

UN NUOVO TIPO DI FILTRO PER LA CONCENTRAZIONE DEI VIRUS NELLE ACQUE

G. SANSEBASTIANO (a), E. BELLELLI (a), C. CESARI GIOVANARDI (a), F. ZILIOLI (a), G.P. GARDINI (b) e V. BOCCHI (b)

(a) Istituto di Igiene; (b) Istituto di Chimica Organica, Università degli Studi, Parma

Riassunto. - Sono state condotte prove di concentrazione di alcuni enterovirus nelle acque utilizzando un nuovo tipo di filtro costituito da fibra di vetro trattata con un polimero policationico. Le prove sono state effettuate in condizioni sperimentali controllate su soluzione fisiologica sterile artificialmente contaminata. L'eluizione è stata condotta in fase organica. Utilizzando filtri a membrana (diametro 47 mm) le percentuali di recupero dei virus Polio 1, Coxsackie B3 ed Echo 7 da campioni di 100 ml hanno variato dall'87,5% al 100%. Con filtri a cartuccia (diametro 5 cm, altezza 12 cm) il recupero del virus Polio 1 è risultato mediamente del 91%.

Summary (A new filter for viruses concentration in water). - Concentration tests of three enteroviruses in water were carried out using fiber-glass filters coated with a new policationic polymer. Experiments were performed under controlled conditions, on artificially contaminated saline solution. The elution was carried out in organic phase. By utilizing plated filters (diameter = 47 mm), recovery rates of viruses Polio 1, Coxsackie B3 and Echo 7 from 100 ml samples varied from 87.5% to 100%. With cartridge filters (diameter = 5 cm; height = 12 cm) and 5 liters samples, the average recovery rate of Poliovirus 1 was 91%.

Introduzione

Negli ultimi anni è andato costantemente aumentando l'interesse nel campo della ricerca di virus nelle acque superficiali, di scarico e destinate al consumo umano, da un lato per una più precisa valutazione epidemiologica della circolazione di alcuni patogeni in una determinata zona e dall'altro per verificare l'efficienza dei sistemi di disinfezione applicati sia ai trattamenti degli effluenti civili ed industriali sia ai trattamenti più o meno complessi di potabilizzazione.

Tutto ciò ha portato alla necessità di mettere a punto metodiche sempre più sensibili e semplici di concentrazione delle particelle virali anche in volumi consistenti di acqua.

In particolare per acque superficiali dolci e salmastre e per le acque destinate al consumo umano l'attenzione è stata rivolta principalmente a metodiche di filtrazione su diversi materiali quali gli esteri della cellulosa e la fibra di vetro, caratterizzati da cariche superficiali negative, in grado di adsorbire le particelle virali portate ad un pH inferiore al loro punto isoelettrico. La necessità di acidificare ed aggiungere cationi bi-trivalenti rappresenta ancora oggi un fattore limitante del metodo che ha dato, peraltro, come si ricava da diverse esperienze [1-5], buoni risultati in termini di recupero sia in condizioni sperimentali sia in prove dirette sul campo.

Si è cercato di superare queste difficoltà utilizzando dei materiali filtranti con cariche superficiali positive in modo da evitare cambi di pH e operando a concentrazioni idrogenioniche alle quali le particelle virali sono caricate negativamente.

Tra i primi lavori citiamo quelli di Sobsey e Glass [6] dove sono riportati i risultati comparativi di prove di concentrazione del Poliovirus di tipo 1 su filtri elettronegativi (Filterite) e su filtri elettropositivi (a membrana, diametro 47 mm) tipo Virosorb 1MDS e tipo Zeta Plus 50 S (AMF Cuno) da campioni di acqua di rete da 3,8 litri cadauno; questi primi dati hanno messo in evidenza un buon adsorbimento (valutato come differenza percentuale tra il titolo virale prima della filtrazione e quello trovato nel filtrato) degli Zeta Plus con un valore medio del $93\% \pm 4$ contro un $86\% \pm 10$ della Filterite. Significativamente inferiori sono risultate le percentuali di recupero dopo eluizione in fase organica (titolo virale nell'eluato/titolo virale prima della filtrazione $\times 100$): rispettivamente del $56\% \pm 8$ e del $60\% \pm 13$; praticamente identici i risultati ottenuti con il Virosorb 1MDS.

