



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Liquami di origine domestica:
rischio sanitario e metodologie analitiche**

A cura di F. A. Aulicino e L. Volterra

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

00/17

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Liquami di origine domestica:
rischio sanitario e metodologie analitiche**

A cura di **Francesca Anna Aulicino e Laura Volterra**
Laboratorio di Igiene Ambientale

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

00/17

Istituto Superiore di Sanità

Liquami di origine domestica: rischio sanitario e metodologie analitiche.

A cura di Francesca Anna Aulicino e Laura Volterra

2000, 106 p. Rapporti ISTISAN 00/17

Corpi idrici superficiali e sotterranei possono subire contaminazioni in conseguenza di smaltimento improprio di liquami non correttamente trattati, con conseguente diffusione di microrganismi nocivi per l'ambiente e pericolosi per la salute. La normativa italiana relativa alla qualità dei reflui domestici, risalente agli anni '70, è stata recentemente aggiornata, nell'ambito del Dl.vo 152 dell'11 maggio 1999, con il recepimento della direttiva comunitaria 91/271/CEE. In considerazione del fatto che i liquami sono il punto di partenza della circolazione dei contaminanti nell'ambiente, questa tematica merita più attenzione, ma i dati sull'impatto ambientale e sanitario di smaltimenti impropri di reflui sono piuttosto carenti. Pertanto è stato promosso un workshop, svoltosi presso l'Istituto Superiore di Sanità (26-27 ottobre 1998), e questo rapporto raccoglie alcune relazioni che sono state presentate relative a tematiche afferenti il contenuto di microrganismi patogeni di natura batterica, virale, protozoaria. Vengono anche considerate tematiche afferenti il Dl.vo 626/94 relativamente ai criteri di campionamento di bioaerosol e al possibile effetto di patogeni diffusi per via aerea su operatori addetti al trattamento dei liquami.

Parole Chiave: Batteri, Inquinamento fecale, Liquami, Smaltimento liquami, Virus enterici

Istituto Superiore di Sanità

Domestic sewage: sanitary risk and methods.

Edited by Francesca Anna Aulicino and Laura Volterra

2000, 106 p. Rapporti ISTISAN 00/17 (In Italian)

Contamination of surface and groundwaters by improperly discharged sewages is responsible of the spreading of microorganisms harmful for environment and man. The Italian normative on waste water quality dating back to the '70ies it was recently updated, including the EEC Directive 91/271 on sewage, within the Italian Legislative Decree no. 152 of May 11, 1999. Scientific data on environmental and sanitary impact of unproper disposals are limited. The aim of this report is to collect different topics discussed in a workshop held at the Istituto Superiore di Sanità (October 26-27, 1998). The report includes various arguments on pollution sources, their effects on territory, microbiological quality of surface and groundwaters, microbiological contamination of vegetables. Methodological and sampling aspects concerning water and bioaerosol as well as the possible effects on sewage treatment plant operators are also treated.

Key Words: Bacteria, Enteric viruses, Fecal pollution, Sewage disposal, Sewages

Si ringraziano la Dr.ssa Patrizia Orsini, il Dr. Mario Carere e la Dr.ssa Laura Costanzo per la collaborazione alla raccolta dei documenti che fanno parte di questo rapporto, nonché averne curato l'*editing*.

Indice

Introduzione	1
Lo smaltimento dei reflui di origine domestica e la contaminazione microbiologica delle acque e del suolo Francesca Anna Aulicino	2
Tecniche analitiche per il rilevamento di virus enterici nei liquami e nei fanghi di impianti depurazione Francesca Anna Aulicino, Mario Carere, Patrizia Orsini	20
I virus enterici nei liquami Anna Maria Patti	33
I protozoi nei liquami: significato e tecniche di rilevamento Patrizia Rossi, Edoardo Pozio.....	39
I batteri patogeni e gli indici di fecalizzazione nei liquami di origine domestica Rosalaura Oliveri	48
Persistenza di virus enterici in alimenti di origine vegetale Luciana Croci, Concetta Scalfaro, Alfonsina Fiore, Laura Toti	55
Gli impianti di depurazione di liquami e sicurezza dei lavoratori Antonio Colombi, Stefano Basilico.....	60
Orientamenti per stabilire i criteri di campionamento di bioaerosol Achille Marconi	70
Ricerca di colifagi in acque reflue, aerosol e fanghi in un impianto di depurazione e in acque di lago Livio Marossi	83
Metodologie di campionamento delle acque ed altre matrici Franco Leoncini	92
Il telerilevamento e le sue applicazioni sul territorio Giorgio Catena	98

Introduzione

Il presente rapporto tratta di argomenti inerenti i liquami e i fanghi come fonte di contaminazione identificando i loro effetti sul territorio in considerazione della possibilità di diffusione idrica di contaminanti e di conseguenze negative per l'ambiente.

A fronte delle maggiori richieste di beni di consumo, anche in conseguenza dei cambiamenti climatici, argomento attualmente dibattuto, la sempre minore disponibilità di risorse idriche sta evidenziando l'esigenza del riutilizzo di acque reflue sia a fini agricoli sia ai fini potabili.

