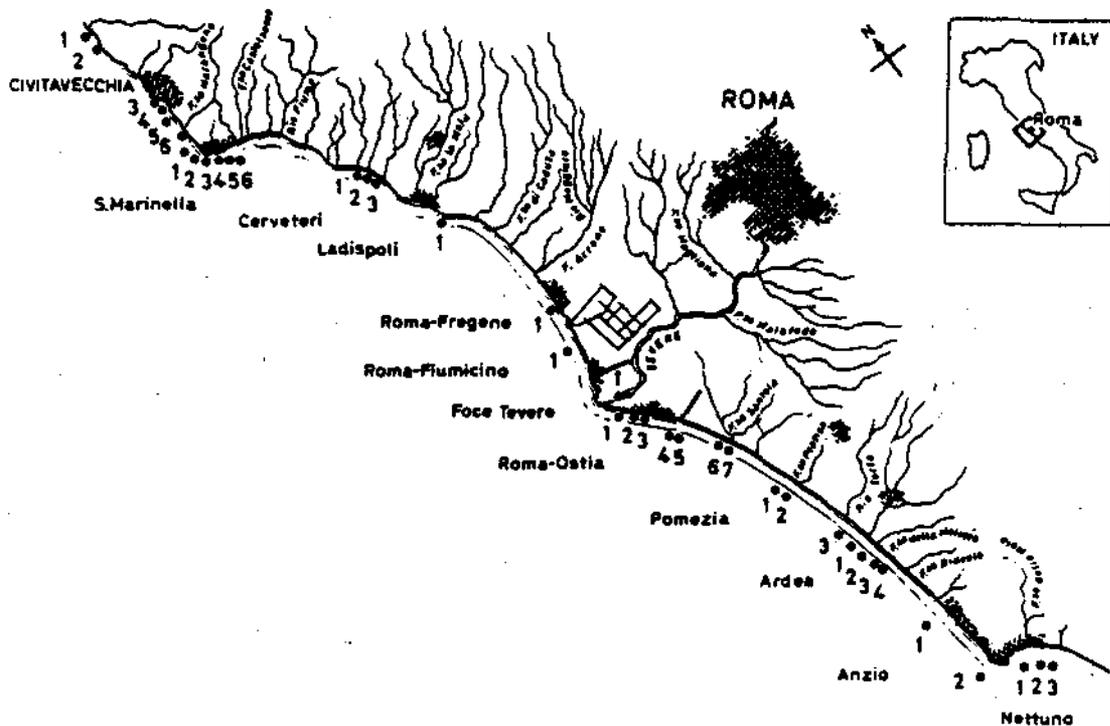


Figura 2. Stazioni di prelievo lungo la zona costiera del litorale tirrenico romano

I campioni di 20 litri sono stati suddivisi in due parti uguali, di 10 litri ognuna. Su ciascuna delle due parti è stato applicato, come metodo di concentrazione, quello della ultrafiltrazione tangenziale accanto a quello dell'adsorbimento eluzione con membrane elettropositive (58).

I risultati dell'isolamento, basati sull'effetto citopatico su cellule BGM hanno mostrato che il 100% delle acque alla foce del Tevere concentrate con ambedue i sistemi presentano particelle virali. Solo 7 campioni su 52 (13%) ed 1 campione su 52 (2%) di acque di mare concentrate rispettivamente per ultrafiltrazione tangenziale e adsorbimento-eluzione sono risultati positivi per presenza virale (Tabella 8).

Tabella 8. Acque di mare e di estuario prelevate lungo il litorale tirrenico romano e concentrate per ultrafiltrazione tangenziale (UT) ed adsorbimento-eluzione (AE): risultati dell'identificazione dei virus isolati sulle colture di cellule BGM

Stazione di prelievo	Numero totale di campioni per stazione di prelievo	Campioni concentrati per UT e positivi per effetto citopatico	Campioni concentrati per AE e positivi per effetto citopatico
Civitavecchia	9	0	0
S. Marinella	7	3 (1 entero, 2 polio)	0
Cerveteri	4	0	0
Ladispoli	1	0	0
Roma-Fregene	1	1 (reo)	0
Roma-Fiumicino	1	0	0
Foce del Tevere	10	10 (3 entero, 4 coxsackie, 3 reo)	9/9*(2 entero, 7 reo)
Roma-Ostia	16	2 (1 polio, 1 reo)	0
Pomezia	3	0	0
Ardea	4	0	0
Anzio	3	0	0
Nettuno	3	1 (entero)	1 (entero)

Le acque di mare si presentano più "pulite" in relazione alla presenza di virus rispetto a quelle di estuario. Questo dato è chiaramente attribuibile all'effetto diluente del mare sugli scarichi di origine terrestre. Nei mesi estivi, le acque di mare mostrano percentuali ancora più basse di particelle virali: su 15 campioni prelevati durante il periodo primaverile 5 sono risultati positivi per presenza virale, su 37 campioni prelevati in estate 2 sono positivi per virus. Si deve, a questo punto, sottolineare la presenza di fattori sfavorevoli alla sopravvivenza virale, ad esempio, l'irradiazione solare e la temperatura.

Il sistema di concentrazione basato sulla ultrafiltrazione, per le acque di mare, sembra mostrare più efficienza di quello per adsorbimento-eluzione, mentre per le acque di estuario i due sistemi sembrano equivalenti. Si può ipotizzare che la salinità più elevata delle acque di mare renda meno efficiente l'adsorbimento dei virus sulle membrane elettropositive per una competizione di cariche.

L'identificazione dei campioni con sonde molecolari in grado di ibridare con enterovirus e l'esame dei campioni mediante elettroforesi verticale in gel di poliacrilammide (P.A.G.E.) evidenzia enterovirus come polio e coxsackievirus, enterovirus (non identificati come specie) e reovirus, sia nelle acque di estuario che in quelle marine.

L'ultrafiltrazione tangenziale sia per le acque di mare che per quelle di estuario sembra favorire l'isolamento di enterovirus piuttosto che di reovirus. Con l'adsorbimento-eluzione, solo per le acque estuariali, però, la tendenza si inverte. Alcuni Autori riportano che l'adsorbimento-eluzione su membrane elettropositive dà percentuali di recupero piuttosto basse per adenovirus e reovirus (30). Non si può, in ogni caso, sulla base di questi dati, essere sicuri che uno dei due sistemi isoli preferenzialmente talune specie virali rispetto ad altre. Si tratta di un'ipotesi da confermare anche sulla base di dati più numerosi. Inoltre c'è da tenere in considerazione che sulle colture di cellule si possono verificare sviluppi preferenziali di specie virali rispetto ad altre.

Il virus polio pur essendo stato rilevato nelle acque di mare non è stato mai isolato dalle acque di estuario, per cui si può ipotizzarne la provenienza da altri scarichi costieri che influenzano la qualità delle acque marine esaminate. Comunque più specie virali possono essere presenti in un campione, ma una volta effettuata l'infezione dei tappeti cellulari generalmente ne viene selezionata una sola. Di conseguenza non si può escludere la presenza di virus polio nelle acque alla foce del fiume Tevere.

Dai risultati ottenuti nell'ambito degli studi condotti si evidenzia la diffusione di virus enterici nelle due zone costiere esaminate, quella adriatica e quella tirrenica. E' chiara l'influenza negativa sulle acque costiere degli input fecali di origine terrestre.

I dati ottenuti sono in accordo con quelli riportati da altri Autori e che si riferiscono a zone costiere di diversi Paesi: i virus isolati sono, infatti, risultati enterovirus e reovirus.

Non si può escludere la presenza di altri virus enterici, ma allo stato attuale non possono essere messe in evidenza altre specie virali di origine enterica, poichè non tutte le specie possono essere selezionate sui tappeti cellulari non essendo in grado di indurre effetti citopatici e, in molti casi, non essendo in grado neanche di riprodursi. Un'ipotesi di soluzione a questo problema è l'introduzione di tecniche di identificazione

su base molecolare da applicarsi, non più sui virus replicatisi sulle colture di cellule, ma sul campione concentrato che dovrebbe, teoricamente, contenere più specie virali.

La conoscenza della diffusione e persistenza di diverse specie virali di origine enterica nell'ambiente idrico è importante per il contributo alle conoscenze epidemiologiche. Se si considera la problematica della virologia delle acque da un punto di vista igienico-sanitario, l'approccio può essere diverso: potrebbe essere operata una scelta relativa ad un organismo virale indicatore della contaminazione virale delle acque. La scelta potrebbe cadere sui reovirus, come anche consigliato da diversi Autori.

BIBLIOGRAFIA

1. KAPUSCINSKI, R.B., MITCHELL, R. 1980. Processes controlling virus inactivation in coastal waters. Wat. Res. 14: 363-365.
2. BLOCK, J.C. 1983. Viruses in environmental waters. In: Viral pollution of the environment, pp 118-137. Berg G. Ed. CRC Press. Boca Raton. Florida.
3. KATZENELSON, E. 1978. Survival of viruses. In: Indicators of viruses in water and food. Berg G. (Ed.) Ann Arbor Mich.
4. LA BELLE, R.L., GERBA, C.P. 1980. Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. Appl. Environm. Microbiol. 39: 749-753.
5. FUJIOKA, R.S., LOH, P.C., LAU, L.S. 1980. Survival of human enteroviruses in Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. Appl. Environm. Microbiol. 39: 1105-1110.
6. MELNICK, J.L., GERBA, C.P. 1980. The ecology of enteroviruses in natural waters. CRC Crit. Rev. Environ. Cont. 10: 65-93
7. GERBA, C.P., GOYAL, S.M. 1988. Enteric virus: risk assessment of ocean disposal of sewage sludge. Wat. Sci. Tech. 20: 25-31.
8. GERBA, C.P., GOYAL, S.M. 1986. Development of qualitative pathogen risk assessment methodology for ocean disposal of municipal sludge. US Environmental Protection Agency. ELAO-CIN 493. Cincinnati, OH.
9. CUBBAGE, C.P., GANNON, J.J., COCHRAN, K.W., WILLIAMS, G.W. 1979. Loss of infectivity of poliovirus 1 in river water under simulated field conditions. Wat. Res. 13: 1091-1094.

10. BLOCK, J.C., JORET, J.C., MORLOT, M., FOLIGUET, I.M. 1978. Recherche des enterovirus dans les eaux superficielles par adsorption-elution sur microfibre de verre. Tech. Sci. Munic.-L'eaux. 73: 181-184.
11. GERBA, C.P., GOYAL, S.M., HURST, C., La BELLE, R.L. 1980. Type and strain dependence of enterovirus adsorption to activated sludge, soil and estuarine sediments. Wat. Res. 14: 1197-1199.
12. BITTON, G. 1980. Adsorption of viruses to surfaces: technological and ecological implications. In "Adsorption of microorganisms to surfaces" pp. 332-357. Bitton G. and Marshall K.C. (Eds) John Wiley & Sons, New York.
13. GOYAL, S.M., ADAMS, W.N., O'MALLEY, M.L., LEAR, D.W. 1984. Human pathogenic viruses of sewage sludge disposal sites in the middle Atlantic region. Appl. Environ. Microbiol. 48: 758-763.
14. DAHLING, D.R., SAFFERMAN, R.S. 1979. Survival of enteric viruses under natural conditions in a subarctic river. Appl. Environ. Microbiol. 38: 1103-1108.
15. CABELLI, V.J. 1983. Public health and water quality significance of viral diseases transmitted by drinking water and recreational water. Wat. Sci. Technol. 15: 1-15.
16. BROWN, J.M., CAMPBELL, E.A., RICKARDS, A.D., WHEELER, D. 1987. Sewage pollution of bathing water. The Lancet ii: 1208-1209.
17. BRYAN, J.A., LEHMANN, J.D., SETIADY, I.F., HATCH, M.H. 1974. An outbreak of Hepatitis A associated with recreational lake water. Am. J. Epidemiol. 99: 145-154.
18. D'ANGELO, L.J., HIERHOLZER, J.C., KEENLYSIDE, R.A., ANDERSON, L.J., MARTONE, W.J. 1979. Pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 4: report of a swimming pool-related outbreak with recovery of virus from pool water. J. Infect. Dis. 140: 42-47.
19. I.A.W.P.R.C. Study group on water virology. 1983. The health significance of viruses in water. Wat. Res. 17: 121-132.
20. HAWLEY, H.B., MORIN, D.P., GERAGHTY, M.E., TOMKOW, J., PHILIPS, C.A. 1973. Coxsackie B epidemic at a boys' summer camp. Isolation of virus from swimming water. J. Am. Med. Ass. 226: 33-36.
21. WARD, R.L., AKIN, E.W. 1984. Minimum infectious dose of animal viruses. CRC Crit. Rev. Environ. Contr. 14: 297-310.

22. GRAHAM, D.Y., DUFOUR, G.R., ESTES, M.K. 1987. Minimal infective dose of Rotavirus. Arch. Virol. 92: 261-271.
23. SCHIFF, G.M., STEFANOVIC, E.C., YOUNG D.S., SANDER, J.K.P., WARD, R.L. 1984. Studies of echovirus 12 in volunteer: determination of minimal infectious dose and the effect of previous infection on infectious dose. J. Infect. Dis. 150: 858-866.
24. ASSAAD, F., BORECKA, I. 1977. Nine year study of WHO virus reports on fatal virus infections. Bull. Wld. Hlth. Org. 55: 445-453.
25. SOBSEY, M. D., JONES, B.L. 1979. Concentration of poliovirus from tapwater using positively charged microporous filters. Appl. Environ. Microbiol. 37: 588-591.
26. WALLIS, C, ENDERSON, M., MELNICK, J.L. 1972. Enterovirus concentration on cellulose membranes. Appl. Environ. Microbiol. 23: 46-51.
27. LANDRY, E.F., VAUGHN, J.M., THOMAS, M.Z., VICALE, T.V. 1978. Efficiency of beef extract for the recovery of poliovirus from wastewater effluents. Appl. Environ. Microbiol. 36: 544-548.
28. METCALF, T.G. 1961. Use of membrane filters to facilitate the recovery of virus from aqueous suspensions. Appl. Microbiol. 9: 376-381.
29. CLIVER, D.O. 1967. Enterovirus detection by membrane chromatography. In "Transmission of viruses by the water route." Berg G. (Ed) Wiley-Interscience, NewYork
30. WALLIS, C., MELNICK, J.L. 1967. Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes. Bull. Wrlld. Hlth. Org. 36: 219-225.
31. SOBSEY, M.D., GLASS, J.S. 1980. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filter. Appl. Environm. Microbiol. 4: 201-206.
32. SOBSEY, M.D., GLASS, S.J. 1984. Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. Appl. Environm. Microbiol. 47: 956-960.
33. AUTORI VARI. 1989. Detection of enteric viruses. In: "Standard methods for the examination of water and waste water, pp. 9/155-9/182. American Public Health Association. Washington D.C. 20036.
34. BERMAN, D., ROHR M.E., SAFFERMAN R.S. 1980. Concentration of poliovirus in water by molecular filtration. Appl. Environ. Microbiol. 40: 426-428.

35. JANSON, J., BUCENS, M.R. 1986. Virus detection in water by ultrafiltration. Wat. Res. 20: 1603-1606.
36. NUPEN, E.M., BASSON N.C., GRABOW, W.O.K. 1980. Efficiency of ultrafiltration for the isolation of enteric viruses and coliphages from large volumes of water in studies on wastewater reclamation. Wat. Tech. 12: 851-863.
37. BRISOU, J. 1968. La pollution microbienne, virale et parasitaire des eaux littorales et ses consequences pour la sante publique. Bull. Wld. Hlth. Org. 38: 79-84.
38. LE CLERC, H. 1970. Marine and freshwater pollution. Rev. Int. Oceanogr. Med. 24: 155-159.
39. CROVARI, P., DE FLORA, S., VANNUCCI, A., BADOLATI, G. 1974. The virological monitoring of water. II. Sea water. Boll. Ist. Sier. Milan. 33: 525-532.
40. GERBA, C.P., SMITH, E.M., MELNICK, J.L. 1977. Development of a quantitative method for detecting enteroviruses in estuarine sediments. Appl. Environm. Microbiol. 34: 158-163.
41. GERBA, C.P., SAGAR, M., GOYAL, E.M., MELNICK, J.L. 1977. Distribution of viral and bacterial pathogens in a coastal canal community. Mar. Poll. Bull. 12: 279-282.
42. GOYAL, S.M., GERBA, C. P., MELNICK, J.L. 1979. Human enteroviruses in oysters and their overlaying waters. Appl. Environ. Microbiol. 37: 572-581.
43. RAO, V.C., SEIDEL, K.M., GOYAL, S.M., METCALF, T.G., JOSEPH, L. 1984. Isolation of enteroviruses from water, suspended solids and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. Appl. Environ. Microbiol. 48: 404-409.
44. EDMOND, T.D., SCHAIBERGER, G.E., GERBA, C.P. 1978. Detection of enteroviruses near deep marine sewage outfalls. Mar. Poll. Bull. 9: 246-249.
45. SCHAIBERGER, G.E., EDMOND, T.D., GERBA, C.P. 1982. Distribution of enteroviruses in sediments contiguous with a deep marine outfall. Wat. Res. 16: 1425-1428.
46. VAUGHN, J.M., LANDRY, E.F., THOMAS, M.Z., VICALE, T.J., PENELLO, W.F. 1979. Survey of human enterovirus in fresh and marine surface waters on Long Island. Appl. Environ. Microbiol. 38: 290-296.

47. LOH, P.C., FUJIOKA, R.S., STEPHEN, L. 1979. Recovery, survival and dissemination of human enteric viruses in ocean waters receiving sewage in Hawaii. Wat. Air, Soil Poll. 12: 197-217.
48. DE FLORA, S., DE RENZI, G.P., BADOLATI, G. 1975. Detection of animal viruses in coastal seawater and sediments. Appl. Microbiol. 30: 472-475.
49. PETRILLI, F.L., DE RENZI, G.P., ORLANDO, P., DE FLORA, S. 1980. Microbiological evaluation of the coastal waters quality in the Tyrrhenian sea. Prog. Wat. Tech. 12: 129-136.
50. PATTI, A.M., DE FILIPPIS, P., GABRIELI, R., FLOCCIA, M., PANÀ, A. 1989. Evaluation of positively charged microporous filters to simplify enterovirus concentration from small volumes of surface water. Ig. Mod. 91: 312-319.
51. AULICINO, F.A., PATTI, A.M., MUSCILLO, M., GABRIELI, R., DE FILIPPIS, P., ORSINI, P., MERLONI, R., VOLTERRA, L. 1991. Viruses in marine waters. Ig. Mod. 96: 583-592.
52. HUGUES, B., BOUGIS, M.A., PLISSIER, M., ANDRE, M., LAURENT, D., PAGLIARDINI, A. 1979. Evaluation of the viral contamination of the sea water after the emission of an effluent into the sea. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 169: 253-264.
53. HUGUES, B., PIETRI, C.H., PUEL, D., CRANCE, J.M., CINI, C., DELOINCE, R. 1988. Research of enterovirus, Hepatitis A virus in a bathing area over a six month period and their salubrity impact. Zbl. Bakt. Hyg. B 185: 560-568.
54. FATTAL, B., VASL, R.J., KATZENELSON, E., SHUVAL, H.I. 1983. Survival of bacterial indicator organisms and enteric viruses in the Mediterranean coastal waters of Tel-Aviv. Wat. Res. 4: 397-402.
55. CASTOR, M., COSTI-LAZAR, L., SOVREA, D., IONESCU, N. 1984. Estimation of enterovirus in sea water and in the sand of the beaches. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 178: 527-534.
56. STEINMANN, J. 1977. Detection of viruses in water of the Baltic sea. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. B 164: 492-497.
57. VAN OPHEN, M., DE BRUIN, H.A.M., HAVELAAR, A.H., SCHIJVEN, J.F. 1991. The virological quality of the recreational waters in the Netherlands. Wat. Sci. Tech. 24: 209-212.
58. AULICINO, F.A., VOLTERRA, L., ORSINI, P., BELLUCCI, C., MANCINI, L., MUSCILLO, M. 1992. Qualità batteriologica e virologica di acque del mar Tirreno ed estuariali. Ann. Ig. In corso di pubblicazione.