Successive ricerche condotte sul Rotavirus SA-11 [7] hanno messo in evidenza un recupero medio del $62\% \pm 16$ utilizzando filtri elettropositivi a membrana tipo Zeta Plus 60 S (AMF Cuno), porosità nominale $0,45 \mu\text{m}$; l'adsorbimento è risultato decisamente buono dato che nessuna attività virale è stata riscontrata nel filtrato; nello stesso lavoro è riportata una efficacia di recupero del $73\% \pm 5$ per il Poliovirus di tipo 1 [7].

Tali risultati sono stati ottenuti su volumi di acqua condottata di circa 2 litri.

Decisamente contenute le percentuali di recupero ottenute in uno studio condotto su circa 380 litri in volume di acque trattate destinate al consumo umano e artificialmente contaminate con virus Polio 1, Coxsackie B3 (Cox B3) ed Echo 7 [8]; i valori medi di recupero utilizzando filtri elettropositivi Virosorb 1MDS a cartuccia sono risultati del 36% (32-40%) per il Polio 1, del 44% (21-83%) per il Cox B3 e del 22% (13-28%) per l'Echo 7.

In un altro lavoro [9] condotto su volumi di 10 litri di acqua di rete artificialmente contaminata con Poliovirus 1 e utilizzando per la concentrazione filtri Zeta Plus (AMF Cuno) a membrana, è stata ottenuta una elevata percentuale di ritenzione, intorno al 99,5%, ma una percentuale di recupero medio molto inferiore, 42,8% con una variabilità molto elevata (valori estremi del 6 e del 118%).

Scopo della ricerca

Alla luce dei risultati delle diverse esperienze condotte con filtri elettropositivi a carica superficiale modificata tipo Zeta Plus e Virosorb 1MDS del commercio e tenendo conto di prove sperimentali da noi condotte con filtri a membrana tipo Virosorb 1MDS, che complessivamente hanno portato a buone percentuali di adsorbimento ma ad una elevata variabilità tra le varie prove e ad una piuttosto bassa percentuale complessiva di recupero, si è proceduto alla esecuzione di prove di concentrazione delle particelle virali su altri substrati filtranti costituiti da un supporto in fibra di vetro, porosità nominale di circa 5 µm, impregnato con un polimero policationico con cariche superficiali positive capace di adsorbire i virus a pH neutro ed anche a pH superiori a 7, senza la necessità quindi di modificare la concentrazione idrogenionica del mezzo.

In questo lavoro preliminare ci si è proposti di verificare la capacità di adsorbimento dei nuovi filtri e la percentuale di recupero finale di alcuni enterovirus, operando dapprima su piccoli volumi e successivamente su volumi più consistenti di acqua, artificialmente contaminata, con caratteristiche chimico-fisiche strettamente controllate: composizione salina e pH definiti, assenza di sostanze organiche e di solidi sospesi in quantità dimostrabili.

Materiali e metodi

Preparazione filtri (denominati VIPPY). - Sono stati sperimentati dischetti di supporto in fibra di vetro di varie dimensioni e porosità. Per le esperienze qui di seguito illustrate sono stati scelti quelli con diametro (d) di 47 mm e con porosità nominale di circa 5 µm. Dischetti di tessuto in fibra di vetro vengono impregnati con una soluzione di azolo (risultati del tutto sovrapponibili sono stati ottenuti con anilina o anilina sostituita) in acetato di etile. Dopo evaporazione del sol-

vente, i dischetti vengono immersi in soluzione acquosa di sostanza ossidante che, nella maggior parte delle prove da noi condotte, era costituita da opportune concentrazioni di sali ferrici. Risultati sovrapponibili sono stati raggiunti utilizzando sali rameici ovvero persolfati alcalini o di ammonio. Nel tempo di circa tre ore il filtro assume una colorazione scura dovuta alla formazione e deposito sulle fibre di un polimero policationico. Si lava accuratamente con acqua, poi con acetone e si secca sotto vuoto [10].