59. GRABOW, W.O.K., IDEMA, G.K., COUBROUGH, P., BATEMAN, B.W. 1989. Selection of indicator systems for human viruses in polluted seawater and shellfish. Wat.Sci.Tech. 3: 111-117.

60. MUSCILLO, M., AULICINO, F.A., PATTI, A.M., ORSINI, P., VOLTERRA, L., FARA, G. 1992. Molecular techniques for the identification of enteric viruses in marine waters. Wat.Res. In corso di pubblicazione.

RILEVAMENTO DI VIRUS ENTERICI IN CAMPIONI "PARTICOLARI" COME GELATINA E SOLIDI SOSPESI

P. ORSINI, F.A. AULICINO

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

1. Introduzione

La diffusione dei virus nell'ambiente è un problema attualmente rilevante ma che si affronta da tempi relativamente brevi: gli enterovirus, infatti, sono stati isolati da campioni di acqua, per la prima volta negli anni sessanta (1,2,3).

Uno degli obiettivi principali della "virologia ambientale" è la messa a punto di specifiche metodiche di rilevamento delle particelle virali da applicarsi nei diversi settori di indagine ambientale. Questo allo scopo di avere a disposizione ulteriori metri di valutazione della trasformazione indotta dall'inquinamento fecale nell'ambiente e quindi una valutazione dell'eventuale rischio cui è sottoposta la popolazione in contatto con l'ambiente contaminato.

I virus diffusi nell'ambiente, appartengono a diverse categorie: virus enterici umani, animali, batteriofagi ecc. Si pone particolare attenzione alla diffusione di virus enterici umani, quali Enterovirus, Rotavirus, HAV, ecc., per il rischio di contaminazione dell'uomo. Tali virus giungono all'ambiente essenzialmente attraverso escrezioni di individui infetti ed in virtù della loro particolare resistenza a condizioni sfavorevoli, possono sopravvivere e rimanere vitali senza replicarsi, per periodi di tempo abbastanza lunghi. Tali tempi dipendono sia dal tipo virale in esame che da altri fattori ambientali contingenti non ancora ben identificati. Durante questo periodo essi possono occasionalmente entrare in contatto con ospiti sensibili e riacquisire la loro virulenza inducendo l'evento morboso (4).

La concentrazione dei virus enterici nelle feci è pari 10^{10} - 10^{11} particelle/g di feci (5). Le escrezioni allontanate attraverso scarichi fognari, fosse settiche ecc. possono inquinare corpi idrici riceventi come fiumi, laghi, mari. E' ovvio che l'entità dell'inquinamento, laddove si verifica, dipende da diversi fattori come la qualità degli scarichi, il trattamento in impianti di depurazione, il tipo di processo depurativo subito, la natura del corpo idrico ricevente e la sua capacità autodepurativa, ed ancora dipende dal tipo virale in esame e dall'insieme dei fattori fisici, chimici e biologici che caratterizzano l'ambiente. Le fosse settiche potrebbero essere l'origine di diffusioni virali quando si verificano delle infiltrazioni di liquami attraverso le crepe naturali del terreno tali da raggiungere le profonde falde acquifere sotterranee. In tali casi le conseguenze dell'inquinamento che si determina sono estremamente gravi in considerazione dell'utilizzo di tali acque come fonte di approvvigionamento idrico per la popolazione, e soprattutto perché spesso si considerano queste acque aventi requisiti naturali di potabilità.

2. Adsorbimento virale al particellato

Le difficoltà riscontrate nel rilevamento di virus da campioni ambientali, nascono essenzialmente dalla mancanza di metodi di rilevamento standardizzati.

Allo stato attuale, i virus possono essere evidenziati mediante il rilevamento di effetti citopatici sui tappeti cellulari. Poiché le particelle virali nelle acque sono piuttosto "diluite" per l'evidenziazione di esse non possono essere saggiate sulle colture cellulari quantità elevate di campione. Di conseguenza diventa necessario effettuare la concentrazione dei campioni di acqua.

I campioni di acque marine, lacustri o i liquami, ecc. presentano materiale in sospensione. L'entità del materiale sospeso è diversa. Le acque di mare, di fiume o lacustri possono essere più o meno limpide, (dipende molto dal particolare idrodinamismo) e talvolta presentano solidi sospesi. I liquami invece sono sempre torbidi e ricchissimi di materiale in sospensione (6).

Per l'indagine di campioni contenenti particellato in sospensione debbono essere necessariamente considerati anche i solidi sospesi, poiché le particelle virali diffuse nell'ambiente tendono ad aggregarsi e a sviluppare fenomeni di adsorbimento al particellato stesso presente nell'acqua. Non è un caso che i passaggi più efficaci per l'abbattimento della carica virale siano essi depurativi o di potabilizzazione, sono quelli in cui si allontana il materiale particellato in sospensione. Ad esempio durante il processo di potabilizzazione delle acque si verifica, nelle fasi di coagulazione, sedimentazione, e filtrazione, un abbattimento virale, relativamente agli enterovirus, ben del 93% (7).

2.1 Descrizione dell'adsorbimento

E' stato verificato che in determinate condizioni, quali elevate concentrazioni di particellato, pH neutro e moderata forza ionica, l'80% delle particelle virali dell'ambiente acquoso si adsorbe a materiale solido (8,9).

Il fenomeno di adsorbimento si verifica in quanto il capsido virale è composto da proteine ionizzabili. Il comportamento ionico di tali proteine dipende dal pH e dalla forza ionica del mezzo e da particelle o colloidali, eventualmente presenti nel mezzo, che posseggono sulla superficie esterna delle cariche elettriche. Il segno e la forza di tali cariche dipende non solo dalla concentrazione e dal tipo di gruppi superficiali ionizzabili dei solidi e dei virus, ma anche dal numero e dal tipo di adsorbimenti-deadsorbimenti originatesi e dipendenti dalla qualità del mezzo (8).

Il fenomeno dell'adsorbimento, è essenzialmente dovuto ad interazioni di natura elettrostatica ed idrofobica, che si vengono ad instaurare tra le cariche presenti sulla superficie virale e la superficie del particellato. In condizioni naturali gli enterovirus sono prevalentemente caricati negativamente, si instaurano così forti legami elettrostatici con cariche positive presenti nel mezzo ed opportune forze repulsive con le cariche dello stesso segno (10,11). Anche le interazioni idrofobiche rappresentano una parte importante nel fenomeno dell'adsorbimento. Un'analisi delle componenti proteiche del capsido dei Picornaviridae ha evidenziato che il 40-50% dei residui aminoacidici sono di natura non polare (12). Questo suggerisce che i virus enterici, possedendo dei componenti idrofobici, possono dare origine a delle interazioni di natura idrofobica.

L'adsorbimento, una volta verificatosi, può essere abbastanza stabile poiché è favorito dal punto di vista termodinamico. Un minor numero di molecole di acqua devono disporsi sulla superficie virale quando questa è adsorbita al particolato, rispetto alla condizione in cui il virus è invece libero nell'acqua (13). La condizione di libertà è in questo modo termodinamicamente sfavorita, in quanto vengono a contatto i gruppi idrofobici della particella virale ed i gruppi idrofilici dell'acqua.

I metodi di rilevamento dei virus nell'ambiente oggi disponibili, ma ancora in via di standardizzazione, sfruttano proprio queste caratteristiche dell'adsorbimento, infatti prevedono anche l'uso di membrane provviste di cariche elettriche attraverso le quali viene fatto passare il campione per cui vengono sfruttate le attrazioni elettrostatiche tra virus e membrane (11).

I fenomeni di adsorbimento virale ai solidi sospesi sono in stretta dipendenza dal particolare ambiente idrico di cui questi fanno parte, poiché possono essere influenzati da fattori chimici quali la salinità, il pH, le molecole organiche, da fattori fisici quali la temperatura, la luce, la pressione idrostatica e da fattori biologici quali le forme viventi presenti e non ultimo il tipo virale considerato (12,14).

Alcuni Autori, hanno rilevato per i sedimenti di mare e di lago delle differenze nell'adsorbimento virale (15,16). I sedimenti marini mostrano un adsorbimento dal 99 al 100% di virus Polio aggiunto sperimentalmente, mentre quelli di acqua dolce adsorbono circa il 40% dei virus aggiunti (17). Sono state rilevate differenze di comportamento anche tra virus diversi nello stesso habitat, in funzione di variazioni di salinità (15). Ad esempio aumenti di salinità non determinano cambiamenti in relazione all'adsorbimento di Poliovirus e Rotavirus a particolato, mentre diminuzione della salinità determina un rilascio del 37% di Poliovirus dal particolato, mentre aumenta l'adsorbimento dal 46% al 96% per il Rotavirus. Ne deriva che in un ambiente "dulciacquicolo" il Polio è rilasciato molto più facilmente che il Rotavirus, mentre in un ambiente marino avviene esattamente il contrario (15). A seguito di forti piogge, virus come i Rotavirus in acque di estuario, a causa del maggiore adsorbimento al particolato e quindi della conseguente maggiore sopravvivenza, possono essere facilmente trasportati in altre zone, potendosi quindi verificare una diffusione maggiore di questi virus rispetto al Polio (15).

Il pH riveste un ruolo fondamentale poiché determina la preponderanza del tipo di carica elettrica del capsido virale. Anche il pH di un ambiente idrico può indurre variazioni sull'adsorbimento delle particelle virali a materiale particolato influenzando le cariche superficiali e la mobilità elettroforetica delle particelle virali. Il pH in cui le cariche elettriche positive e negative del capsido virale sono equivalenti, rappresenta il punto isoelettrico. Ad un pH superiore al punto isoelettrico, la particella virale presenta cariche prevalentemente negative, mentre al contrario, a pH inferiori al punto isoelettrico le particelle virali mostrano cariche prevalentemente positive. Ad es. Reovirus 3 ha un punto isoelettrico a pH 3,8, mentre il Poliovirus ne ha due, uno a pH 4,5 e l'altro a pH 7. Ne deriva che negli ambienti idrici naturali che presentano valori di pH prossimi alla neutralità, sia il Reovirus che il Poliovirus presentano cariche prevalentemente negative (8).

L'adsorbimento è un fenomeno estremamente importante, i virus infatti, nella condizione di "particelle adsorbite" perdono la virulenza e rimangono vitali nell'ambiente per periodi di tempo variabili, in genere maggiori rispetto a quelli registrati per i virus "non adsorbiti" e dipendenti sia dalle condizioni ambientali che dalle caratteristiche virali stesse (14). La Tabella 1 mostra come i tempi di sopravvivenza di virus associati a solidi sospesi siano maggiori di quelli di virus liberi nell'acqua (15).

Tabella 1. Effetto dell'adsorbimento sulla sopravvivenza virale (15).
 SSosp.: solidi sospesi; SS: sedimento soffice; SC: sedimento compatto;
 UFP: Unità Formanti Placca

Campione	Sopravvivenza		Titolo (UFP/100 mL)	
	(giorni)	Iniziale	finale	
<u>Poliovirus</u>				
Acqua	6	$4,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3$	
SSosp.	19	$3,3 \times 10^7$	56	
SS	19	$4,0 \times 10^7$	12	
SC	19	$5,9 \times 10^7$	3	
<u>Rotavirus SA 11</u>				
Acqua	9	$7,7 \times 10^7$	$4,0 \times 10^3$	
SSosp.	19	$9,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^4$	
SS	19	$4,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^2$	
SC	19	$5,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^3$	

I virus possono essere presenti talora in quantità elevate nei sedimenti o nei solidi sospesi di un ambiente idrico ed essere assenti o presenti in numero molto basso nell'acqua degli stessi siti di prelievo (18,19). Le tabelle 2 e 3 mostrano come nell'ambito di campioni di estuario e di liquami, le particelle virali rilevate nella porzione sedimenti siano sempre più numerose di quelle della porzione acqua. In diversi casi si nota l'assenza di virus nell'acqua e la contemporanea e numerosa presenza virale nei sedimenti (Tab.3).

Tabella 2. Virus enterici in acque e sedimenti di estuario (18).

Campioni	Acqua n/L	Sedimenti n/L
1	0,1	830
2	0,45	520
3	0,1	450
4	0,8	500

Tabella 3. Virus enterici in campioni (acqua e sedimenti) prelevati in prossimità di un sito di scarico di acque reflue (A) e in un'area contigua (B) (19).

A		B	
acqua (400-800 L)	sedimenti (300-400 g)	acqua (400-600 L)	sedimenti (300-400 g)
(5)0	(34)2	(5)1	(8)3
(9)0	(41)2	(9)0	(21)5
(8)0	(36)2	-----	-----

Nelle parentesi sono indicati i numeri dei campioni analizzati.

Quando scarichi fognari sono posti in prossimità delle coste i sedimenti, proprio per effetto dell'adsorbimento, risentono dell'influenza di questi scarichi "arricchendosi" di particelle virali. La tabella 4 riporta le percentuali di positività per enterovirus associati ai sedimenti (20). Dai dati mostrati si rileva che la presenza di virus è in diretta correlazione alla vicinanza degli scarichi alla riva: percentuali alte (fino al 100%) di sedimenti positivi per presenza virale sono riscontrate in campioni prelevati da zone con scarichi posizionati a distanza < 500 m dalla riva e a profondità < 10 m. Tali percentuali si abbassano fino a raggiungere lo 0% per distanze e profondità maggiori (Tab.4).

Tabella 4. Enterovirus rilevati in sedimenti marini a diversa distanza dalla costa (20). UFP: Unità Formante Placca

Siti di campionamento	Profondità (m)	Distanza dalla riva (m)	n° di campioni saggiati	UFP/Kg (min-max)	% positività
1	< 10	< 500	5	13 (0-47)	60
	30-50	500-1000	2	8 (7-19)	100
	> 70	> 2000	4	-----	0
2	< 10	< 500	5	38 (7-10)	100
	30-50	500-1000	2	1 (0-3)	50
3	< 10	< 500	4	5 (0-19)	25
	30-50	500-1000	1	-----	0
	> 70	> 2000	1	-----	0
4	< 10	< 500	2	73 (22-125)	100
	30-50	500-1000	3	13 (5-21)	100
	> 70	> 2000	2	4 (0-9)	50
5	< 10	< 500	3	31 (0-66)	67
	30-50	500-1000	3	10 (0-29)	33
	> 70	> 2000	1	-----	0

L'analisi del particolato presente in un determinato ambiente acquista, alla luce di quanto detto, notevole importanza. Il reale pericolo di ignorare i solidi sospesi di un sistema è la falsa sicurezza che deriva dall'analisi, con esito negativo, del mezzo acquoso.

2.2 Adsorbimento in funzione del tipo di particolato

Il particolato presente in un campione ambientale, non presenta sempre le stesse caratteristiche, ma varia sia nelle dimensioni che nella composizione.

Quello proveniente da due campioni diversi avrà caratteri diversi, mentre nell'ambito dello stesso campione possiamo trovare delle differenze a livello dimensionale del particolato. Da uno studio effettuato a Galveston Bay (Texas) è stato rilevato che i solidi sospesi, appartengono ad una fascia ben precisa di particelle caratterizzate da una dimensione $< 3 \mu\text{m}$, mentre le particelle più grossolane, costituiscono il "sedimento soffice" ed il "sedimento compatto" e sono caratterizzate da dimensioni $> 7 \mu\text{m}$ (15). Questi sedimenti, generalmente tendono a stratificarsi sul fondale del corpo idrico, mentre i solidi sospesi rimangono in sospensione e difficilmente sedimentano spontaneamente. La frazione più importante dei materiali presenti in un campione, per ciò che riguarda l'adsorbimento virale, è rappresentata dal particolato di dimensioni $\leq 3 \mu\text{m}$ (15).

Oltre ai solidi sospesi fin qui descritti in campioni di acqua possono essere presenti altri tipi di particelle in sospensione. In acque lacustri e di mare a seguito di fenomeni ampiamente studiati, si possono verificare fioriture o bloom algali (21). Nell'analisi di un campione di questo tipo, ricco di alghe, va indagata anche la porzione solida costituita da questi organismi, potendosi i virus adsorbire ad essi (22,23,24).

Oltre alle alghe si può verificare la presenza, nelle acque di mare, di aggregati di materiale eterogeneo più comunemente conosciuti come "gelatine" o "mucillagini" (21). Trattasi di fenomeni conosciuti da molto tempo. Già nell'800 (25), essi manifestavano delle comparse periodiche nell'ambiente marino. Tale fenomeno era ed è attualmente attribuito a diverse specie algali di diatomee.

In tempi recenti questi fenomeni, ci hanno riguardato da vicino. Il mare Adriatico nel 1989-90-91 è stato interessato al fenomeno della gelatina. Nel 1991 la comparsa della mucillagine è stato un fenomeno meno eclatante rispetto ai precedenti anni.

L'indagine microscopica di tali mucillagini ha evidenziato un raggruppamento eterogeneo, costituito da muco, fango, alghe come diatomee e dinoflagellate (26). La caratteristica rilevante è rappresentata dal muco, prodotto in grosse quantità ed attribuibile a diverse specie algali di diatomee. Le cause dell'induzione di tale produttività mucosa è stata attribuita a diversi fattori come: mare calmo, dilavamento di terreni, fondali bassi ecc. Tra essi anche la maggiore reperibilità di nutrienti da parte delle alghe produttrici di gelatina, attraverso l'aumentata adesività ad essi della mucillagine stessa. Le alghe possono utilizzare questo muco per aderire ai sedimenti, ad altre cellule, a materiale corpuscolato, formando così delle masserelle più meno voluminose, le quali possono spostarsi verticalmente lungo la massa d'acqua e localizzarsi nelle zone più idonee alla loro vitalità. Lo spostamento nella massa d'acqua è dovuto alla produzione di bollicine di gas durante il processo fotosintetico. Tale gas rimane imbrigliato nella matrice mucosa e permette alla masserella di giungere a flottare sulla superficie libera dell'acqua. Inoltre, essendo le alghe, dotate di capacità eterotrofica, possono consumare tale gas per i normali

processi respiratori e discendere di nuovo lungo la colonna d'acqua reperendo così altri nutrienti.

La gelatina del 1988 è stata sottoposta ad indagini e ne è stata attribuita la produzione ad alghe diatomee pennate ad habitat bentonico, appartenenti ai generi *Navicula* e *Nitzschia*. (27). Nel 1988-89 è stata isolata un'alga diatomea pennata *Amphora*, che vive nei sedimenti e produce muco. Tale alga è stata classificata come *Amphora coffeaeformis* var. *perpusilla* (21). Essa risulta essere molto resistente alle condizioni tossiche, come se il rivestimento prodotto la proteggesse dall'esterno.

Oltre al muco, in associazione alla mucillagine, si sono evidenziati numerosi batteri presenti in concentrazioni superiori di quelle dell'acqua circostante. La popolazione batterica eterotrofa inclusa nelle masserelle gelatinose, è di 2 ordini di grandezza superiore a quella dei sedimenti (28). La ricchezza batterica della gelatina non rappresenta un dato sorprendente, in quanto tale habitat è estremamente ricco di nutrienti. Alcuni batteri saranno più favoriti rispetto agli altri e nel corso del fenomeno evolutivo della gelatina si assiste certamente ad un susseguirsi di popolazioni batteriche dovuto all'evoluzione di tale micro-habitat (21). Il particolare substrato nutritivo degradabile costituito dalla mucillagine o gelatina induce aumenti della popolazione microbica. Nel corso di fenomeni registrati e studiati nel 1988 sono stati rilevati incrementi della popolazione batterica in campioni di acqua di mare con gelatina. Una volta scomparso il fenomeno i titoli microbici si sono attestati su valori più bassi (28).

Se i virus possono adsorbirsi al particellato, è presumibile che possano adsorbirsi al particellato presente nella mucillagine o alla mucillagine stessa, essendo le particelle di muco degli eteropolimeri, che presentano cariche superficiali, le quali dipenderanno dall'ambiente circostante (29). Esistono a tale riguardo scarsi riferimenti bibliografici in quanto i rapporti che si possono instaurare tra gelatina ed eventuali virus presenti in un mezzo acquoso e gli eventuali riflessi sull'uomo derivanti da tale associazione rappresentano attualmente un settore di ricerca in via di sviluppo, non ancora sufficientemente approfondito. Da esperienze sullo studio dell'adsorbimento e la sopravvivenza di enterovirus associati ad alcune alghe, si è rilevato che i virus Polio, Echo, Cox hanno tempi di sopravvivenza ridotti in presenza di alghe, proprio in dipendenza dell'adsorbimento (22,23,24). Si evidenzia che l'infettività, in tale contesto, dipende dall'influenza di molteplici fattori ambientali, dal tipo virale e dal tipo di alghe coinvolte (22).

Le esperienze sin qui riportate depongono in favore del concetto che in effetti il fenomeno di adsorbimento-deadsorbimento delle particelle virali al particellato è fortemente influenzato dalle condizioni fisiche-chimiche e biologiche degli ambienti in cui vengono raccolti.

Quanto detto evidenzia sicuramente le numerose difficoltà operative di trattamento di campioni ambientali carichi di materiali in sospensione, di alghe, di fibre, di terra, ecc. E' necessaria quindi l'applicazione di procedure particolari di indagine, tali da permettere una corretta ed efficiente eluizione (deadsorbimento) delle eventuali particelle virali presenti in detti materiali.

3. Metodologie di base per l'esame virale di materiale particolato

Allo stato attuale è possibile disporre di metodiche di rilevamento virale già in via di standardizzazione per ciò che concerne le indagini sulle acque, siano esse marine, lacustri o potabili (30). L'indagine virale sui materiali solidi è più complessa. Infatti per il

fornire rese migliori di altre. Nell'ambito dei metodi applicabili all'esame virale del particellato, la fase fondamentale é quella di produrre il deadsorbimento dei virus.

Si deve trattare il particellato con opportuni eluenti in grado di eluire, cioè "staccare" i virus dal particellato. Le soluzioni utilizzate come eluenti devono essere poste in contatto con il materiale particellato da cui i virus devono essere estratti. Affinché l'eluizione sia efficace il tempo di contatto dell'eluente con i sedimenti non deve essere inferiore ai 5' e comunque dai 5 ai 15 minuti, mantenendo continuamente in agitazione la miscela con un vortex o un agitatore magnetico (13,19,31).

L'agitazione é importante nella fase elutiva in quanto aumenta il contatto tra l'eluente ed il particellato, favorendo così la liberazione delle particelle virali nel mezzo acquoso rappresentato dall'eluente.

La fase finale del processo dell'eluizione prevede una separazione dell'eluente dal particellato con recupero del solo eluente. La centrifugazione permette la sedimentazione di tutto il materiale grossolano e la permanenza nel sovrantante delle particelle virali eventualmente presenti, che non precipitano anche dopo la centrifugazione per evidenti motivi dimensionali.

Una volta raccolto, il sovrantante, può essere saggiato direttamente sulle colture cellulari. Nella maggior parte dei casi, é comunque necessario riconcentrare l'eluato, poiché non é possibile saggiarne quantità elevate su colture cellulari. Le pratiche di riconcentrazione, possono essere applicate mediante: precipitazione acida o flocculazione organica (13,19,31,32), adsorbimento-eluizione o ultrafiltrazione ecc. (33). La fase di riconcentrazione, può prevedere anche l'utilizzo di agenti anti-caotropici. Tali composti sono in grado di ridurre la solubilità di sostanze idrofobiche nell'acqua. L'aggiunta di essi all'eluato aumenta visibilmente la flocculazione. Ad esempio il solfato di ammonio (2M), determina un'efficienza di recupero virale del 24% contro il 2,4% ottenuto senza l'aggiunta dell'agenti anti-caotropico (13). L'aggiunta di cloruro di magnesio 0,5M in presenza di solfato di ammonio incrementa ulteriormente tale percentuale di recupero fino al 36% (13).

Possono essere utilizzati come flocculanti anche polimeri organici come il polietilen-glicole ed il cat-floc (flocculante cationico; Colgen Pittsburgh, Pa) (13).

Il recupero virale può variare molto in funzione del tipo di soluzione utilizzata per realizzare la fase dell'eluizione, per cui la scelta dell'eluente diventa molto importante.

Nella eluizione degli enterovirus, buoni risultati sono stati ottenuti utilizzando una soluzione di estratto di carne al 3% a pH 9-9,5 (16). Molto dipende dalla natura del particellato in esame, dall'ambiente da cui proviene e dai fattori influenzanti l'eventuale adsorbimento con i virus. Con l'utilizzo dell'estratto di carne al 3% e a pH 9-9,5 sono state rilevate, ad esempio, eluizioni corrispondenti ad un valore inferiore all' 8% dei virus dai sedimenti marini, mentre sui sedimenti dulciacquicoli con lo stesso eluente si sono evidenziati valori dal 23% al 59% (16). L'estratto di carne può essere utilizzato in concentrazioni diverse dal 3% e cioè dal 6 al 10%, ma concentrazioni così elevate, nella fase di riconcentrazione, possono indurre fenomeni di tossicità (34).

Possono essere utilizzati altri eluenti come il citrato di sodio, l'urea-lisina, EDTA-glicina, oppure lo stesso estratto di carne in associazione ad altri composti, così da costituire soluzioni eluenti più efficaci.

L'efficienza di un composto eluente può essere influenzata anche dal pH (13). Nella tabella 5 sono riportate le percentuali di recupero per Poliovirus da sedimenti con alcuni composti eluenti a pH diversi (13,17).

Tabella 5. Percentuali di recupero di Poliovirus da sedimenti di estuario con vari eluenti, alcuni dei quali a diversi valori di pH (13,17).

Eluente	% di recupero a diversi pH					
	5,5	7,5	9,0	9,5	10,5	11
Urea 4 M + lisina 0,05 M	--	--	44	--	--	--
Estratto di carne al 3%	5,0	20	--	1,6	22	--
Estratto di carne al 3% + glicina 0,25 M	--	18	--	5,7	14	--
Estratto di carne al 3% + EDTA 0,05 M	--	12	--	7,4	16	--
Estratto di carne al 3% + glicina 0,25 M + EDTA 0,05 M	--	20	--	7,1	17	--
Citrato di sodio 0,05 M	--	4,4	--	4,9	--	--
Estratto di carne al 3% + citrato 2 M	--	40	--	--	--	--
Glicina 0,25 M + EDTA 0,05 M	--	--	--	--	--	< 0,1

Come eluenti possono essere utilizzati anche gli agenti caotropici, composti ionici a basso peso molecolare, che aumentano la solubilità del particellato nel mezzo acquoso. Tra essi il nitrato di sodio, il cloruro di sodio o di potassio, il tricloroacetato di sodio e l'idrocloruro di guanidina (13). Le percentuali di recupero registrate per questi composti sono piuttosto basse: 0,02-0,08% (13). Tali agenti, se utilizzati in associazione ad eluenti proteici, danno percentuali maggiori di recupero (13). Ciò è in diretta dipendenza dalle interazioni che si instaurano tra virus e particellato che sono di natura idrofobica ed idrofilica. La funzione delle molecole proteiche dell'estratto di carne è probabilmente riconducibile alle loro piccole dimensioni, che permettono loro di intercalarsi tra i virioni, di maggiori dimensioni, ed i siti virali di adsorbimento riducendo così le mutue forze attrattive instauratesi. Gli ioni chaotropici possono contribuire ad aumentare il deadsorbimento dei virioni, con conseguente diminuzione di energia del sistema, attraverso l'inibizione del movimento dei virioni parzialmente idrofobici nel mezzo liquido (13).

Nella tabella 6 sono riportate le percentuali di recupero di Poliovirus da sedimenti mediante l'utilizzo di miscele di eluenti proteici e caotropici.(13).

Dai dati riportati nelle tabelle 5 e 6 si rileva che le percentuali maggiori di recupero per Poliovirus da sedimenti sono ottenute quando si usano come eluenti: soluzioni di estratto di carne al 3% (20-22%), soluzioni di estratto di carne al 3% con aggiunta di nitrato di sodio 2M (42% - 71%) o di cloruro di sodio 3M (49%) o citrato di sodio 2M (40%) o con soluzione di urea e lisina (44%).

L'efficienza elutiva di soluzioni diverse può variare in dipendenza del tipo di sedimento da trattare. Nella tabella 7, sono riportati i recuperi di virus ottenuti con l'utilizzo degli stessi eluenti su sedimenti marini e dulciacquicoli (17). Dall'esame dei dati si può rilevare come l'estratto di carne presenti efficienza elutiva maggiore per i sedimenti di acqua dolce rispetto a quelli di acqua di mare.

Tabella 6. Eluizione del Poliovirus da sedimenti di estuario con una miscela di agenti caotropici e soluzione di estratto di carne (13).

Estratto di carne al 3% + agenti caotropici		Percentuali di recupero			
		pH			
		5,5	6,5	7,5	9,5
Sodio tricloro acetato	0,1 M	---	---	26	8,3
	1 M	---	---	0,7	6,0
Guanidina idrocloruro	0,1M	---	---	0,6	---
	1 M	---	---	< 0,1	---
Nitrate di sodio	1 M	36	---	29	19
	2 M	71	42	46	---
Cloruro di sodio	2,9M	49	---	---	---
Cloruro di potassio	2,3M	42	---	---	---

L'estratto di carne é l'eluente più utilizzato per l'eluizione dei virus da acqua di mare (35), e superficiale (36), da fanghi (37) ecc. Esso dà ottimi risultati per l'eluizione da sedimenti di ambienti acquei "dolci" (51%), meno buoni, sembra, per quelli marini (8%) (Tab.7).

Tabella 7. Eluizione di Poliovirus da sedimenti acquatici di diversi habitat (17).

Sedimenti	Eluenti	% eluizione
Sedimenti marini	Urea 4M + lisina 0,05 M	44
	Estratto di carne 3%	9
	Caseina purif. 1%	34
Sedimenti di acqua "dolce"	Urea 4M + lisina 0,05 M	44
	Estratto di carne 3%	56
	Caseina pura 1% + Tween 80 0,1%	47
	TCA 1M + glicina 1 M	65

TCA: Tricloroacetato di sodio.

4. Prove sperimentali per il rilevamento di virus da gelatine e solidi sospesi in campioni di acqua di mare.

Come già detto in precedenza, non vi sono attualmente dei metodi disponibili e standardizzati per il rilevamento dei virus da campioni di particolato.

Diversi Autori hanno applicato metodiche di trattamento di materiale particolato che prevedevano l'utilizzo, ad esempio, di una soluzione di estratto di carne al 3% pH 7,5 con aggiunta di citrato di sodio (2M), oppure di una soluzione di estratto di carne al 3% pH 5,5 con aggiunta di nitrato di sodio (2M), oppure una soluzione di estratto di carne al 6% pH 10,5, o ancora, una soluzione tamponata di estratto di carne al 10% pH con aggiunta di acido citrico e Na_2HPO_4 ottenendo percentuali di recupero di particelle virali variabili dal 40 - 71% (13,19,38,39,40).

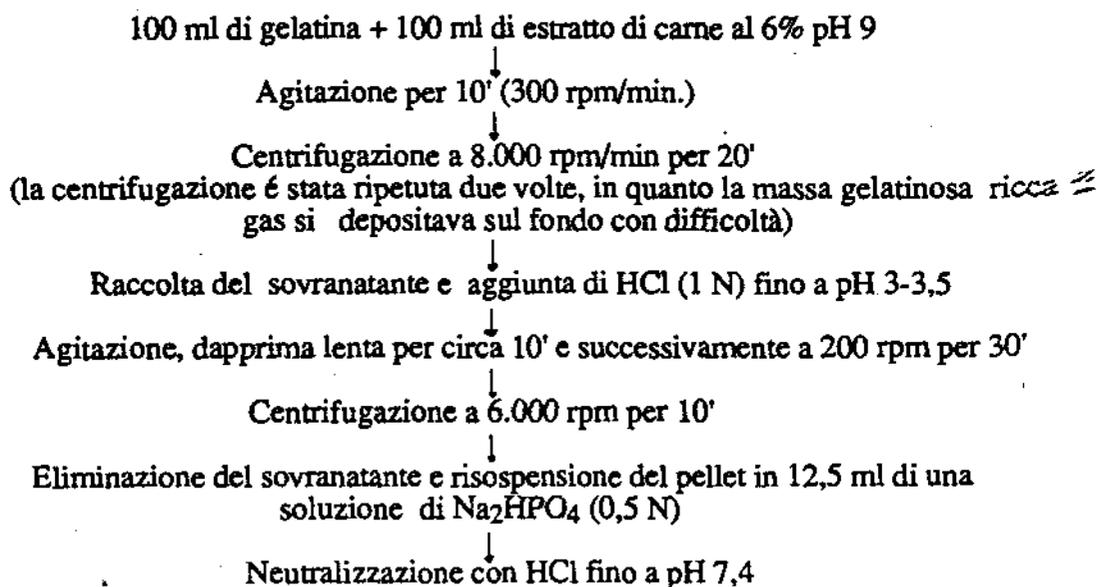
Nella fase sperimentale sono state provate nel nostro laboratorio alcune metodiche di rilevamento virale su campioni di gelatina e solidi sospesi di acque di mare.

4.1 Campioni di gelatina.

Questi metodi sono stati applicati nell'ambito di un'indagine condotta su campioni di acqua di mare provenienti dal mare Adriatico, e prelevati durante il fenomeno di bloom algale verificatosi nell'estate del 1991.

Sono giunti nel nostro laboratorio un campione (n°1) costituito soltanto da materiale gelatinoso (circa 1L), ed un campione di acqua (n°2) (circa 8L) contenente materiale gelatinoso.

Il campione n° 1 (gelatina) è stato così trattato:



L'aliquota, così ottenuta, è stata saggiata direttamente sulle colture cellulari per l'evidenziazione degli effetti citopatici, effettuando preliminarmente un trattamento di decontaminazione con cloroformio.

Il campione n° 2 (acqua con gelatina), si presentava torbido con molto materiale in sospensione. Per concentrare tale campione è stato necessario effettuare una prefiltrazione con un setaccio grossolano (275 mesh). Gli 8 litri dell'acqua prefiltrata sono stati filtrati su membrane elettropositive (1 MDS Virosorb Cuno Division, Meriden-USA) e la successiva eluizione è stata effettuata con 30 mL di una soluzione di estratto di carne al 3% pH 9. Il materiale grattato dal setaccio è stato risospeso in 100 ml prelevati dagli 8 litri di acqua passata attraverso il setaccio.

100 ml di solidi risospesi in acqua + 100 ml di estratto di carne al 6% pH 9

↓
Agitazione magnetica per 30'

↓
Centrifugazione a 3.000 rpm/min per 30'

↓
Eliminazione del pellet

↓
Precipitazione acida sul sovrinatante

↓
Si prosegue come già descritto per la gelatina

Le aliquote dell'acqua e dei solidi sospesi sono state saggiate direttamente sulle colture cellulari per l'evidenziazione degli effetti citopatici, effettuando preliminarmente un trattamento di decontaminazione con cloroformio.

I risultati hanno messo in evidenza assenza di virus in tutti i campioni esaminati, sia acqua, sia gelatina, sia solidi sospesi. Questi risultati evidenziano che un fenomeno così eclatante, tipico delle fioriture algali non sembra supportare la presenza di virus enterici. Uno studio condotto per il rilevamento di Enterovirus associati a gelatine, non ha messo in evidenza particelle virali associate a questa matrice. Nell'ambito della stessa indagine non sono state rilevate quantità elevate di coliformi e streptococchi nelle gelatine. Per cui sembrerebbe che fenomeni di questo tipo non siano correlati ad incrementi di inquinamento di natura fecale (41).

Da prove sperimentali effettuate in laboratorio su campioni di gelatina infettati sperimentalmente con Poliovirus abbiamo rilevato, utilizzando come eluente una soluzione di estratto di carne al 3% pH 9, una efficienza di recupero delle particelle virali pari circa al 10% (comunicazione personale).

È possibile che non ci fossero virus enterici nei campioni da noi analizzati, ma è anche possibile che la negatività evidenziata sia attribuibile alla bassa percentuale di recupero del metodo utilizzato. Conseguentemente riteniamo necessario saggiare altre metodiche di estrazione al fine di rilevare tra esse quella più idonea a più elevato rendimento. Si è già parlato della mancanza di metodiche standardizzate per l'esame di materiale particolato da campioni di acqua. Inoltre non può essere applicata un'unica metodica su campioni provenienti da ambienti diversi. Schwartzbrod ritiene che non sia possibile ricavare un metodo universale per la concentrazione virale applicabile a tutti i tipi di sedimenti e fanghi. Infatti ci sono differenze di recuperi di particelle virali sia dal punto

di vista quantitativo che qualitativo applicando tecniche diverse in dipendenza dalla diversa qualità dei campioni (34).

Bibliografia

1. RAO, V.C., SEIDEL, K.M., GOYAL, S.M., METCALF, T.G., MELNICK, J.L. 1984. Isolation of enteroviruses from water suspended-solids and sediments from Galveston Bay: Survival of Poliovirus and Rotavirus adsorbed to sediments. Appl. Environ. Microbiol. 48 (2): 404-409.
2. GERBA, C.P., ROSE, J.B. 1990. Viruses in source and drinking water. In "Drinking water microbiology" Mc Feters G.A. Ed. Springer-Verlag. New York 18: 380-396.
3. AULICINO, F.A. 1991. Il rilevamento dei virus enterici. In "Virus enterici nelle acque epidemiologia e tecniche di isolamento e identificazione". Rapporti ISTISAN 91/26 (ISSN 0391-1679) 56-93.
4. MINOR, P.D., BELL, E.J. 1990. Picornaviridae. In "Principles of Bacteriology, Virology and Immunity". Collier L.H., Timbury M.C. Eds vol. 4 cap. 26.
5. MELNICK, J.L., RENWICK, V. 1980. Infectivity titers of enteroviruses as found in human stools. J. Med. Virol. 5: 205-220.
6. SLADE, J.S., FORD, B.J. 1984. Discharge to the environment of viruses in wastewater, sludge and aerosols. In "Viral pollution of the environment" Berg.G. Ed. CRC Press. 1: 3-15.
7. HURST, C.J. 1989. Detecting viruses in water. J. Am. Wat. Works Ass. 81: 71-80.
8. VAUGHN, J.M. LANDRY, E.F. 1983. Viruses in soils and groundwaters. In "Viral pollution of the environment" G. Berg Ed. 9 :163-204.
9. VILKER, V.L., KAMDAR, R.S. and FROMMHAGEN L.H. 1980. Capacity of activated sludge solids for virus adsorption. Chem. Eng. Comm. 4: 569-573.
10. SOBSEY, M.D., JONES B.L. 1979. Concentration of poliovirus from tap-water using positively charged microporous filters. Appl. Environ. Microbiol. 37: 588-595.
11. FARRAH, S.R., SHATT, D.O., INGRAM, L.O. 1981. Effects of chaotropic and anti-chaotropic agents on elution of poliovirus adsorbed on membrane filters . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1229-1235.
12. SCRABE, D.G. 1979. The picornavirion: structure and assembly. In "The molecular biology of picornaviruses". R.Perez-Bercoff (ed.) 1-23. Plenum Publishing Corp. New York.
13. WAIT, D.A., SOBSEY, M.D. 1983. Method for recovery of Enteric Viruses from estuarine sediments with chaotropic agents. Appl. Environ. Microbiol. 46 (2): 379-385.