Un procedimento analogo è stato usato per la preparazione di filtri a cartuccia in fibra di vetro impregnati di polimero policationico, di forma e dimensione a piacere, preferibilmente già montati sui supporti di materiale plastico comunemente reperibili in commercio per i filtri a cartuccia.

Decontaminazione termica. - I filtri così preparati sono stati sottoposti ad un trattamento a vapor fluente per 30 minuti al fine di inattivare eventuali particelle virali presenti e successivamente, in asepsi, posti negli appositi contenitori preventivamente trattati con raggi UV.

Coltivazione e virus saggiati. - Sono stati saggiati il Poliovirus vaccinale tipo 1 stipite Mahoney, uno stipite di virus Coxsackie B3 ed uno stipite di virus Echo 7; i virus sono stati fatti crescere in colture cellulari di rene di scimmia in linea continua (stipite RC37). Dopo completa degenerazione dello strato cellulare, il liquido di coltura è stato raccolto e centrifugato per 5-10 minuti a 1.000-1.500 giri/min onde eliminare i detriti cellulari. Il titolo virale è stato calcolato con il metodo di Reed e Muench ed espresso in dosi infettanti il 50% delle colture (TCID₅₀). Il sopranatante è stato raccolto e congelato a -20 °C fino al momento della prova.

Prove con filtri a membrana VIPPY. - Le prove sono state eseguite facendo passare su membrane filtranti aventi diametro di 47 mm, campioni di 100 ml di soluzione fisiologica sterile (SF) - NaCl 0,85% in acqua bidistillata - portata a pH 7 con tampone fosfato, artificialmente contaminata con i virus Polio 1, Coxsackie B3 e Echo 7. Ulteriori prove a pH 6 ed a pH 8 sono state effettuate sul Poliovirus di tipo 1.

L'eluizione dei virus dei filtri è stata condotta facendo passare sul filtro 100 ml di una soluzione di Beef-Extract al 3% portata a pH 9,5 con NaOH 1N. Si è proceduto quindi alla determinazione del titolo virale sulla soluzione di partenza, sulla soluzione filtrata e sull'eluato mediante semina di 0,1 ml di ciascun campione, opportunamente diluito in base 10, per tubo di coltura, in tubi di coltura di rene di scimmia (5 tubi per ogni diluizione); la lettura veniva effettuata in quarta ed in sesta giornata ed il titolo virale era calcolato con il metodo di Reed e Muench.

Prove con filtri a cartucce VIPPY. - Sono stati utilizzati filtri a cartuccia di 12 cm di altezza (h) e di 5 cm di diametro (d) e campioni costituiti da 5 litri di solu-

zione fisiologica sterile, artificialmente contaminati con Poliovirus di tipo 1 e portati a pH 7.

Le particelle virali adsorbite ai filtri sono state successivamente eluite con 500 ml di soluzione al 3% di Beef-Extract portata a pH 9,5 con NaOH 1N. L'eluato così ottenuto è stato poi filtrato su membrana di acetato di cellulosa (0,45 µm di porosità) per eliminare eventuali contaminazioni batteriche. Si è quindi proceduto all'acidificazione dell'eluato a pH 3,5 con soluzione di HCl 1N mantenendolo in agitazione per permettere la flocculazione. Dopo centrifugazione a 4.000 giri/min per 10 min, il sedimento è stato ripreso con 5 ml di tampone fosfato a pH 9 (Na₂ HPO₄ 0,15 M) e pipettato fino a completa solubilizzazione.

Il titolo virale è stato determinato come già descritto secondo il metodo di Reed e Muench.