14. BLOCK, J.K. 1983. Viruses in environmental waters. In "Viral pollution of the environment" G. Berg ED. CRC Press 7: 117-137.
15. METCALF, T.G., RAO, V.C., MELNICK, J.L. 1984. Solid-associated viruses in a polluted estuary. Monog. Virol. 15: 97-110.
16. BITTON, G. 1975. Adsorption of viruses onto surfaces in soil and water. Wat. Res. 9:473-484.
17. BITTON, G., CHOU, Y.J., FARRAH, S.R. 1982. Techniques for virus detection in aquatic sediments. J.Virol. Meth. 4:1-8.
18. GERBA, C.P., SMITH, E.M., MELNICK, J.L. 1977. Development of a quantitative method for detecting Enteroviruses in Estuarine Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 34 (2): 158-163.
19. GOYAL, S.M., ADAMS, W.N., O'MALLEY, M.L., LEAR, D.W. 1984. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle Atlantic region. Appl. Environ. Microbiol. 48 (4): 758-763.
20. BOSCH, A., LUCENA, F., GIRONES, R., JOFRE, J. 1988. Occurrence of enteroviruses in marine sediment along the coast of Barcelona, Spain. Can. J. Microbiol. 34: 921-924.
21. ZANON, V. 1929. Esame di un campione di "Mare sporco" del golfo di Fiume. Memorie della Pontificia Accademia dei N. Lincei, Serie II XV: 449-528.
22. PATTI, A.M., DE FILIPPIS, P., GABRIELI, R., PANA', A., VOLTERRA, L., AULICINO, F.A. 1990. Influenza delle alghe sul destino dei virus in acque di mare. L'Igiene Moderna 93(6): 1067-1071.
23. PATTI, A.M., DE FILIPPIS, P., GABRIELI, R., AULICINO, F.A., DIVIZIA, M., VOLTERRA, L., PANA', A. 1990. Influence of algae on ultrafiltration for enteroviruses recovery from seawater. Ann. Ig. 2: 35-38.
24. PATTI, A.M., DE FILIPPIS, P., GABRIELI, R., AULICINO, F.A., VOLTERRA, L. 1991. Interactions between the human viruses and unicellular algae in marine environment. Ann. Ig. 3: 101-104.
25. BRUNO, M.; COCCIA, A., VOLTERRA, L. 1991. Isolation of an Amphora coffeaeformis var. perpusilla from mucilages appeared in the Adriatic sea (summer 1988). Wat. Air & Soil Pollution (in corso di pubblicazione).
26. VOLTERRA, L., BRUNO, M. 1991. Il problema delle mucillagini. Lotti e Associati. Società Ingegneria Spa Roma. Comitato Tecnico Scientifico Ambientale. Collana di Ingegneria Ambientale. Quaderno n° 4. Luglio 1991 3-23.
27. BOMBACE, G., PICCINETTI, C. 1989. Le fioriture algali nell'Adriatico. Ing. Amb. 18 (7/8): 401-405.

28. HERNDL, G.J., PEDUZZI, P. 1988. The ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the Northern Adriatic sea. Mar.Ecol. 9 (1): 79-90.
29. FOWLER, S.W., KNAUER, G.A. 1986. Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column. Prog.Oceanog. 16: 147-194.
30. AULICINO, F.A., MUSCILLO, M., PATTI, A.M., ORSINI, P., VOLTERRA, L. 1990. Virus enterici nelle acque: epidemiologia e tecniche di isolamento e di identificazione. Rapporto Istisan 91:26. ISSN 0391-1675.
31. MELNICK, J.L., GERBA, C.P. 1980. Viruses in Water and Soil. Publ.Health Rep. 9: 185-213.
32. DAHLING, D.R., WRIGHT, B.A. 1986. Recovery of viruses from water by a modified flocculation procedure for second-step concentration. Appl.Environ.Microbiol. 51(6): 1326-1331.
33. BERMAN, D., ROHR, M.E., SAFFERMAN, R.S. 1980. Concentration of Poliovirus in water molecular filtration. Appl.Environ.Microbiol. 40 (2): 426-428.
34. SCWARTZBROD, L., BOSCH, A., LUCENA, F., GIRONES, R., BERIL, C. and JOFRE, J. 1989. Recovery of solid-associated viruses: evaluation of different procedures. Zbl.Bact.Hyg.B 188: 559-564.
35. BITTON, G., FELDBERG, B.N., FARRAH, S.R. 1979. Concentration of Enteroviruses from sea-water and tap-water by organic flocculation using non-fat dry milk and casein. Water, Air & Soil Pollution 2: 187-192.
36. KATZNELSON, E., FATTAL, B., HOSTOVESKY, T. 1976. Organic-flocculation: an efficient second step concentration method for the detection of viruses in tap-water. Appl.Environ.Microbiol. 32: 638-639.
37. GLASS, J.S., VAN SLUIS, R.J. and YANKO, W.A. 1978. Practical method for detecting Poliovirus in anaerobic digester sludge. Appl.Environ.Microbiol. 35: 983-987.
38. BERG, G., SAFFERMAN, R.S., DAHLING, D.R., BERMAN, D., HURST, C.G. 1984. USEPA manual of methods for virology. EPA-600/4-84-013. pp: 5.32-5.36.
39. HURST, C.J., SCHAUB, S.A., SOBSEY, M.D., FARRAH, S.R., GERBA, C.P. et al. 1991. Multilaboratory evaluation of methods for detecting enteric viruses in soils. Appl.Environ.Microbiol. 57 (2): 395-401.
40. GERBA, C.P. 1983. Methods for recovering viruses from the water environment. In "Viral Pollution of the Environment" G. Berg Ed. CRC Press (2): 19-32.
41. AULICINO, F.A., BONADONNA, L., BUCCI, G., et al. 1989. La componente microbiologica durante il fenomeno del "mare sporco". Mare Adriatico: agosto 1988. Ing.San. 2: 23-26.

METODI DI IDENTIFICAZIONE DI VIRUS ENTERICI IN CAMPIONI AMBIENTALI.

M. MUSCILLO

Laboratorio di Igiene Ambientale- Istituto Superiore di Sanità - Roma.

Introduzione

I virus enterici scaricati nel sistema fognario assieme alle feci ed all'urina possono contaminare successivamente le acque superficiali. Per tale motivo le normative a tutela sia della qualità delle acque destinate al consumo umano che di quelle destinate alla balneazione prevedono la valutazione del parametro *Enterovirus*.

I virus enterici sono particolarmente diluiti nei campioni ambientali in conseguenza della diluizione che ha luogo quando i reflui fognari si mescolano con le acque superficiali e pertanto l'analisi di un campione ambientale per la valutazione del parametro enterovirus richiede un processo a tre stadi: a) concentrazione, b) isolamento e c) identificazione.

I primi due stadi sono stati trattati nelle relazioni precedenti. Essi permettono di dare indicazioni presuntive di presenza o assenza di particelle virali sulla base dell'effetto citopatico su monostrati di colture di cellule.

La vasta eterogeneità delle specie virali appartenenti al genere enterovirus, che sono oltre un centinaio, e la possibilità di rilevare in un campione ambientale una vasta gamma di virus enterici non-enterovirus rende indispensabile una successiva identificazione dei virus isolati inizialmente sulla base dell'effetto citopatico (CPE) sulle colture cellulari. Le metodiche tradizionali sono alquanto inefficaci a risolvere questo problema, per vari motivi che possono essere o la scarsa sensibilità del metodo per quanto riguarda la microscopia elettronica o la mancanza di antisieri idonei per quanto riguarda le tecniche immunodiagnostiche (1 - 3).

Il principio ispiratore delle metodiche basate sull'uso di sonde molecolari "universali" cioè a specificità di gruppo, sono le somiglianze che possono esistere a livello molecolare tra i genomi di virus appartenenti allo stesso genere oppure tra virus della stessa specie. Gli enterovirus per esempio, hanno un genoma costituito da una singola molecola di RNA lunga circa 7400 basi nucleotidiche (4) divisa in regioni codificanti proteine di rivestimento e regioni non tradotte depositarie dei meccanismi d'azione del virus stesso (5). Queste regioni non codificanti per nessuna proteina hanno un significato filogenetico a causa della presenza di numerosi tratti, considerati le vestigia di un virus ancestrale comune, che sono uguali base per base ai corrispondenti tratti di specie diverse dello stesso genere (6, 7). Utilizzando come sonda un cDNA complementare a queste regioni ricavato da virus precedentemente clonati, è stato possibile sviluppare metodiche di identificazione molecolare aventi specificità di gruppo cioè in grado di stabilire la presenza o meno di enterovirus, come gruppo e non come singole specie virali, nel campione esaminato (8-12).

La ricerca di altri virus enterici più diffusi cioè i Reovirus e Rotavirus si basa anch'essa su una caratteristica molecolare peculiare di questi virus che li differenzia dagli enterovirus (11). Questi virus infatti hanno un genoma costituito da 10 a 11 doppi filamenti di RNA che possono essere analizzati mediante metodiche elettroforetiche su gel di poliacrilammide. Altri virus enterici come per es. gli Adenovirus possono essere diagnosticati basandosi sul principio che il loro DNA genomico è suscettibile di essere tagliato in una serie più piccola di frammenti. L'analisi elettroforetica di questi frammenti detta "mappa di restrizione" permette di risalire alla identificazione degli adenovirus (13).

E' chiaramente impossibile identificare tutte le specie virali che possono contaminare un'acqua, ma l'identificazione anche di una sola specie può essere un indice di fecalizzazione e quindi un indicatore di rischio (14). A tale scopo abbiamo messo a punto una strategia di identificazione molecolare in cui ad una prima fase di screening mediante "dot-blot" ed elettroforesi verticale su gel di

poliacrilammide (PAGE) dei virus isolati su colture cellulari, segue una seconda fase di caratterizzazione molecolare mediante "Northern-blot", delle specie virali "patogene".

Tali metodiche, semplificate e standardizzate, costituiscono la routine di un lavoro di gruppo all'interno dell'ISS e probabilmente potranno in tutto o in parte, trovare in futuro applicazione a livello di operatori periferici. Poichè è indispensabile uniformare le metodiche di identificazione, onde poterle proporre a livello nazionale ed internazionale, si descrivono nei dettagli i protocolli dei metodi di routine utilizzati per l'identificazione dei virus enterici; essi sono stati applicati finora ai lisati di cellule BGM infettate con campioni concentrati di acque di mare.

1. Materiali e metodi

1.1. Sonde molecolari a specificità di gruppo e di sub-gruppo.

Questo materiale richiede una preparazione complessa seguendo protocolli classici (15) e che può anche essere demandata ad un solo centro specializzato o, in alternativa, sostituito da oligonucleotidi di sintesi reperibile commercialmente.

Per i particolari delle metodiche si rimanda a quanto già descritto nel Rapporto Istisan del corso precedente (10).

Le sonde utilizzate routinariamente negli esperimenti di ibridazione sono di due tipi:

1.1.1- Sonde a larga specificità di gruppo.

Esse corrispondono entrambi al 5' non tradotto degli enterovirus:

a) il frammento *Bam*HI₂₂₀₋₆₇₀ proviene dal cDNA del poliovirus I clonato nel plasmide pVR106, un dono generoso del Prof. Vincent Racaniello (4). Il plasmide pVR106 con-

tiene il doppio filamento di DNA trascritto dall'RNA genómico del poliovirus 1 successivamente inserito (clonato) nel genoma del plasmide pBR322.

b) il frammento *HindIII/BamHI*₁₋₅₃₁ proviene dal cDNA del coxsackievirus B4 clonato nel plasmide pGEM, un dono generoso del Prof. Owen Jenkins (16).

L'uso contemporaneo di queste due sonde è in grado di identificare la maggior parte degli enterovirus.

1.1.2. Sonde a specificità di subgruppo.

Queste sono a specificità più ristretta, hanno sequenze corrispondenti alla regione pV1 degli enterovirus:

a) il frammento *PstI*₂₂₁₄₋₃₃₈₇ ricavato dal cDNA del poliovirus 1 clonato, ed il frammento *PstI*₂₅₇₃₋₃₂₇₅ ricavato dal cDNA di coxsackievirus B4 clonato.

L'uso alternativo di queste sonde permette di identificare gruppi di poliovirus o di coxsackievirus.

Purtroppo, attualmente, la mancanza di echovirus clonati non permette di fare altrettanto per l'individuazione degli echovirus.

1. 2. Analisi di 1° Livello: screening degli enterovirus.

1.2.1. Identificazione dei virus patogeni (poliovirus, echovirus e coxsackievirus) in ottemperanza alle normative vigenti: preparazione dell'RNA e sua ibridazione con le sonde molecolari mediante dot-blot.

La preparazione di questo materiale deve avvenire in condizioni RNase-free secondo quanto descritto in Sambrook et al (15), poichè l'RNA degli enterovirus è soggetto a degradazione enzimatica ad opera delle endonucleasi batteriche similmente a quanto succede per l'RNA eucariotico.

In provettine Eppendorf da 1.5 ml 0.6 ml di lisato cellulare di ciascun campione da analizzare e di ciascun controllo positivo e negativo, sono sottoposti a proteolisi enzimatica per 30' a 37°C in presenza di 200 µl di una miscela d'incubazione contenente 1.6 mg/ml di proteinase-K

in Tris-HCl 0.4 M pH 7.5, EDTA 5 mM, NaCl 0.6 M, sodio dodecilsolfato (SDS) 4%. Successivamente il digesto enzimatico si estrae con 0.6 ml di fenolo equilibrato con Tris 0.1 M pH 8, agitato e quindi centrifugato a 15.000 rpm per 5' a 4°C in centrifuga refrigerata Sigma 2K-15 (B. Braun, Milano). 0.6 ml della fase superiore si riestraggono con 0.6 ml di cloroformio:alcol isoamilico 24:1 per eliminare il fenolo disciolto nella fase acquosa che potrebbe inibire la precipitazione degli acidi nucleici. La miscela viene centrifugata come sopra, quindi 0.45 ml della fase superiore vengono trasferiti in un'altra Eppendorf. Gli acidi nucleici si precipitano con 0.1 vol. di NaOAc 3.3 M pH 5.2 e 1 vol. di isopropanolo freddo (-20°C). Dopo una notte a -20°C o 30' a -80°C, gli acidi nucleici precipitati si pellettano per 30' a 15.000 rpm a 0°. Il pellet prima si lava con etanolo all'80% poi si liofilizza in evaporatore rotante "Christ Alfa RVC" (B. Braun, Milano). Dopo aver ridisciolti il pellet con 100 µl di TE (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM), per denaturare gli acidi nucleici si aggiungono 1 vol. di SSC 20x e 0.5 vol. di formaldeide 38% (w/v), e si incuba a 65°C per 15' (SSC 1x= NaCl 0.15 M, sodio citrato 0.015 M pH 7). La reazione si blocca in ghiaccio e quindi si sposta su filtro di nylon, Hybond-N+ (Amersham, UK). Il filtro si equilibra prima in SSC 10x e quindi si monta su apposito apparato per filtrazione Hybridot, (Gibco-BRL) collegato ad una pompa da vuoto ad acqua. Dopo la deposizione dei campioni, i pozzetti vengono lavati con SSC 10x. L'RNA deposto si fissa covalentemente alla matrice del nylon per esposizione diretta ai raggi UV a 312nm per 2' su transilluminatore "Spectroline" (Spectronics Corp., New York). I filtri così trattati, se non usati subito, si conservano a -20°C in sacchetti di plastica Kapak/Scotchpak (Kapak Corporation, Minneapolis, USA) e sigillati termicamente.

Ogni filtro viene incubato in "roller bottle" con 10 ml di miscela di preibridazione [formamide 50% - sodio fosfato 50 mM pH 6.5 - SDS 0.1% - soluzione Denhardt 5x (Ficoll-400 0.02%, albumina di siero bovino 0.025%, e polyvinyl pyrrolidone 0.02%) - SSC 5x - 250 µg/ml di DNA di sperma di aringa denaturato] a 42°C per una notte in incubatore per "roller bottle" GFL (GFL, Burgwedel, Germa-

nia). La stessa miscela di preibridazione si recupera, si aggiungono 2 ml di dextran solfato 50% e 10^7 - 10^8 cpm/filtro di sonda marcata con [alfa- 32 P]dCTP, 3000 Ci/mM, mediante "nick translation kit" (Gibco-Brl, Life Technologies, Inc. Gathersburg, MD, USA) secondo le indicazioni del fabbricante. La miscela così modificata costituisce la miscela di ibridazione. Essa si rimette nella bottiglia contenente il filtro preibridato e quindi lasciata incubare nelle stesse condizioni per un'altra notte. Alla fine dell'incubazione il filtro si lava in condizioni di bassa stringenza. Mediante agitazione continua su agitatore orizzontale GFL, il filtro radioattivo viene lavato tre volte con 150 ml di SSC 2x ed SDS 0.1% per 10 min a t.a. seguiti da altri tre lavaggi con 150 ml di SSC 0.1x, SDS 0.1% a 42°C; infine due volte con 100 ml di SSC 3x per rimuovere l'SDS dai filtri. Il filtro radioattivo, avvolto in pellicola di cellophan, si mette a contatto di una lastra autoradiografica Kodak XAR5 in una cassetta da esposizione (Wolf X-Ray Corporation, USA, munita di una coppia di schermi intensificanti, per un periodo variabile da 12 a 72 h a -80°C. In genere si utilizza una coppia di lastre per volta, la prima si sviluppa dopo 12 ore e sulla base dei segnali rilevati si determina il tempo di esposizione della seconda lastra.

La rimozione della sonda marcata, cioè lo "stripping" dei filtri già ibridati si esegue secondo le indicazioni della ditta fornitrice (Amersham) con qualche modificazione. Ogni filtro viene lavato a 75°C per 1.5 h in Tris-HCl 5 mM pH 8, EDTA 2mM, 0.1x Denhardt e quindi riesposto nuovamente per controllare se la radioattività è stata completamente rimossa. Le condizioni di preibridazione e ibridazione del filtro strappato sono quelle descritte sopra. Un filtro così trattato è possibile reibridarlo fino a 6 volte.

1.2.2. Identificazione di virus enterici non-enterovirus mediante elettroforesi verticale in gel di poliacrilammide (PAGE).

Questa fase dell'identificazione viene eseguita per

analizzare quei campioni che pur avendo manifestato effetto citopatico sulle cellule risultano negativi al dot-blot. Generalmente sono reovirus, i quali si replicano facilmente sulle cellule BGM analogamente agli enterovirus. Questo tipo di approccio è volto soprattutto ad un'analisi epidemiologica della contaminazione virale di un'acqua.

L'elettroforesi viene effettuata sostanzialmente nelle condizioni descritte precedentemente (11). Si riportano ora i dettagli del metodo ottimizzato. Queste operazioni non necessitano di condizioni RNase-free in quanto l'RNA dei virus segmentati è particolarmente resistente alle endonucleasi batteriche.

La lastra di gel (16 x 16cm x 0.75 mm) è costituita da due regioni una inferiore al 10% di acrilammide, ove avviene la separazione vera e propria delle molecole di RNA (separating gel), ed una superiore al 3% (stacking gel), ove, durante la fase iniziale della corsa elettroforetica, avviene la concentrazione della soluzione caricata.

Il modo più comodo e riproducibile per l'esecuzione di un PAGE è quello di preparare una soluzione madre di acrilammide:bis-acrilammide 29:1 in acqua, di solito 100 ml, (per brevità questa soluzione si chiama acrilammide al 30%), si filtra su Nalgene 0.45 μ m e si conserva a +4°C.

Prima di preparare la miscela completa di polimerizzanti si monta un "sandwich" composto da una coppia di vetri, silanizzati con "Repel-silane" (Pharmacia-LKB), distanziati da due striscette calibrate di PVC (generalmente hanno spessore =0.75 mm) poste ai bordi laterali. Si sigilla la parte inferiore dei vetri e tenendo verticalmente il "sandwich" si versa la soluzione di acrilammide al 10%, preparata di fresco, nella cavità del "sandwich".

La soluzione finale di acrilammide al 10% deve contenere, oltre all'acrilammide, i reagenti polimerizzanti, ed il tampone; generalmente 15 ml di miscela sono sufficienti per la preparazione di un "separating gel" e precisamente:

- 5 ml di acrilammide al 30%, precedentemente degassata sotto vuoto,
- 6.9 ml di H₂O

- 1.5 ml di TBE 10x (TBE 1x = Tris-borate 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8).
- 105 μ l di persolfato d'ammonio al 10%,
- 5.5 μ l di TEMED,

Appena versati i 15 ml nella cavità del sandwich, si stratificano circa 10 ml di H₂O e si lascia polimerizzare il gel per almeno 20-45' a seconda della temperatura ambiente. A polimerizzazione avvenuta si scarta l'acqua e si asciuga con carta Whatman n. 1 la cavità del sandwich sovrastante il gel, si inserisce un pettine (generalmente a 14 denti) e quindi si versa la soluzione di acrilammide al 3% preparata di fresco.

La soluzione finale di acrilammide al 3% deve contenere:

- 1 ml di acrilammide al 30%,
- 7.8 ml di H₂O,
- 1 ml di 10xTBE buffer (1xTBE= Tris-borate 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8).
- 70 μ l di persolfato d'ammonio al 10%,
- 3.5 μ l di TEMED,

In genere conviene prepararne 10 ml anche se ne occorrono, per una piastra circa 7-8 ml.

Appena si è sicuri dell'avvenuta polimerizzazione, si allontana il pettine delicatamente senza rompere i pozzetti, quindi si lavano questi con acqua per rimuovere l'acrilammide non polimerizzata.

Sistemato il "sandwich" nell'apparato elettroforetico, si versa il tampone TBE 1x nella vasca superiore (catodo) e nella vasca inferiore (anodo) e si effettua una precorsa per 30' a 80 V per allontanare le impurezze dal gel.

Poichè la deposizione del campione si effettua in una condizione in cui il gel è sommerso dal tampone, si miscela preventivamente il campione da caricare con una miscela di caricamento "10x loading buffer" così costituita:

- 5 g di Ficoll-400 (Pharmacia-LKB),
- 18 ml di H₂O (sciogliere per una notte sotto agitazione),
- 1 ml Blu di bromofenolo al 5% in metanolo al 10%,
- 1 ml di xilene cianolo al 5% in metanolo al 10%.

Si prepara il campione nel seguente modo:

- 2 μ l di RNA (1/10 dell'RNA ricavato da 0.6 ml di lisato),
- 2.5 μ l di TBE 10x,
- 2.5 μ l di "10x loading buffer"

In genere si depongono 25 μ l di questa miscela così preparata con una siringa Hamilton da 25 μ l oppure con speciali pipette automatiche munite di puntali monouso con punta 0.17 x 4 mm.

La corsa si effettua a temperatura ambiente. Inizialmente il voltaggio si mantiene basso, nel nostro caso 80 V per 4 h per migliorare la risoluzione delle bande. In questa fase dell'elettroforesi la migrazione del campione avviene lentamente ed è possibile monitorare la corsa grazie alla visualizzazione delle due bande corrispondenti a ciascuno dei due coloranti addizionati al campione. Successivamente si alza il voltaggio a 160 V e si continua la corsa per altre 20 h.

Poichè una vasca elettroforetica può contenere due gel per un totale quindi di 28 pozzetti, è possibile analizzare in una singola corsa altrettanti campioni.

1.3. Analisi di 2° livello: caratterizzazione molecolare mediante Northern-blot.

Identificati attraverso lo screening i lisati contenenti enterovirus è opportuno, ma non strettamente indispensabile, effettuare un'analisi di caratterizzazione molecolare per la conferma della loro presenza.

L'RNA degli enterovirus è un singolo filamento di circa 7.400 nucleotidi e la sua purificazione elettroforetica seguita da un successivo trasferimento su filtro di nylon e quindi ibridazione con sonde molecolari (Northern-blot) dà una indicazione molto precisa della natura del segnale che rileviamo sulla lastra autoradiografica. Infatti a causa della bassa stringenza d'ibridazione in cui si effettua il dot-blot, si corre il rischio di rilevare false positività a causa di cross-ibridazioni della sonda

con acidi nucleici non appartenenti ad enterovirus (11). Un segnale positivo ottenuto nel dot-blot è soltanto un indice di omologia genetica tra l'RNA virale esaminato e la sonda utilizzata, ma non ci dà nessuna informazione riguardante la grandezza dell'RNA identificato.

1.3.1 Preparazione dell'RNA virale.

E' necessario operare in condizioni RNase-free per evitare la degradazione dell'RNA virale. A causa della complessità dell'indagine occorre una discreta quantità di materiale che varia in funzione del suo grado di purezza. 10 ml di lisato cellulare si centrifugano a 5000 xg per 30 min a 4°C. L'estratto chiarificato viene ulteriormente centrifugato a 150.000 xg (accelerazione sul fondo della provetta) per 1 h. Il sedimento contenente particelle virali ed RNA ribosomiale viene risospeso in un piccolo volume di acqua, generalmente 0.6 ml, e quindi sottoposto ad 1 ciclo *proteinaseK*/estrazione fenolica/precipitazione alcolica come già descritto per il dot-blot.

Il pellet viene ridisciolti in 20 µl di acqua, quindi si denatura con 3 vol. di miscela denaturante contenente formammide deionizzata 63% (v/v), formaldeide 2.2% (v/v), MOPS-acetate 56 mM pH 7 [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid], acetato di sodio 1.4mM, EDTA 1.4 mM) e scaldando successivamente la soluzione a 65°C per 5 min seguito da rapido raffreddamento in ghiaccio. La miscela a questo punto deve essere trattata per il caricamento sul gel d'agarosio. A questo scopo si aggiunge 1/10 vol. della miscela "10x gel-loading buffer" subito prima dell'esecuzione del Northern.

1.3.2. Preparazione del gel d'agarosio all'1%.

Il gel d'agarosio per la corsa elettroforetica deve contenere dei denaturanti che permettano la migrazione dell'RNA come singoli filamenti senza appaiamenti interni. In genere occorrono circa 100-120 ml di gel per piastra. Inizialmente si scioglie l'agarosio in 70 ml di acqua e si

porta all'ebollizione, poi si porta il gel in bagno termostatico a 55°C e si aggiungono formaldeide e MOPS (15). Parallelamamente si prepara lo stampo: esso è un vassoietto in perspex chiuso solo presso due lati, mentre gli altri due lati si chiudono con del nastro adesivo, quindi si sistema il pettine (generalmente a 10-14 denti) e si poggia l'apparato su un piano livellato (15) sistemato sotto una cappa aspirante; si versa rapidamente il gel, si eliminano eventuali bolle d'aria con un ago sterile e si lascia solidificare il gel.

1.3.3 Esecuzione del Northern.

Il gel si trasferisce con tutto il vassoio nella vasca elettroforetica e la si riempie con il tampone fino a sommergere completamente il gel, è necessario che la superficie del gel sia ricoperta dal tampone per uno spessore di almeno mezzo cm. Incompleta o scarsa ricopertura del gel provoca surriscaldamenti del gel con conseguenti migrazioni ad "arco". Una pompa peristaltica esterna, collegata alla vasca, deve consentire la circolazione del tampone durante l'elettroforesi. La corsa viene effettuata a 20 V per almeno 20 h.

1.3.4. Trasferimento su filtro dell'RNA.

Dopo la corsa elettroforetica, bisogna effettuare il trasferimento su di un filtro di nylon del contenuto del gel in modo da avere l'esatta replica della migrazione. Questa operazione può essere effettuata mediante speciali apparecchiature (elettroblotting) o più semplicemente per capillarità mediante soluzioni saline (blotting). Il nostro procedimento standardizzato è il seguente:

- rimuovere il gel dal vassoio e tenere a bagno in SSC 20x per almeno 30' per rimuovere la formaldeide,
- trasferire il gel su un ponte di carta Whatman n.3 poggiata su di un supporto in perspex, le due estremità del ponte devono pescare in una vasca contenente 0.5 l di SSC 20x,
- si stende sopra al gel una membrana di nylon in modo da

ricoprire l'intera superficie del gel,
- si stratifica sopra alla membrana almeno 20 cm, in altezza, di carta da filtro pretagliata alle stesse dimensioni del gel (meglio se Whatman n.3) tenendola compressa con un peso da 1Kg.

Il trasferimento capillare dura 20-24h. Alla fine del trasferimento la membrana si tratta agli U.V. per 2' e si conserva in sacchetto di nylon a -20°C fino al momento dell'uso. La preibridazione e ibridazione del filtro si effettuano esattamente come nel dot-blot.

2. Discussione dei primi risultati sperimentali.

Le metodiche descritte prescindono dalla matrice ambientale del campione esaminato. Esse infatti prevedono la concentrazione del campione d'acqua e l'isolamento del virus su colture cellulari da cui si estraggono successivamente gli acidi nucleici da analizzare. Esse non sono proponibili per l'identificazione diretta dei virus nei campioni ambientali in quanto la loro sensibilità è dell'ordine di 10^5 TCID₅₀ particelle virali, una quantità difficilmente riscontrabile in un campione d'acqua di mare o d'acqua potabile. Sono allo studio metodiche più valide (es. PCR) che sono potenzialmente in grado di superare questo ostacolo (17). Indubbiamente l'approccio dot-blot/ Northern-blot/PAGE ci ha consentito di fare il punto della situazione fissando alcuni punti di riferimento evidenziati nei lavori già pubblicati sull'argomento: a) validità delle procedure di screening che generalmente confermano la presenza virale solo in quei campioni che manifestano effetto citopatico sulle colture cellulari; b) utilità della diagnosi differenziale tra enterovirus e virus enterici non-enterovirus per ottemperare alle normative vigenti; c) inizio della costituzione di un archivio di enterovirus ambientali sia da utilizzare per le prime valutazioni epidemiologiche che come riferimento nella messa a punto di nuovi metodi diagnostici.

I campioni di acque di mare provenienti dal mare Adria-

tico (9) prelevati nell'estate 1989, concentrati e successivamente inoculati su colture di cellule BGM sono stati analizzati secondo le metodiche descritte. Sia il dot-blot che il Northern-blot avevano escluso la presenza di enterovirus nonostante la presenza di una lieve cross-ibridazione con la sonda Polio1 (*Bam*HI₂₂₀₋₆₇₀) a specificità di gruppo. Mediante PAGE è stato facile stabilire inequivocabilmente la presenza di reovirus dello stesso elettroferotipo in tutti i campioni esaminati. La costanza del ritrovamento ha fatto pensare in un primo momento alla possibilità potenziale dell'esistenza di un virus guida da poter utilizzare come indice di fecalizzazione di un'acqua. Successivamente grazie al perfezionamento delle tecniche di concentrazione (18) utilizzate su campioni di acque prelevate dal mar Tirreno e dalla foce del Tevere nella primavera-estate 1990, è stato possibile identificare una notevole eterogeneità di enterovirus e reovirus (manoscritto in preparazione). Questo lavoro oltre a confermare ancora una volta la validità dell'approccio molecolare, ha permesso di fare diverse considerazioni sui dati ottenuti sintetizzati in Tab. 1 .

Tabella 1. *Sommario dei risultati ottenuti nell'isolamento e identificazione dei virus nei campioni di acque provenienti dal mar Tirreno e dalla foce del Tevere nel corso della campagna primavera-estate 1990.*

	MARE	ESTUARIO	TOTALE
n. di campioni	106	20	126
CPE	8 (7.5%)	20 (100%)	28
Enterovirus	6	9	15
(polio)	(3)		(3)
(coxsackie)		(4)	(4)
(non-tip.)	(3)	(5)	(8)
Reovirus	2	11	13

Le acque di estuario hanno dato il 100% di positività (20/20) con un rapporto enterovirus: reovirus 9:11. Nelle acque di mare si ha una percentuale molto bassa di positività, probabilmente a causa della diluizione che la carica

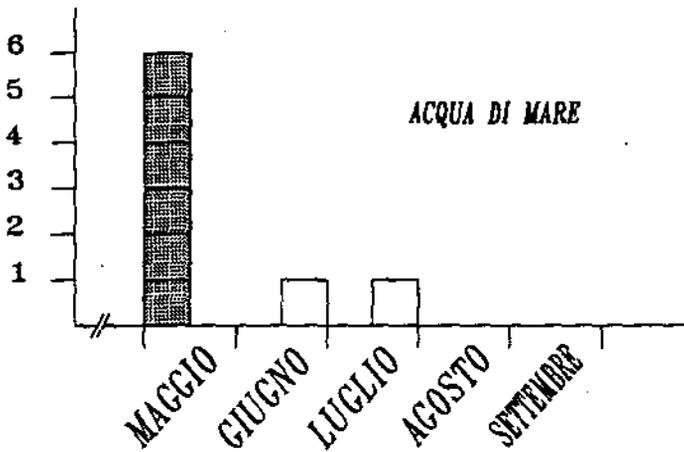
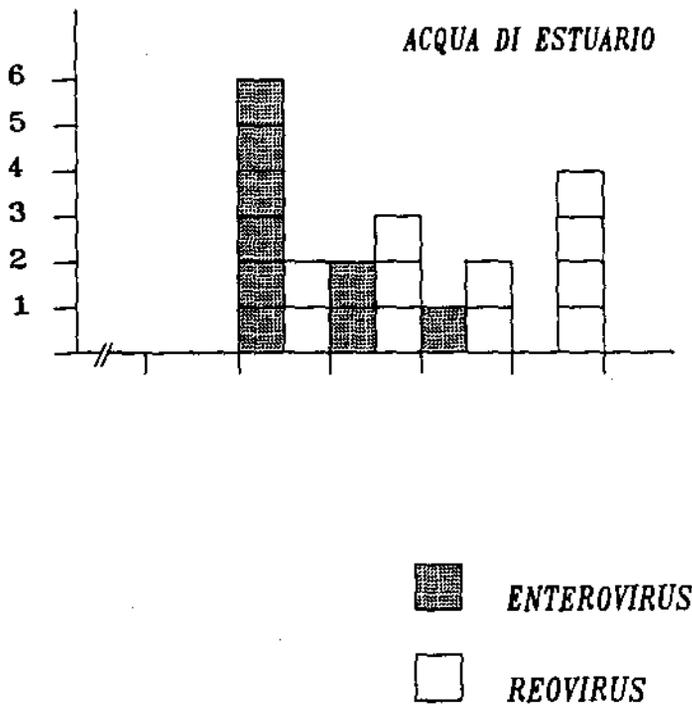


Fig. 1. Rappresentazione grafica, in ordine cronologico, dei risultati delle analisi di identificazione dei virus.

virale subisce quando le acque dolci si riversano nel mare. Infatti solo il 7.5% dei campioni di acqua di mare sono risultati positivi (8/106) con un rapporto enterovirus/reovirus di 6:2. Un'altra considerazione importante emerge graficando in ordine cronologico i risultati (Fig. 1). La carica virale è alta durante i mesi primaverili in entrambi i tipi di acque; con l'approssimarsi della stagione estiva gli enterovirus scompaiono quasi totalmente nell'acqua di mare mentre i reovirus sono scarsamente rilevabili. Nelle acque di fiume la presenza virale subisce un decremento parallelo, sono stati riscontrati sia enterovirus che reovirus nella primavera-estate. Probabilmente questo fenomeno è legato soprattutto all'aumento della temperatura dell'acqua, alle concentrazioni saline in prossimità degli estuari ed alla luminosità, tutti fattori nocivi alla sopravvivenza dei virus enterici nell'ambiente acquatico.

Da questi dati si comprende l'importanza dell'identificazione dei virus enterici dopo il loro isolamento sulle colture cellulari sulla base dell'effetto citopatico: un'accurata valutazione della situazione di rischio può aiutare il legislatore nell'aggiornamento delle normative vigenti in materia di qualità delle acque destinate ad uso ricreativo o di acque destinate al consumo umano.

Bibliografia

1. HURST, J.C., BENTON, W.H. & STELLER, R.E. 1989. Detecting viruses in water. JAWWA 81: 71-80.
2. GERBA, P.C., MARGOLIN, A.B. & HEWLETT, M. 1989. Application of gene probes to virus detection in water. Wat. Sci. Tech. 21: 147-154.
3. ROTBART, H.A. 1991. New methods of rapid enteroviral diagnosis. Prog. Med. Virol. 38: 96-108.
4. RACANIELLO, V.R., & BALTIMORE, D. 1981. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 78: 4887-4891.

5. PELLETIER, J., KAPLAN, G., RACANIELLO, V.R. & SONENBERG N. 1988. Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. Mol. Cell. Biol. 8: 1103-1112.

6. NOMOTO, A. TOYODA, H., & IMURA N. 1981. Comparative sequence analysis of the 5'-terminal noncoding regions of poliovirus vaccine strain Sabin 1, Sabin 2, and Sabin 3 genomes. Virology 113: 54-63

7. AUVINEN, P., G. STANWAY, & T. HYYPIÄ 1989. Genetic diversity of enterovirus subgroups. Arch. Virol. 104: 175-186.

8. ROTBART, H.A., LEVIN, M.J., & VILLAREAL, L.P. 1984. Use of subgenomic poliovirus DNA hybridization probes to detect the major subgroups of enteroviruses. J. Clin. Microbiol. 20: 1105-1108.

9. AULICINO, F.A., PATTI, A.M., MUSCILLO, M., GABRIELI, R., DE FILIPPIS, P., ORSINI, P., MERLONI, R., & VOLTERRA, L. 1991. Enterovirus in marine waters. L'Igiene Moderna 96, 583-592 .

10. MUSCILLO M. 1991. Le sonde molecolari e loro uso per la identificazione dei virus. In: Virus enterici nelle acque: epidemiologia e tecniche di isolamento e identificazione, a cura di Aulicino F.A., Muscillo M., Patti A.M., Orsini P., Volterra L. Rapporti Istisan 91/26: 94-127.