Prove con dischi e cartucce filtranti in fibra di vetro non trattati con il polimero. - Utilizzando piccoli volumi di soluzione fisiologica sterile artificialmente contaminata con Poliovirus vaccinale di tipo 1, sono state condotte prove di filtrazione utilizzando filtri in fibra di vetro a membrana del diametro di 47 mm e a cartuccia (h = 12 cm) non trattati con il polimero, nelle stesse condizioni di pH.

Risultati

Le prove condotte su filtri a membrana VIPPY (diametro 47 mm) con il Poliovirus vaccinale di tipo 1 a pH 7 hanno mostrato nel complesso una buona capacità di adsorbimento dei filtri con una percentuale media nel filtrato intorno allo 0,1%; da sottolineare che in 6 delle 11 prove condotte è risultata assente attività virale nel filtrato (Tab. 1). Anche la percentuale complessiva di re-

cupero è risultata abbastanza buona, intorno al 93%, con un coefficiente di variazione (CV) del 17,9%; i valori estremi sono risultati compresi tra il 70 ed il 120%.

Per una conferma della buona capacità di adsorbimento e di recupero sono state condotte, nelle stesse condizioni, prove con cartucce filtranti, preparate come descritto in "Materiali e metodi", utilizzando 5 litri di soluzione fisiologica sterile artificialmente contaminata con il Poliovirus di tipo 1. Le dieci prove condotte (Tab. 1) hanno mostrato una percentuale di ritrovamento nel filtrato del 6,01% come valore medio ed un recupero medio del 90,93% (CV = 11,39%).

In otto delle dieci prove effettuate si è inoltre proceduto alla riconcentrazione in fase organica secondo la metodica già descritta, ottenendo valori di recupero virale in media dell'82,62% (CV pari al 6,6%).

Sempre utilizzando il Poliovirus vaccinale di tipo 1 sono state condotte prove di filtrazione su filtri a membrana VIPPY a pH 6 ed a pH 8 per verificare eventuali differenze di recupero (Tab. 2).

Le prove condotte a pH 6 hanno mostrato, pur con una certa variabilità, un buon recupero. Il valore medio è risultato infatti del 104,5% (CV pari a 17,3%) con valori estremi compresi tra il 79 ed il 135%; molto bassa e decisamente inferiore al valore determinato a pH 7 la percentuale di ritrovamento nel filtrato, di media 0,003 con assenza di attività virale in 4 prove su 10 eseguite.

La situazione è apparsa un po' diversa a pH 8 in quanto, pur risultando bassa la percentuale di ritrovamento nel filtrato (media pari a 0,004) la percentuale media di recupero è risultata dell'89%, leggermente inferiore a quella determinata a pH 7 (CV pari a 10,2%).

Nella Tab. 3 sono poi riportati i risultati delle prove condotte, su piccoli volumi ed utilizzando membrane filtranti VIPPY, con i virus Coxsackie B3 ed Echo 7 a pH 7. Come si vede è apparsa decisamente buona la per-

Tabella 1. - Polio 1. Percentuali di virus presenti nell'eluato e nel filtrato in varie prove condotte su diversi volumi di acqua a pH 7 (filtri VIPPY)

Prove N.	Filtri a membrana (d = 47 mm) (a)		Filtri a cartuccia (h = 12 cm) (b)		
	vol. 100 ml		vol. 5.000 ml		
	eluato (%)	filtrato (%)	eluato (%) tal quale	concentrato	filtrato (%)
1	100	0,1	100	--	0
2	82	0,1	100	--	0
3	100	0,1	79,5	75	2,1
4	75	0,13	110	90	4,5
5	115	0	90	86	9
6	94,6	0	88,5	84	3
7	74	0	89	85	6
8	70	0,5	84	80	13,5
9	120	0	75,3	75	11
10	87	0	93	86	11
11	101,7	0	--	--	--
Media	92,66	0,08	90,93	82,62	6,01
CV	17,91%	--	11,39%	6,59%	--

(a) d = diametro

(b) h = altezza

Tabella 2. - Polio 1. Percentuali di virus presenti nell'eluato e nel filtrato in varie prove condotte su 100 ml di acqua a pH 6 e a pH 8 (filtri VIPPY)

Prove N.	Filtri a membrana (d = 47 mm) (a)			
	pH 6		pH 8	
	eluato (%)	filtrato (%)	eluato (%)	filtrato (%)
1	100	0	80	0,003
2	113	0,001	80	0
3	100	0,02	100	0,01
4	100	0,004	83	0,002
5	85	0	90	0,01
6	135	0,002	100	0,001
7	79	0	89	0,002
8	133	0	79	0,005
9	100	0,001	100	0
10	100	0,006	---	---
Media	104,50	0,003	89,00	0,004
CV	17,32%	---	10,22%	---

(a) d = diametro

Tabella 3. - Echo 7 e Cox B3. Percentuali di virus presenti nell'eluato e nel filtrato in varie prove condotte su 100 ml di acqua a pH 7 (filtri VIPPY)

Prove N.	Filtri a membrana (d = 47 mm) (a)			
	Echo 7		Cox B3	
	eluato (%)	filtrato (%)	eluato (%)	filtrato (%)
1	80	0	100	0,01
2	80	0,1	113	0,02
3	80	0	118	0
4	102	0,1	90	0
5	80	0,03	114	0
6	80	0,07	95	0,04
7	100	0,002	100	0,01
8	98	0	104	0
9	---	---	75	0
Media	87,50	0,038	101,00	0,009
CV	11,89%	---	13,31%	---

(a) d = diametro

centuale di recupero complessiva per il Cox B3, 101% in media, con un CV pari al 13,3%, valori estremi 75 e 118%. La quota di virus persa nel filtrato è rimasta decisamente bassa, in media 0,009.

Per quanto riguarda l'Echo 7 mentre è risultata decisamente contenuta la variabilità tra le diverse prove, con un CV pari all'11,9%, non troppo elevata è risultata la percentuale di recupero, in valore medio pari all'87,5% con valori estremi dell'80 e del 102%. Molto bassa anche in questo caso è risultata la quota persa nel filtrato, 0,038 in media.

Le prove condotte, con dischi e cartucce filtranti in fibra di vetro non trattate con il polimero hanno dimostrato che a pH 7 la capacità adsorbente di tali substrati è praticamente nulla con presenza di attività virale nel campione filtrato pari alla attività virale presente nel campione di partenza.

Considerazioni e conclusioni

Dai risultati preliminari ottenuti in prove sperimentali controllate con l'impiego dei nuovi filtri VIPPY si possono trarre alcune considerazioni di ordine generale sulle possibili future applicazioni pratiche di tali sistemi di concentrazione per la ricerca di virus in acque profonde ed in acque superficiali, su volumi di acqua significativi.

Un primo punto di particolare importanza riguarda la capacità di adsorbimento di tali filtri (differenza percentuale fra il titolo virale prima e dopo filtrazione) che, nelle condizioni operative, è risultata decisamente buona, con perdite quasi sempre inferiori all'1% ed in molti casi, come è riportato nei risultati, con assenza nel filtrato di attività virale per i filtri a membrana, mentre più elevate, mediamente del 6% sono le perdite con i filtri a cartuccia.

Non è da escludere *a priori* che si possa arrivare ad un adsorbimento ancora maggiore una volta standardizzato meglio il metodo di preparazione del complesso filtrante ed in modo particolare l'incollaggio del supporto di fibra di vetro per i filtri a cartuccia ed il loro perfetto adattamento ai portafiltri.