11 MUSCILLO, M., AULICINO, A. PATTI A.M., ORSINI P., VOLTERRA, & FARA, G.M. Molecular techniques for the identification of enteric viruses in marine waters. Wat. Res. In press.

12. MUSCILLO, M., AULICINO, F.A., ORSINI, P, BELLUCCI C., LA ROSA, G. & VOLTERRA, L. 1992. Standardizzazione di un metodo "dot-blot" per l'identificazione molecolare di enterovirus in campioni ambientali mediante cDNA sonde.

Annali di Igiene 4: 255-261.

13. WADELL, G., HAMMARSKJÖLD, M.L., WINBERG, G., VARSANYI, T.M. & SUNDELL, G. 1980. Genetic variability of adenoviruses. Ann. NY ACAD. SCI 354: 16-42.

14. WHEELER, D. 1990. The real risks of bathing in water contaminated by sewage. Environ. Health 98: 285-287.

15. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (eds) 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd Ed, Harbor N.Y.

16. JENKINS, O., BOOTH, J.D., MINOR, P., & ALMOND, J.W. 1987. The complete nucleotide sequence of coxsachievirus B4 and its comparison to other members of the picornaviridae. J. Gen. Virol. 68: 1835-1848.

17. MUSCILLO M., AULICINO F.A., LA ROSA G., ORSINI P., BELLUCCI C., & L. Volterra. 1993. PCR detection and cDNA sequencing of enteroviruses isolated in Tyrrhenian sea water samples. 6th European Congress on Biotechnology, Firenze, 13-17 giugno.

18. AULICINO, F.A., L. VOLTERRA, M. MUSCILLO, C. BELLUCCI, P. ORSINI, MANCINI., A.M. PATTI, A.L. SANTI, I. MASTROENI, M. FLOCCIA, D. ERROI, E. PIACENTI, V. MODESTI, R. VISTOLI. 1992. Bacteriological and virological analyses of marine and estuarine waters along the Tyrrhenian coast. Annali di Igiene. 4 (5) in press.

PROPOSTE DI TECNICHE PER LA CONCENTRAZIONE DI CAMPIONI DI
PROVENIENZA AMBIENTALE.

F.A. AULICINO*, P. ORSINI*, A. MASTRANTONIO*, C. BELLUCCI*, M. MUSCILLO*,
A.M. PATTI** e L. VOLTERRA*.

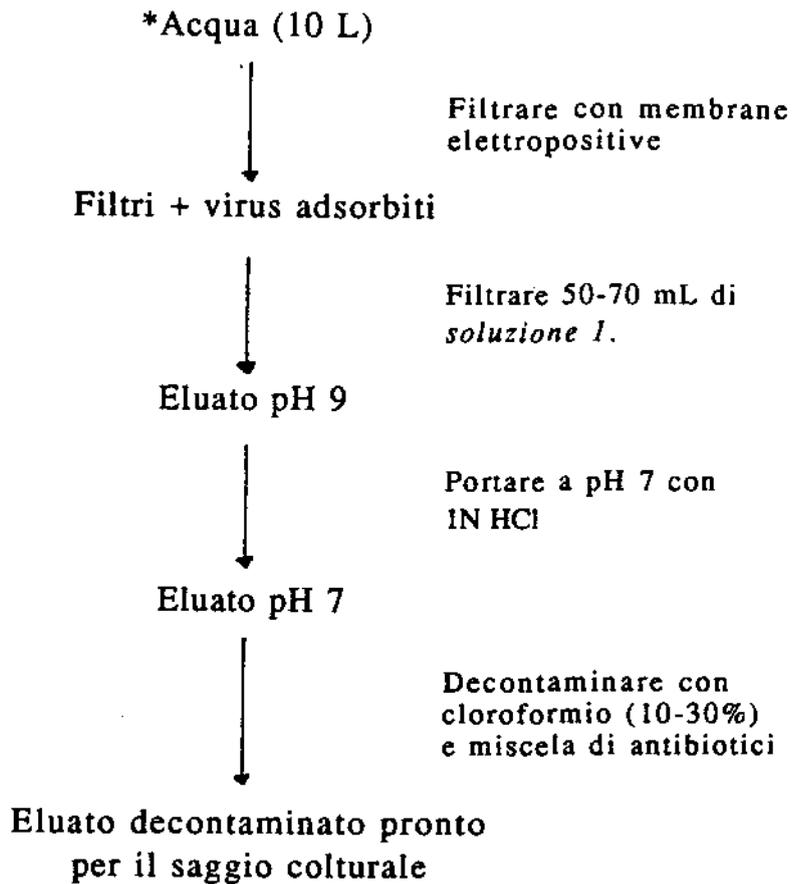
*Laboratorio di Igiene Ambientale.- Istituto Superiore di Sanità, Roma -

**Istituto di Igiene "G. Sanarelli" - Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

Si riportano qui di seguito una serie di schemi relativi a tecniche per la concentrazione di campioni di acqua di diversa provenienza ambientale (acque di superficie-acque potabili), liquami, materiale particellato e fanghi di impianti di depurazione.

Per alcune delle metodologie schematizzate sono riportate le indicazioni bibliografiche. Gli altri metodi per i quali non ci sono riferimenti bibliografici, sono stati saggiati presso il Laboratorio di Igiene Ambientale di questo Istituto.

SCHEMA 1

CONCENTRAZIONE DI ACQUA DI SUPERFICIE:
ADSORBIMENTO-ELUIZIONE SU MEMBRANE
ELETTROPOSITIVE (1)

* Prefiltrare, se necessario su membrane in polipropilene (schema 2).

SCHEMA 1

PROCEDURA

1. Campionamento e conservazione del campione

- 1.1 Prelevare 10 L di acqua in contenitori disinfettati con ipoclorito di sodio e risciacquati accuratamente. Il campione va trasportato e conservato tra 4-8°C. Le analisi vanno effettuate subito o al massimo entro le 24 ore successive al prelievo. Se il campione non è torbido, si può procedere direttamente alla fase di concentrazione-adsorbimento, altrimenti è necessaria la prefiltrazione (schema 2).

2. Adsorbimento

- 2.1 Controllare il pH del campione che non deve essere superiore a 8.
- 2.2 Filtrare attraverso 2 membrane elettropositive tipo Virosorb 1MDS (CUNO Division Meriden - USA) di 142 mm di diametro.
Velocità del flusso: 28 mL al minuto/cm².

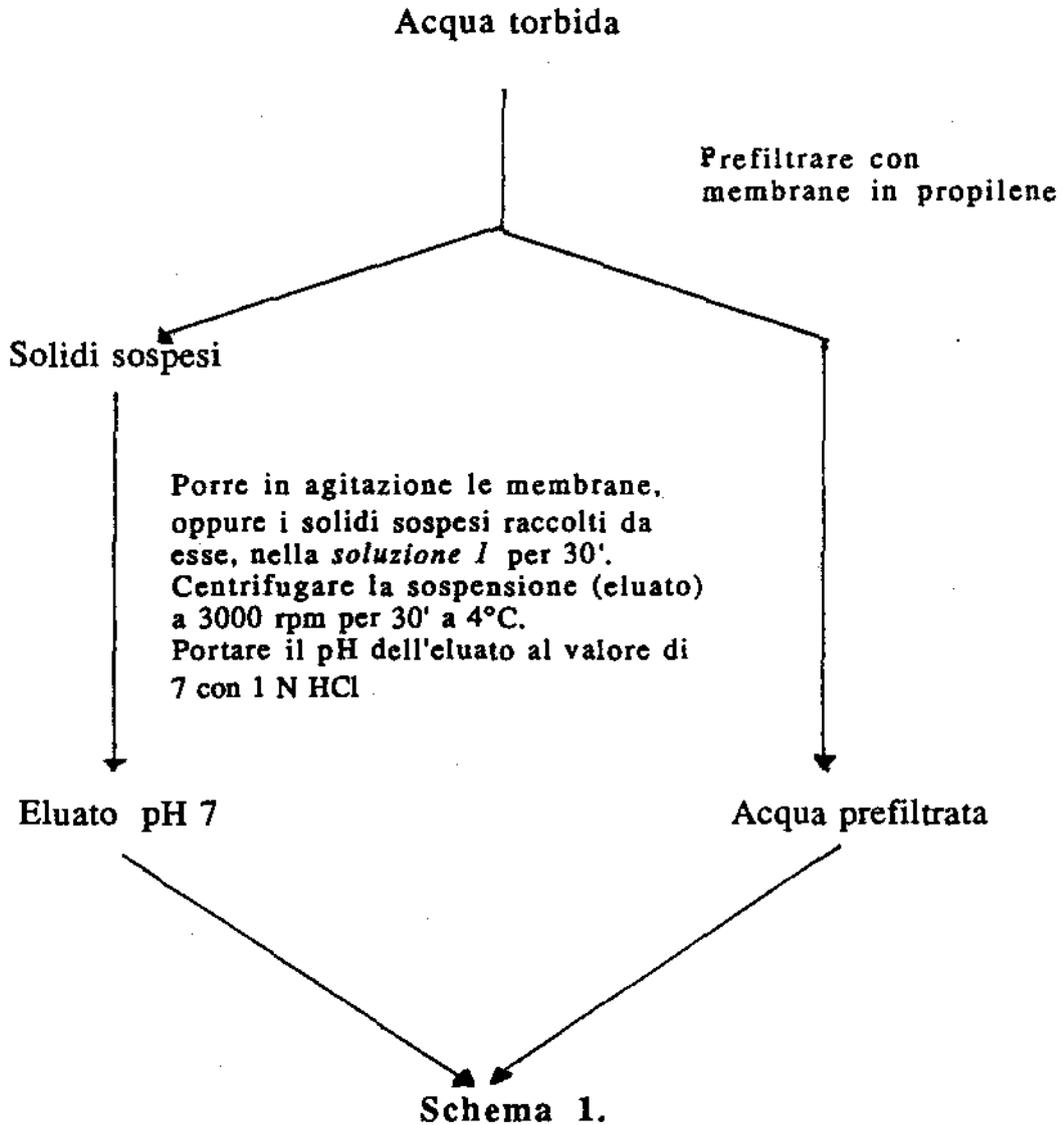
3. Eluizione

- 3.1 Eluire filtrando attraverso le membrane 50-70 mL della *soluzione 1*. La *soluzione 1* va lasciata a contatto con le membrane per 20' prima di procedere alla filtrazione. La filtrazione deve avvenire molto lentamente e va ripetuta per tre volte, controllando che il valore del pH dell'eluato rimanga 9 ed, eventualmente, correggerlo. Misurare il volume dell'eluato.
- 3.2 Portare il pH dell'eluato al valore di 7 con 1N HCl.
- 3.3 Decontaminare il campione con cloroformio. Si aggiunge cloroformio nella quantità del 10-30% *. Agitare per 30' a temperatura ambiente. Centrifugare a 3000 rpm per 30' a 4°C. Prelevare il sovrantante e lasciarlo in agitazione sotto cappa a flusso verticale per 4-5 ore. Trattare il campione con la miscela di antibiotici (0,1 mL della miscela/mL di campione). Lasciare agire per 3 ore a 37°C.
- 3.4 Saggiare il campione sulle colture cellulari o congelare a -30°C per saggiarlo successivamente.

* La quantità di cloroformio utilizzata dipende dallo stato di contaminazione del campione.

SCHEMA 2

PREFILTRAZIONE DI ACQUA DI SUPERFICIE TORBIDA (1)



SCHEMA 2***PROCEDURA****1. Adsorbimento**

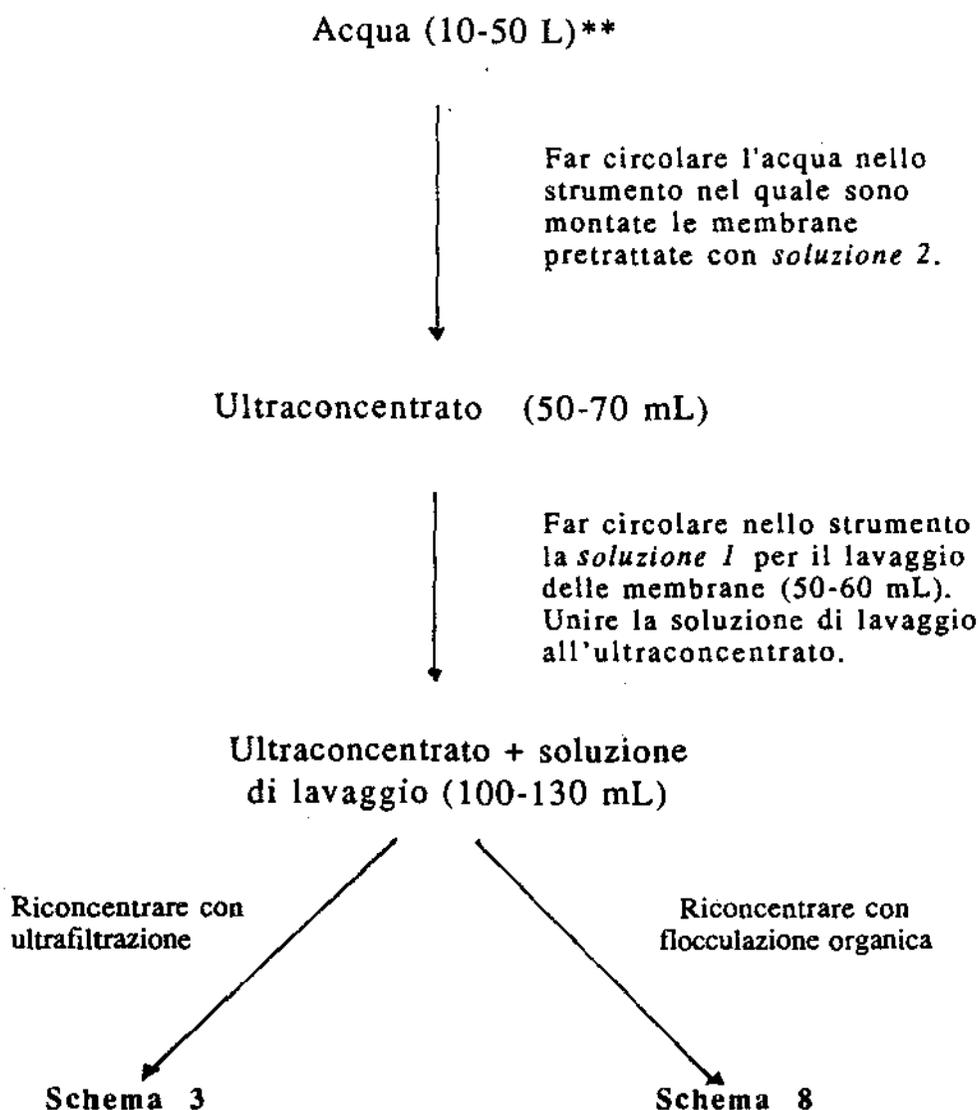
- 1.1 Filtrare il campione attraverso membrane in polipropilene con porosità 10-25 μm e diametro di 142 mm (Gelman Sciences, Ann. Arbor, U.S.A.).
- 1.2 Raccogliere l'acqua filtrata, trattarla secondo lo schema 1.

2. Eluizione

- 2.1 Porre le membrane tagliuzzate o i solidi raccolti su esse in un becker sterile contenente un magnetino.
- 2.2 Aggiungere 10-30 mL di *soluzione 1* e porre in agitazione per 30' a temperatura ambiente. Controllare che il pH rimanga costantemente a 9, altrimenti correggerlo con 1N NaOH o 1N HCl.
- 2.3 Centrifugare per 30' a 3000 rpm a 4°C. Scartare il sedimento e recuperare il sovrinatante.
- 2.4 Il sovrinatante recuperato deve essere portato alla neutralità e riunificato all'acqua prefiltrata eseguendo lo schema 1.

* Nel caso di campioni torbidi può essere eseguita la prefiltrazione contemporaneamente alla filtrazione (schema 1), ponendo in serie prefiltro (membrana polipropilene) e filtri (membrane elettropositive).

SCHEMA 3

CONCENTRAZIONE ACQUA DI SUPERFICIE:
ULTRAFILTRAZIONE TANGENZIALE*

* E' necessaria la dotazione di un apposito apparecchio per ultrafiltrazione, per il cui utilizzo occorre seguire le indicazioni delle Ditte produttrici.

** Prefiltrare se necessario (Schema 2).

SCHEMA 3

PROCEDURA.

1. Campionamento e conservazione dei campioni

- 1.1 Prelevare 10-50 L di acqua di superficie in contenitori disinfettati con ipoclorito di sodio e risciacquati accuratamente.
Il campione va trasportato e conservato tra 4-8°C.
Se il campione non è torbido si può procedere direttamente alla fase di concentrazione, altrimenti è necessaria la prefiltrazione (vedi procedura schema 2).

2. Pretrattamento sistema filtrante

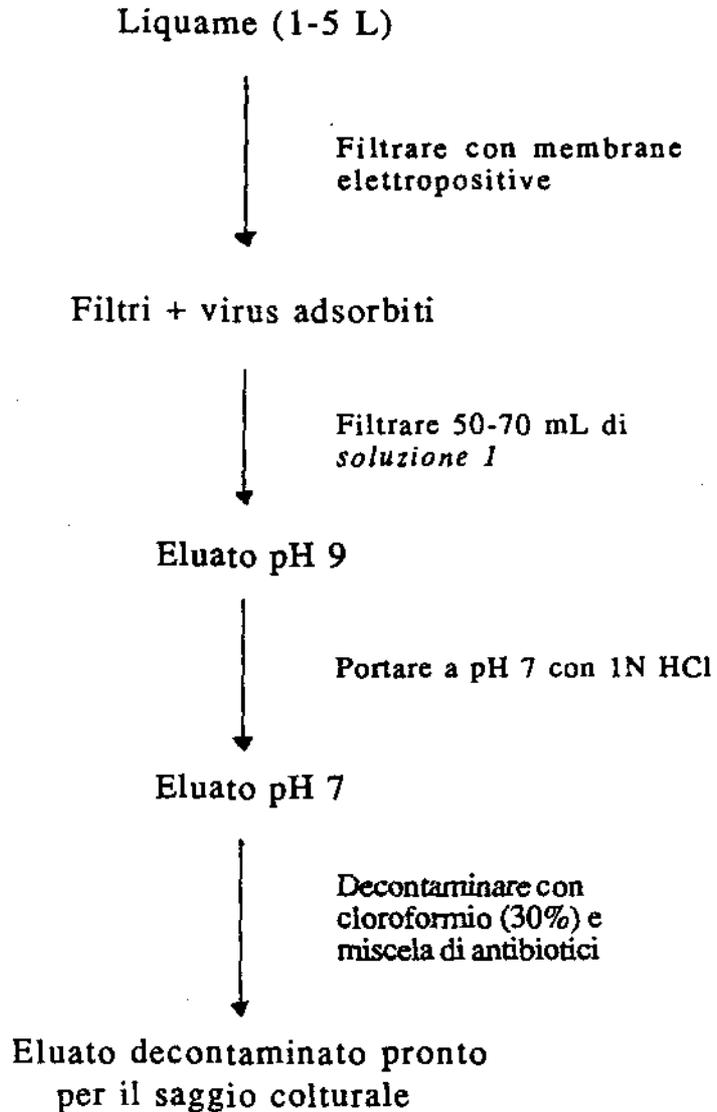
Utilizzare un apparecchio per ultrafiltrazione (Pellicon Cassette System, Millipore; Sartocor, Sartorius; Sistema pilota ultrafiltrante, Dasit, Pumped systems spiral-wound/hollow fiber, Amicon) con membrane di polisulfone da 10.000-30.000 Daltons.