Decisamente buona è apparsa anche la percentuale di recupero (differenza percentuale tra il titolo virale prima della filtrazione e dopo eluizione) dei dischi e delle cartucce filtranti e piuttosto contenuta la variabilità tra le diverse prove. Le pur modeste differenze percentuali di recupero potrebbero essere attribuite, oltre che a limiti intrinseci della tecnica, anche ad una non omogeneità dell'eluente utilizzato. A tale proposito va ricordato uno studio eseguito negli USA [11] nel quale sono stati messi a confronto diversi eluenti e addirittura diversi lotti di un medesimo eluente; i risultati hanno mostrato che in effetti è riscontrabile tra le diverse sostanze impiegate una notevole variabilità, legata probabilmente ai diversi metodi industriali di preparazione delle stesse.

Sarà opportuno valutare nella continuazione della ricerca, quali altri metodi di eluizione possano essere applicati in modo da ridurre il più possibile tale fonte di variabilità.

L'influenza della concentrazione idrogenionica sulla percentuale di recupero, per quanto abbiamo constatato concentrando il virus Polio 1 a tre diversi valori di pH (6, 7 e 8) è modesta, anche se recuperi un poco migliori si ottengono ai valori di pH più bassi. Le differenze per

altro non risultano significative. In sostanza la metodica di concentrazione dei virus per filtrazione sui filtri VIPPY, da noi messi a punto, per quanto ancora preliminarmente sperimentata, ha molti dei vantaggi di altre che utilizzano filtri elettropositivi già in commercio. Non richiede infatti acidificazione preliminare e aggiunta di cationi bi- o trivalenti; consente l'utilizzazione di filtri a cartuccia che, per dimensioni e resistenza alla pressione, consentono la filtrazione di volumi rilevanti di acqua, con portate intorno ai 5-6 litri/min.

Inoltre in condizioni controllate di laboratorio, che includono la concentrazione di virus artificialmente aggiunti in soluzioni acquose tamponate prive di sostanze interferenti e la filtrazione di volumi di acqua non superiori a 5 litri, le percentuali di recupero sono risultate buone, uguali e superiori all'87% in media e comunque ben superiori a quelle rese note per i filtri elettropositivi attualmente disponibili; la variabilità dei risultati inoltre risulta significativamente più contenuta.

Si tratta ora di verificare se questi risultati si ripetano anche nella sperimentazione pratica, su acque distribuite a scopo potabile, prima e dopo trattamento di depurazione, su acque superficiali dalle composizioni più diverse e lavorando su volumi ben maggiori di quelli fin qui saggiati.

Ricevuto il 18 novembre 1987.

Accettato l'8 febbraio 1988.

BIBLIOGRAFIA

1. WALLIS, C. & MELNICK, J.L. 1967. Concentration of enterovirus on membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **1**: 472-477.
2. WALLIS, C. & MELNICK, J.L. 1967. Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membrane. *Bull. WHO* **36**: 219-225.
3. KATZENELSON, E., FATTAL, B. & HOSTOVESKI, T. 1976. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 638-639.
4. SANSEBASTIANO, G. & BELLELLI, E. 1980. Sulla concentrazione dei virus nelle acque con il metodo delle membrane filtranti. *Ig. Mod.* **5**: 759-789.
5. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION & WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. 1975. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 15. edition. A.E. Greenberg, R.R. Trussel & L.S. Clesceri (Eds). Ed. American Public Health Association, Washington, DC.
6. SOBSEY, M.D. & GLASS, J.S. 1980. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 201-210.
7. 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.
8. STETLER, R.E., WARD, R.L. & WALTRIP, S.C. 1984. Enteric virus and indicator bacteria levels in a water treatment system modified to reduce trihalomethane production. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 319-324.
9. SCHLAAK, M., TISHIER, E. & LOPEZ, J.M. 1983. Untersuchungen zur Effizienz Aktueller Nachweisverfahren von viren Wasser. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. 1 Orig. B* **177**: 127-140.
10. Università degli Studi di Parma. *Procedimento chimico per la formazione di filtri conduttori e loro applicazioni*, 24 settembre 1987. BREVETTO n. 42512 A/87.
11. 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**: 1326-1331.