- 2.1 Pretrattare le membrane facendo ricircolare nel sistema per 10' la *soluzione 2*. Durante questo trattamento la pressione dello strumento deve essere 0 e la valvola dell'ultrafiltrato deve essere mantenuta chiusa.

3. Concentrazione

- 3.1 Operare la ultrafiltrazione con l'apparecchio fino a ridurre il volume iniziale del campione a 50-70 mL. Le condizioni operative sono indicate dalle Ditte.
- 3.2 Lavare le membrane con 50 mL di *soluzione 1*, facendola ricircolare a pressione 0 e a bassa velocità della pompa. Unire l'ultraconcentrato con la soluzione di lavaggio.
Controllarne il pH ed eventualmente portarlo al valore di 7 con 1N HCl.
- 3.3 Riconcentrare l'ultraconcentrato + la soluzione di lavaggio applicando il metodo della flocculazione organica. La riconcentrazione può essere effettuata anche applicando nuovamente l'ultrafiltrazione tangenziale utilizzando un apparecchio per ultrafiltrazione in grado di processare volumi più piccoli di campione.

SCHEMA 4

CONCENTRAZIONE DEI "LIQUAMI DI IMPIANTI DI DEPURAZIONE":
ADSORBIMENTO - ELUIZIONE SU MEMBRANE ELETTROPOSITIVE

SCHEMA 4

PROCEDURA

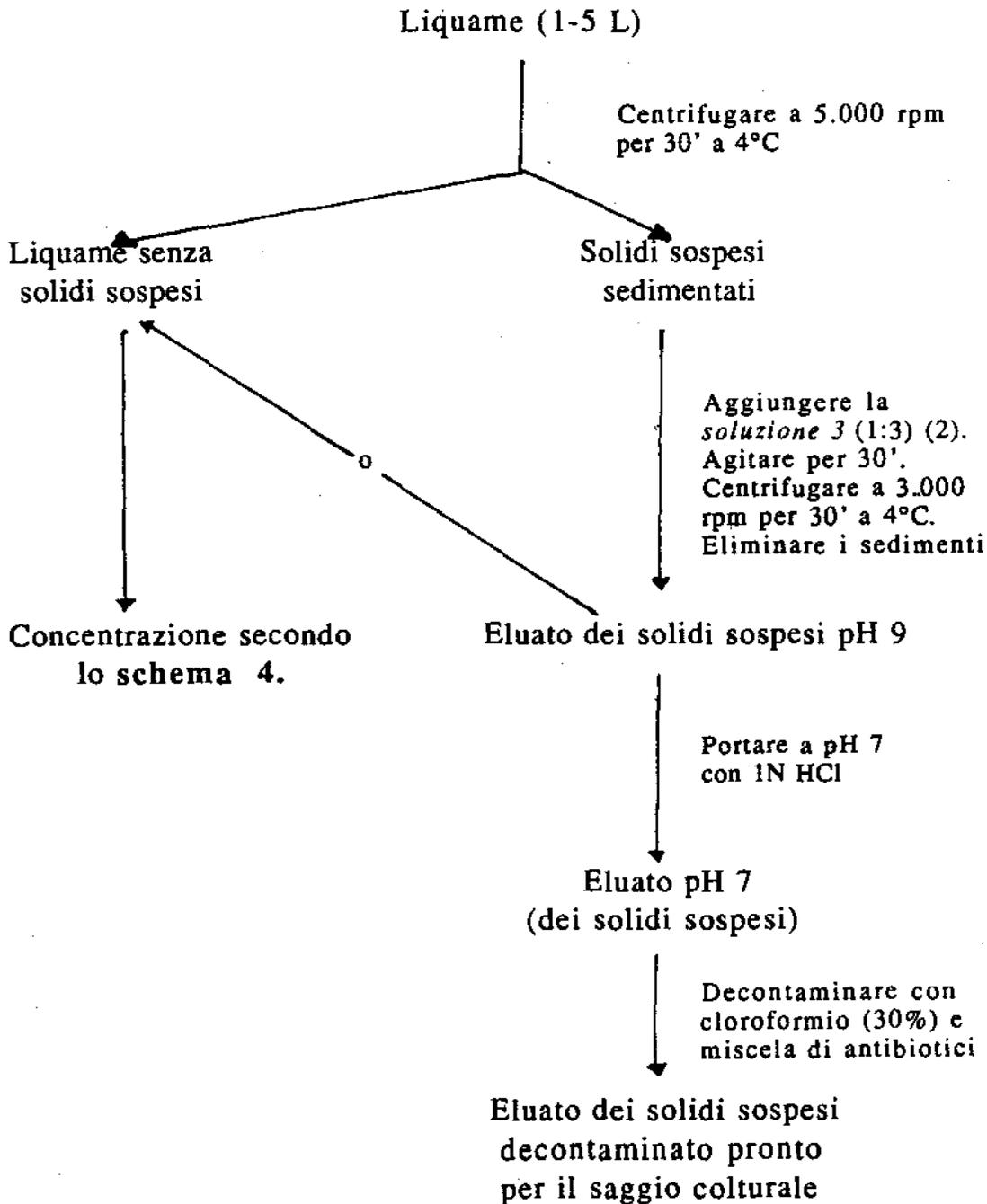
1. Prelievo e conservazione del campione
 - 1.1 Prelevare da 1 a 5 L di liquame in contenitori disinfettati con ipoclorito di sodio e risciacquati accuratamente. Il campione va trasportato e conservato tra 4-8°C. Le analisi vanno effettuate subito o al massimo entro le 24 ore successive al prelievo.

2. Adsorbimento
 - 2.1 Controllare il pH del campione che non deve essere superiore a 8, altrimenti correggerlo.
 - 2.2 Filtrare attraverso 2 membrane elettropositive del tipo Virosoorb (IMDS Cuno Division Meriden-USA) da 142 mm di diametro. La velocità del flusso deve essere di 28 mL al minuto/cm².

3. Eluizione
 - 3.1 Eluire filtrando attraverso le membrane 50-70 mL della *soluzione 1*. La *soluzione 1* va lasciata a contatto con le membrane per 20' prima della filtrazione. La filtrazione deve avvenire molto lentamente e va ripetuta per tre volte, controllando ogni volta che il valore del pH rimanga 9 ed, eventualmente correggerlo. Misurare il volume dell'eluato.
 - 3.2 Portare il pH dell'eluato al valore di 7 con 1N HCl.
 - 3.3 Decontaminare il campione con cloroformio (30%) e successivamente con miscela di antibiotici (vedi procedura schema 1 punto 3.3).
 - 3.4 Saggiare il campione sulle colture cellulari o congelare a -30°C per saggiarlo successivamente.

SCHEMA 5

CONCENTRAZIONE DEI "LIQUAMI DI IMPIANTI DI DEPURAZIONE":
 ADSORBIMENTO-ELUIZIONE SU MEMBRANE ELETTROPOSITIVE
 CON SEPARAZIONE DEI SOLIDI SOSPESI DAL CAMPIONE



SCHEMA 5**PROCEDURA**

- 1. Separazione dei solidi sospesi dalla parte acquosa**
 - 1.1 Centrifugare i liquami in tubi da centrifuga da 500 mL per 30' a 5000 rpm a 4°C.
 - 1.2 Raccogliere il sovranatante.
 - 1.3 Riunificare i solidi sedimentati e pesarli.

- 2. Eluizione dei solidi sospesi sedimentati**
 - 2.1 Aggiungere ai solidi sospesi sedimentati la *soluzione 3* nel rapporto 1:3 (campione:eluente), far agitare per 30'. Controllare, durante l'agitazione, che il pH si mantenga intorno a 9 ed, eventualmente correggerlo.
 - 2.2 Centrifugare per 30' a 3000-9000 rpm a 4°C, scartare il sedimento e recuperare il sovrinatante (eluato dei solidi sospesi).
 - 2.3 L'eluato dei solidi sospesi deve essere portato alla neutralità e successivamente saggiato direttamente sulle colture di cellule previa decontaminazione (procedura schema 1).

- 3. Trattamento parte acquosa dei liquami**
 - 3.1 Il sovrinatante, di cui al punto 1.2, è concentrato secondo quanto riportato per lo schema 4.

- 4. Trattamento parte acquosa + eluato dei solidi sospesi**
 - 4.1 Il sovrinatante (liquame senza solidi sospesi) può essere addizionato dell'eluato dei solidi sospesi e successivamente concentrato (schema 4).

SCHEMA 6

ESTRAZIONE DA MATERIALE SOLIDO: MUCILLAGINE (3)

Mucillagine (100-200 g)

↓
Aggiungere la
soluzione 4 (1:3)
Agitare per 30'
Centrifugare a 3.000
rpm per 30' a 4°C
Eliminare il sedimento

Sovranatante eluato a pH 7

↓
Riconcentrare con
flocculazione organica

↓
Schema 8

SCHEMA 6**PROCEDURA****1. Prelievo e conservazione del campione**

- 1.1 Prelevare il campione di mucillagine in contenitori sterili, conservarlo tra 4-8°C fino al momento dell'analisi che va effettuata entro le 24 ore.

2. Preparazione del campione

- 2.1 Congelare e scongelare per 3 volte. Omogeneizzare finemente.

3. Eluizione

- 3.1 Aggiungere al campione di gelatina la *soluzione 4* in rapporto 1:3 (campione: eluente), far agitare per 30'.
- 3.2 Centrifugare a 3000 rpm per 30' a 4°C. Scartare il sedimento, recuperare il sovrantante e misurare il volume.
- 3.3 Operare la riconcentrazione per flocculazione organica (vedi schema 8).

SCHEMA 7

ESTRAZIONE DA FANGO (4)

Fango (100 mL)

Porre in agitazione magnetica ed aggiungere (0,05M) AlCl_3 1 mL
Acidificare con (5M) HCl fino a pH 3,5
Agitare per 30'
Centrifugare a 5.000 rpm per 15' a 4°C
Eliminare il sovranatante

Sedimento

Aggiungere 100 mL di *soluzione 4*
Agitare con magnetino per 30'
Centrifugare a 9.000 rpm per 30'
Eliminare il sedimento

Eluato pH 7

Riconcentrare per flocculazione organica

Schema 8

SCHEMA 7**PROCEDURA****1. Prelievo e conservazione del campione**

- 1.1 Prelevare 1 kg di fango e conservarlo tra 4-8°C fino al momento dell'analisi.

2. Preparazione del campione

- 2.1 Pesare 100 g di fango in un contenitore sterile contenente un magnetino.

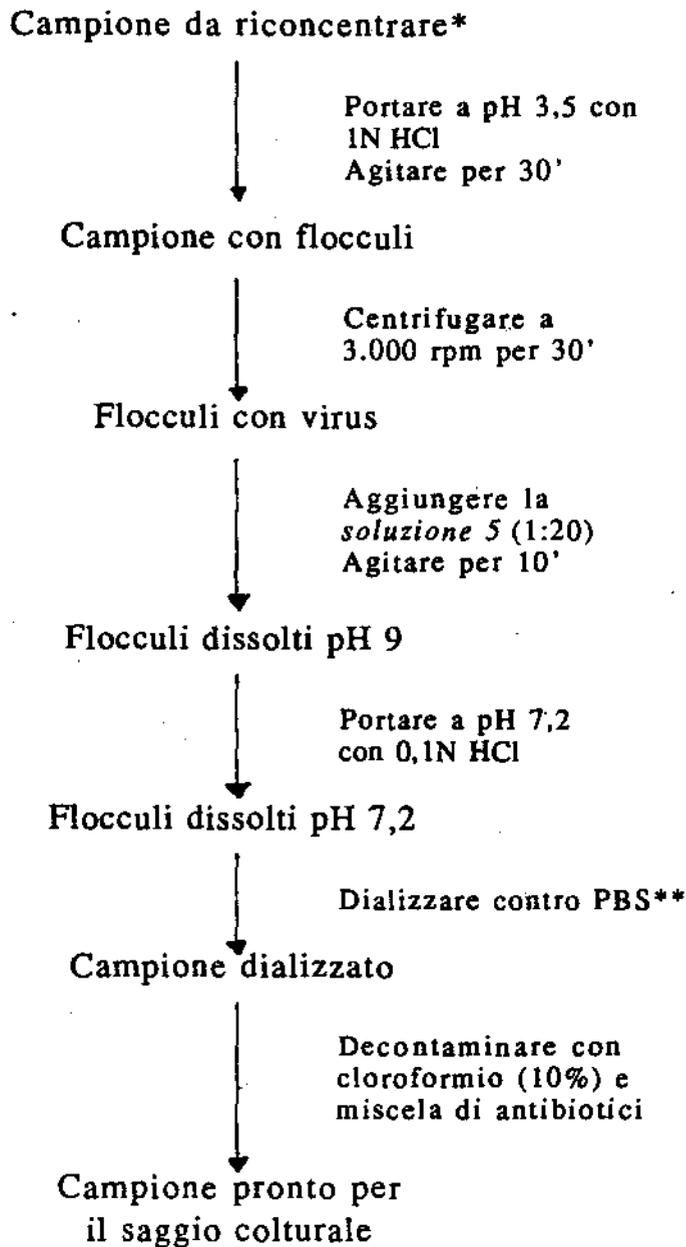
3. Condizionamento

- 3.1 Porre in agitazione il campione, aggiungendo 0,05M AlCl_3 1 mL/100 mL di campione e acidificare fino ad un valore di pH 3,5 con 5M HCl. Mantenere in agitazione per 30' a temperatura ambiente avendo cura di controllare che il pH si mantenga costante ed eventualmente correggerlo.
- 3.2 Centrifugare a 5.000 rpm per 15' a 4°C. Eliminare il sovrantante.

4. Eluizione

- 4.1 Aggiungere 100 mL della *soluzione 4*. Porre in agitazione per 30' con barretta magnetica a temperatura ambiente.
- 4.2 Centrifugare a 9000 rpm per 30' a 4°C. Eliminare il sedimento e misurare il volume dell'eluato recuperato. Eventualmente centrifugare nuovamente per chiarificare ulteriormente il campione, oppure filtrare attraverso membrane di 25-10 μm poste in serie.
- 4.3 Effettuare la riconcentrazione dei 100 mL di eluato per flocculazione organica (schema 8).

SCHEMA 8

RICONCENTRAZIONE DEI CAMPIONI:
FLOCCULAZIONE ORGANICA (5)

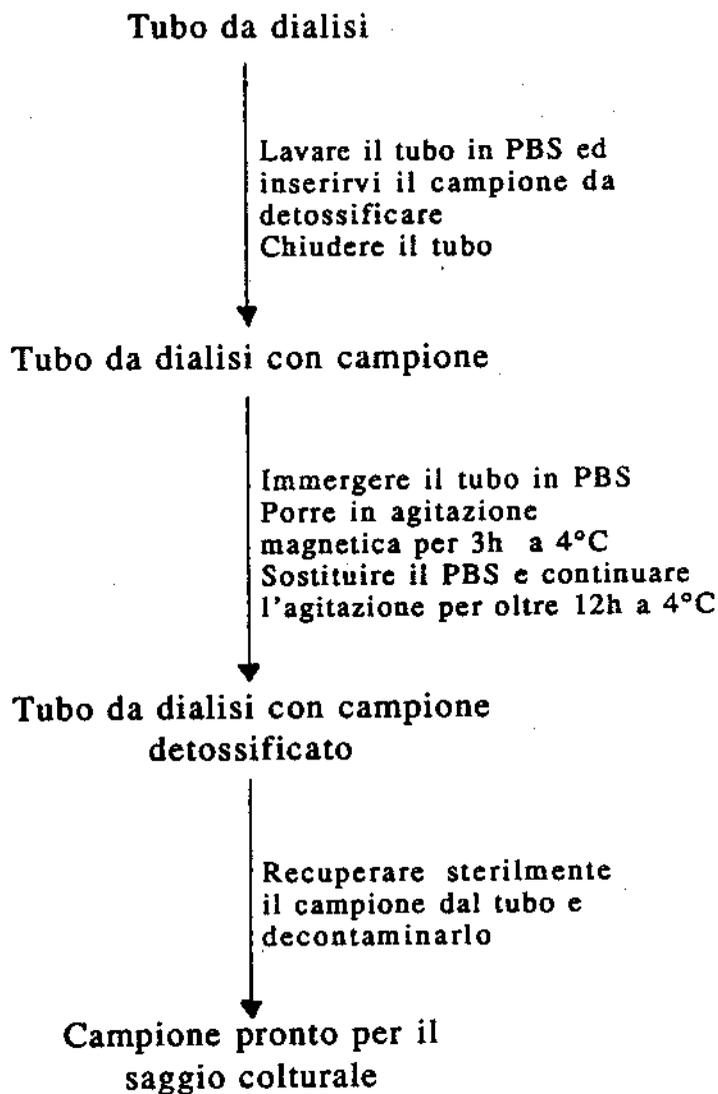
* Il campione da riconcentrare deve contenere il 3% di estratto di carne. Nel caso in cui si avessero campioni senza questa percentuale di tale composto occorre aggiungervi estratto di carne fino a raggiungere la percentuale citata. ** Schema 9.

SCHEMA 8**PROCEDURA****1. Flocculazione***

- 1.1 Porre in agitazione l'eluato ed aggiungere 1N HCl fino ad avere pH 3,5. Mantenere in agitazione per 30' a temperatura ambiente, avendo cura di controllare che il pH si mantenga a 3,5 altrimenti correggerlo.
- 1.2 Centrifugare a 3000 rpm per 30' a 4°C. Eliminare il sovrantante.
- 1.3 Risospendere i flocculi con i virus adsorbiti con la *soluzione 5* nel rapporto 1:20 (campione : soluzione).
- 1.4 Dissolvere i flocculi agitando per 10' e neutralizzare con 0,1N HCl
- 1.5 Dializzare il campione utilizzando la procedura riportata nello schema 9.
- 1.6 Decontaminare il campione con cloroformio (10%) e miscela di antibiotici con le modalità esposte negli schemi precedenti.
- 1.7 Saggiare il campione sulle colture cellulari o congelare a -30°C per saggiarlo successivamente.

* Prima di eseguire la flocculazione organica sull'eluato, occorre saggiare l'eluente con un processo di flocculazione per verificarne il potere flocculante.

SCHEMA 9

DETOSSIFICAZIONE DEI CAMPIONI:
DIALISI

SCHEMA 9

PROCEDURA

1. Preparazione tubi da dialisi

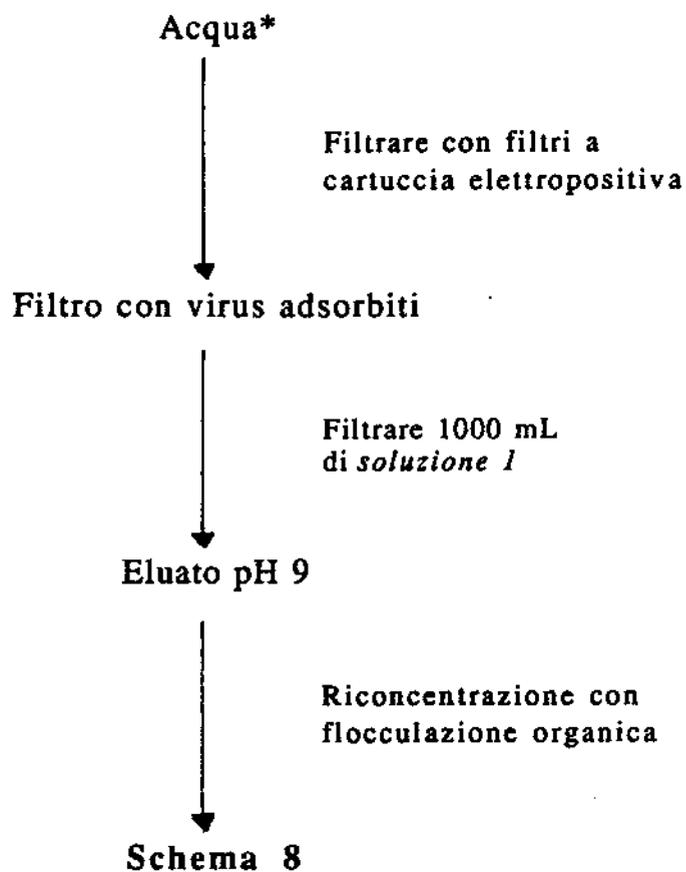
- 1.1 Utilizzare tubi da dialisi disponibili in commercio da 10.000-30.000 Daltons (Union Carbide). Tagliare i tubi della lunghezza desiderata. Immergerli in una soluzione di EDTA 1 mM e bicarbonato di sodio (*Soluzione A*) e farli bollire per 10'.
- 1.2 Prelevare i tubi e lavarli diverse volte con acqua distillata, quindi porli in una bottiglia sterile di circa 2L. Aggiungere: 1,5-2 L della una soluzione di EDTA 1 mM e bicarbonato (*soluzione A*). Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15'.
- 1.3 Far raffreddare ed aggiungere etanolo assoluto (1/10 del volume) e 1 mL di sodio azide 1M (*soluzione B*). In tali condizioni i tubi si conservano per diverso tempo tra 2 e 8°C.

2. Allestimento prova

- 2.1 Prelevare un tubo da dialisi da utilizzare e lavarlo con acqua sterile e PBS per alcune volte prima dell'uso.
- 2.2 Inserire nel tubo il campione da detossificare in quantità nota. Chiudere il tubo e risciacquarlo con PBS sterile.
- 2.3 Porre il tubo in un recipiente contenente PBS sterile (circa 3L). Il tubo deve rimanere in posizione verticale. Porre in agitazione magnetica a 4-8°C per 3 ore.
- 2.4 Sostituire la soluzione salina (PBS) con dell'altra sterile. Porre di nuovo in agitazione a 4-8°C per 12 ore.
- 2.5 Recuperare sterilmente il campione e conservarlo per effettuare il saggio colturale. Effettuare la decontaminazione.

SCHEMA 10

CONCENTRAZIONE DI GROSSI VOLUMI DI ACQUA (100-1000 L) (6)



* L'acqua deve essere dechlorata aggiungendovi una soluzione di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10% (1 mL/ L di campione).

SCHEMA 10**PROCEDURA****1. Esecuzione della filtrazione su campo**

- 1.1 La filtrazione può essere realizzata su campo, riempiendo una vasca di raccolta in polietilene con 100 L di campione. Un flussimetro posto a valle del sistema permette una misurazione esatta del campione.
- 1.2 Utilizzare filtri a cartuccia tipo Virosorb (1MDS Cuno Division Meriden-USA) di 348 mm di altezza. La velocità di filtrazione deve essere di: 4-5 L/minuto.
- 1.3 I filtri con i virus adsorbiti, svuotati dell'acqua, vanno trasportati in laboratorio immersi nella *soluzione 2* e conservati tra 4-8°C in attesa dell'eluizione anche per qualche giorno.

2. Eluizione

- 2.1 Eluire con 1000 mL di *soluzione 1*. Facendo ricircolare per circa 20' l'eluente attraverso la cartuccia.
- 2.2 L'eluato va riconcentrato applicando la metodologia della flocculazione organica (schema 8).

SCHEMA 11

ESTRAZIONE E CONCENTRAZIONE DI VIRUS DA MOLLUSCHI
(8,9,10)

Molluschi (50-100 g di tessuto)

↓
Omogeneizzare a
7.000-10.000 g/minuto

Omogenato di molluschi

↓
Aggiungere 200 mL di *soluzione 6*
e porre in agitazione magnetica
per 15'.
Centrifugare per 45' a 8.000
rpm a 4°C.
Recuperare il sovrantante.
Eliminare il sedimento.

Eluato pH 9

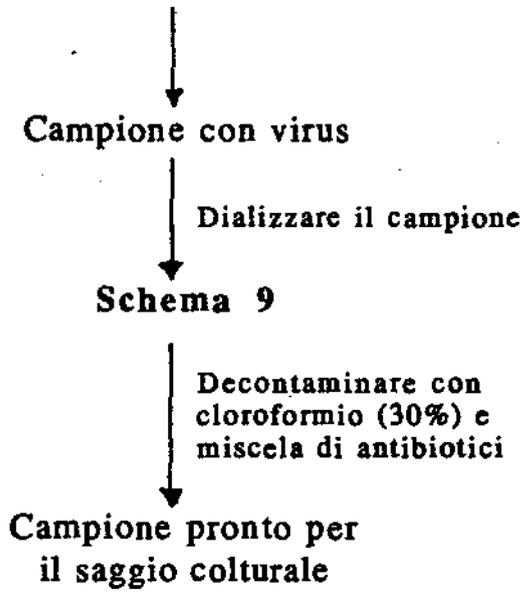
↓
Portare a pH 7,5
con 1N HCl

Eluato pH 7,5

↓
Aggiungere 50 mL di
PEG 6000 (50%).
Porre in agitazione magnetica
per 2h a 4°C.
Centrifugare a 8.000 rpm
per 45' a 4°C.
Eliminare il sovrantante

Sedimento + virus

↓
Aggiungere la *soluzione 5*
(1/20 del volume iniziale)
Sonicare per 30' e
agitare a 250 rpm per 20'.
Portare a pH 7,4 con
1N HCl



SCHEMA 11**PROCEDURA**

- 1. Campionamento e conservazione del campione**
 - 1.1 Prelevare i molluschi, trasportare e conservare tra 4-8 °C. Le analisi vanno effettuate subito o al massimo entro le 24 h successive al prelievo.

- 2. Preparazione del campione**
 - 2.1 Lavare accuratamente 10-15 individui e sguciarli. Porre il materiale in un contenitore pulito e pesarlo. La quantità di carne deve raggiungere 50-100 g.
 - 2.2 Omogeneizzare il materiale utilizzando un apparecchio adatto (ad esempio Sorvall *Omni Mixer*).

- 3. Eluizione dei virus dai molluschi**
 - 3.1 Porre l'omogenato in un becker sterile contenente un magnetino. Aggiungere 200 mL della *soluzione 6*. Porre in agitazione per 15'.
 - 3.2 Centrifugare a 8.000 rpm per 45' a 4 °C. Scartare il sedimento, recuperare il sovranatante (eluato) e portare a pH 7,5 con 1N HCl.

- 4. Concentrazione dei virus**
 - 4.1 Aggiungere all'eluato 50 mL di PEG 6000 al 50% in acqua distillata.
 - 4.2 Porre in agitazione magnetica per 1,5-2 h a 4 °C.
 - 4.3 Centrifugare a 8.000 rpm per 45' a 4°C. Eliminare il sovrinatante contenente il PEG e recuperare il sedimento.

- 5. Risospensione dei virus**
 - 5.1 Aggiungere la *soluzione 5* (1/20 del volume iniziale). Sonicare per 30' ed agitare a 250 rpm per 20'. Portare a pH 7,4 con 1N HCl.
 - 5.2 Dializzare il campione come descritto nella procedura **schema 9**.
 - 5.3 Decontaminare il campione con cloroformio (30%) e miscela di antibiotici come descritto nello **schema 1**.

- 5.4 Saggiare il campione sulle colture cellulari o congelare a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per saggiarlo successivamente.

MATERIALI E SOLUZIONI

Materiali

- Membrane elettropositive 1MDS 142 mm di diametro (CUNO Division Meriden - USA)
- Apparecchio di filtrazione ortogonale in acciaio con reservoir da 5-10 L
- Pompa da vuoto
- pHmetro
- Autoclave
- Centrifuga
- Agitatore magnetico e agitatore rotante
- Magnetini
- Beute da vuoto
- Membrane in polisulfone da 10.000-30.000 Daltons
- Apparecchio per ultrafiltrazione
- Tubi da dialisi (10.000 - 30.000 D)
- Pompa aspirante premente da 12 V con batteria (concentrazione grossi volumi d'acqua)
- Vasca di raccolta acqua da 120 L in polietilene
- Flussimetro
- Omogeneizzatore

Soluzioni**- Soluzione salina**

PBS (Phosphate buffered solution):

0,2 g	KCl
0,2 g	KH_2PO_4
8 g	NaCl
2 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
1000 mL	acqua distillata

La soluzione si può trovare in commercio già pronta per l'uso.

- IN HCl:

36 mL	HCl
1000 mL	acqua distillata

- IN NaOH :

40 g	NaOH
1000 mL	acqua distillata

- **Soluzione 1** (Estratto di carne al 3%):

3 g	estratto di carne (Lab-Lemco powder-Oxoid L29)
100 mL	acqua distillata

Portare a pH 9 con 1N NaOH.
Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'

- **Soluzione 2** (Estratto di carne al 3% pH 7):
come *soluzione 1*, controllando che il pH sia 7

- **Soluzione 3** (Estratto di carne al 3% con glicina):

3 g	estratto di carne (Lab-Lemco powder-Oxoid L29)
0,38 g	glicina
100 mL	acqua distillata

Portare a pH 9 con 1N NaOH
Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'

- **Soluzione 4** (Estratto di carne al 10% con Na_2HPO_4 e acido citrico):

10 g	estratto di carne (Lab-Lemco powder-Oxoid L29)
1,34 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0,12 g	acido citrico
100 mL	acqua distillata

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'

- **Soluzione 5** (0,15M Na_2HPO_4 pH9):

40,2 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
1000 mL	acqua distillata

Portare a pH 9 con 1N NaOH
Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'

- **Soluzione 6** (tampono borato 0,01M al 3% estratto di carne pH 9):

30 g	estratto di carne (Lab-Lemco powder-Oxoid L29)
100 mL	<i>soluzione stock*</i>
800 mL	acqua distillata

Portare a pH 9 con 1N NaOH
Portare a 1 L con acqua distillata

* *Soluzione stock:*

6,1 g	acido borico
1000 mL	acqua distillata

- PEG 6.000 (Polyethylene Glycol)
prodotto reperibile in commercio pronto per l'uso

- *Soluzioni per la preparazione dei tubi da dialisi:*

- *Soluzione A* (1mM EDTA Acido ethylendiamminotetracetico):

20 g	NaHCO_3
2 mL	EDTA (0,5 M)
800 mL	acqua distillata

- Soluzione B (Sodio Azide 1M):

6,5 g
100 mL

sodio azide
acqua distillata

Sterilizzare con filtri da 0,45um

- 0,05M AlCl₃:

0,66 g
100 mL

AlCl₃
acqua distillata

- Miscela di antibiotici (7):

100.000 U.I. /mL
0,015 g/mL
0,1 g/mL

Penicillina G
Neomicina
Streptomycina solfato

Sterilizzare la miscela con filtri da 0,45 um.

Bibliografia

- 1) AULICINO, F.A., MUSCILLO, M., PATTI, A.M., ORSINI, P., VOLTERRA, L. 1991. Virus enterici nelle acque: epidemiologia e tecniche di isolamento e identificazione. RAPPORTI LISTISAN 91/26 ISSN 0391-1675.
- 2) BERG, G., SAFFERMAN, R.S., DAHLING D.R., BERMAN, D., HURST, C.J. 1984. Usepa manual of methods for virology. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati OH pp. 5.30-5.31. EPA 600/4-84-013.
- 3) BERG, G., SAFFERMAN, R.S., DAHLING, D.R., BERMAN, D., HURST, C.J. 1984. Usepa manual of methods for virology. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati OH. pp.5.32-5.36 EPA- 600/4-83-013.
- 4) BERG, G., SAFFERMAN, R.S., DAHLING, D.R., BERMAN, D., HURST, C.J. 1984. Usepa manual of methods for virology. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati OH. pp.7.1-7.2. EPA- 600/4-83-013.
- 5) KATZNELSON, E., FATTAL, B., HOSTOVESKY, T. 1976. Organic-flocculation: an efficient second step concentration method for detection of viruses in tap-water. Appl. Environ. Microbiol. 32: 638-639.
- 6) SANSEBASTIANO, G., BELLELLI, E., CESARI GIOVANARDI, C., ZILIOLI, F., GARDINI, G.P., BOCCHI, V. 1988. Un nuovo tipo di filtro per la concentrazione dei virus nelle acque. Ann. Ist. Super. San. 24: 607-612.
- 7) SCHWARTZBROD, L., BOSCH, A., LUCENA, F., GIRONES, R., BERN, C., JOFRE, J. 1989. Recovery of Solid-Associated Viruses; Evaluation of different procedures. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 188: 559-565.
- 8) BOHER, S., BERIL, C., TERVER, D., SCHWARTZBROD, L. 1991. Comparison of two methods for recovery of rotavirus from mussels and oysters. Wat. Sci. Tech. 24 (2): 423-426.
- 9) BIZIAGOS, E., PASSAGOT, J., CRANCE, J.M., DELONICE, R. 1989. Hepatitis A virus concentration from experimentally contaminated distilled, tap, waste and sea water. Wat. Sci. Tech. 21 (3): 255-258.
- 10) LEWIS, G.A., METCALF, T.G. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A virus and human rotaviruses from oysters, water and sediment samples. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1983-1988.

SCHEDE DI ACCOMPAGNAMENTO CAMPIONI

F.A.AULICINO*, P.ORSINI*, L.VOLTERRA*

* Laboratorio di Igiene Ambientale,
Istituto Superiore di Sanità -Roma-

Si consiglia di seguire le indicazioni seguenti per uniformare il più possibile i procedimenti di trattamento sia dei campioni di acqua concentrata che di lisati cellulari da inviare in Istituto

Campioni di acqua concentrata per i saggi su colture di cellule

1) La concentrazione dei campioni, effettuata in una o più fasi, deve essere applicata in modo tale da ottenere quantità di lisati non superiori a 40 mL.

2) Decontaminare il campione con cloroformio (vedi schema 1).

Campioni di lisati di cellule da sottoporre ad identificazione

1) Le prove di identificazione possono essere effettuate su campioni che hanno mostrato positività su colture di cellule in almeno due passaggi consecutivi.

2) Tra un passaggio e l'altro si consiglia di eseguire il trattamento di decontaminazione con il 10% di cloroformio.

3) Una volta comparso l'effetto citopatico (sia al I° che al II° passaggio) occorre aspettare che almeno l'80% del tappeto cellulare sia distrutto prima di congelare la fiasca.

4) Il campione prima di essere inviato deve essere nuovamente trattato con il 10% di cloroformio e chiarificato a 3.000-3.500 rpm in centrifuga refrigerata per 20'.

5) La quantità di lisato cellulare da inviare deve essere almeno di 40 mL.

6) Congelare i lisati cellulari a -30°C ed inviarli in contenitori refrigerati o (meglio) in ghiaccio secco.

7) Ogni campione numerato deve essere corredato da una scheda di accompagnamento che descriva: il tipo di campione, il punto di prelievo, la quantità prelevata, il trattamento di concentrazione applicato, il numero di passaggi su colture cellulari ed il tipo di cellule utilizzate, nonché le indicazioni circa i trattamenti di decontaminazione effettuati e la quantità di chiarificato inviato in Istituto (vedi schede allegate).

CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE			
Campione:	Acqua potabile	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Acqua mare	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Acqua estuario	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Acqua fiume	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Acqua lago	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Altro		
Punto di prelievo:			
Quantità campione:			
Aspetto del campione:	Torbido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Opalescente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Limpido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Altro		
Trasporto refrigerato:	Si	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	No	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Conservazione del campione:	Tra 4-8°C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	-20°C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Altro		
Tempo di conservazione del campione prima della concentrazione:	24 h	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	48 h	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Altro		
Eventuali osservazioni:			

TRATTAMENTO DI CONCENTRAZIONE			
Prefiltrazione:	Si	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	No	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Membrane per la prefiltrazione:	Tipo		
	Porosità		
	Superficie		
	filtrante (cm ²):		
ULTRAFILTRAZIONE TANGENZIALE:	una fase	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	due fasi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ia fase			
Tipo di strumento:			
Membrane:	Tipo		
	Porosità		
	Superficie		
	filtrante (cm ²):		
Test di integrità membrane:	Si	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	No	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Osservazioni:		
Pretrattamento membrane:	Si	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	No	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Osservazioni:		
Soluzione di pretrattamento:	Tipo		
	pH		
	Quantità (mL):		
Q.tà di campione da concentrare:			
	Osservazioni:		
Tempo di esecuzione per la concentrazione:			

Q.tà di campione concentrato:			
Lavaggio membrane:	Si		
	No		
	Osservazioni:		
Soluzione di lavaggio:	Tipo		
	pH		
	Quantità (mL):		
Totale volume ottenuto (camp.concentrato+sol.lavaggio):			
IIa fase (riconcentrazione campione)			
Tipo di strumento:			
Membrane:	Tipo		
	Porosità		
	Superficie		
	filtrante (cm ²):		
Test di integrità membrane:	Si		
	No		
	Osservazioni:		
Pretrattamento membrane:	Si		
	No		
	Osservazioni:		
Soluzione di pretrattamento:	Tipo		
	pH		
	Quantità (mL):		
Tempo di esecuzione per la concentrazione:			
Q.tà di campione concentrato: dopo la II fase			
Lavaggio membrane:	Si		
	No		

	Osservazioni:	
Soluzione di lavaggio:	Tipo	
	pH	
	Quantità (mL):	
Quantità finale di concentrato (camp.concentrato+sol.lavaggio):		
Neutralizzazione della quantità finale di concentrato:	Si	<input type="checkbox"/>
	No	<input type="checkbox"/>
Altro metodo di riconcentrazione:		
Eventuali osservazioni:		
ADSORBIMENTO-ELUIZIONE:		
Quantità di campione da filtrare:		
Membrane:	n° di membrane	
	Tipo	
	Superficie filtrante (cm²):	
Eluente:	Tipo	
	pH	
	Quantità (mL):	
Numero di passaggi dell'eluente:		<input type="checkbox"/>
Quantità eluato ottenuto:		
Neutralizzazione	Si	<input type="checkbox"/>
	No	<input type="checkbox"/>
Eventuali osservazioni:		

SAGGIO SULLE COLTURE CELLULARI			
Decontaminazione del campione:	Cloroformio (10%)		
	Cloroformio (30%)		
	Antibiotici		
	Altro		
Culture cellulari:	BGM		
	Altre		
Q.tà totale del campione saggiato sulle colture cellulari:			
Numero di fiasche utilizzate per ciascun campione:			
Quantità del campione saggiato per fiasca:			
Descrizione effetto citopatico:	fiasca A		
	fiasca B		
	fiasca C		
	fiasca D		
Numero dei passaggi effettuati per ciascun campione:			
Risultati 1° passaggio:	fiasca A		
	fiasca B		
	fiasca C		
	fiasca D		
Risultati 2° passaggio:	fiasca A		
	fiasca B		
	fiasca C		
	fiasca D		
Risultati passaggi successivi:	fiasca A		
	fiasca B		

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Francesco Antonio Manzoli*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, giugno 1993 (n. 2) 12° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*