Una gestione poco attenta dei reflui può causare notevoli danni sanitari ed ecologici su acque fluviali, lacustri, marine, sotterranee, ma anche su suoli e coltivazioni. Di conseguenza, deve essere valutato il possibile rischio per la popolazione potenzialmente esposta.

Il controllo della qualità e della quantità dei liquami prodotti e l'accertamento della efficienza degli impianti di depurazione sono indispensabili per proteggere il territorio dal degrado ambientale e sanitario e per valutare i possibili trattamenti in funzione dei riusi di queste matrici.

Il controllo della qualità ambientale, promosso attraverso la politica dei monitoraggi, non può prescindere dalla applicazione dei sistemi di buona pratica di laboratorio, che sono indispensabili per la costruzione di banche dati in cui la base comparativa sia corretta. L'ambiente visto in modo integrato può essere salvaguardato, così come la popolazione in relazione alla prevenzione di malattie.

Questo rapporto contiene alcune relazioni presentate nell'ambito del workshop "La contaminazione microbiologica degli ambienti idrici e le fonti di contaminazione: aspetti igienico-sanitari e metodologici" tenutosi presso l'Istituto Superiore di Sanità, dal 26 al 27 ottobre 1998. -Il workshop, per quanto attiene la specifica problematica dei liquami, è stato realizzato nell'ambito del progetto PR 28/IS "Indagine microbiologica su reflui di origine domestica (depurati e non) per valutazioni di efficienza di trattamento negli impianti di depurazione e valutazioni dell'influenza, su corpi idrici recettori, di contaminanti biologici tra cui i virus enterici" finanziato dal Ministero dell'Ambiente (1998-2000).

LO SMALTIMENTO DEI REFLUI DI ORIGINE DOMESTICA E LA CONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA DELLE ACQUE E DEL SUOLO

Francesca Anna Aulicino

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità. Roma

Introduzione

Gli effluenti di impianti di depurazione di liquami domestici devono essere smaltiti secondo modalità che consentano la salvaguardia della salute degli esseri viventi e dell'equilibrio ambientale.

I liquami, che costituiscono una matrice particolare caratterizzata da una grande varietà e da elevati numeri di microrganismi, tra cui patogeni, in molti casi sono scaricati dopo trattamenti parziali o senza aver subito alcun tipo di trattamento, in corpi idrici superficiali destinati a diversi usi, da quello ricreazionale a quello per approvvigionamento potabile. Ciò può determinare contaminazioni consistenti, che, in funzione dei diversi utilizzi cui sono destinati i comparti idrici riceventi, possono influire negativamente sulla salute della popolazione per la diffusione di malattie anche ad andamento epidemico. Possono, inoltre, determinarsi fenomeni che influenzano l'equilibrio ambientale e che determinano eutrofizzazione e distruzione della vita acquatica.

I patogeni ed i parassiti presenti nei liquami domestici ed il rischio

Centinaia di gruppi di patogeni caratterizzano i liquami in quantità e varietà diverse a seconda delle localizzazioni geografiche, delle stagioni, della incidenza delle malattie nella popolazione, dello stato economico della popolazione, del tipo di uso che si fa dell'acqua e della qualità dell'acqua potabile.

Gli agenti infettivi in grado di indurre patologie sono batteri, virus, protozoi ed elminti patogeni, ma anche opportunisti patogeni, microrganismi, che sono in grado di interpretare il ruolo di patogeni per individui che si trovano in stato di compromissione. Nella Tabella 1 sono elencati i principali gruppi di patogeni presenti nei liquami con le specie più frequentemente rilevate nonché le malattie indotte (1, 2). Nella Tabella 2 sono elencati i batteri opportunisti patogeni (3-5).

Il potenziale, per un agente biologico, di causare infezione in un ospite suscettibile dipende da diversi fattori: tipo di agente infettivo, modalità di trasmissione e di ingresso, suscettibilità dell'ospite. Il ruolo giocato dalla suscettibilità dell'ospite è in stretta relazione allo stato immunitario naturale, che è geneticamente specifico e varia in funzione della razza, dell'età (gli individui più anziani e più giovani sono quelli più suscettibili alle infezioni), della salute fisica, ecc.

Tabella 1. Microrganismi patogeni nei liquami di origine domestica e malattie indotte (1, 2)

	MICROORGANISMI	MALATTIE
Batteri	<p><i>Salmonella</i></p> <p><i>Shigella</i></p> <p><i>Vibrio cholerae</i></p> <p><i>Escherichia coli</i> enteropatogena</p> <p><i>Yersinia enterocolitica</i></p> <p><i>Campylobacter fetus</i> e <i>C. jejuni</i></p> <p><i>Legionella pneumophila</i></p> <p><i>Bacteroides fragilis</i></p> <p><i>Leptospira</i></p>	<p>Febbri tifoidi e paratifoidi</p> <p>Dissenteria bacillare emorragica</p> <p>Colera</p> <p>Gastroenteriti acute</p> <p>Adeniti acute nei bambini, artriti, setticemia, eritema nodoso</p> <p>Gastroenteriti</p> <p>Polmoniti, febbre di Pontiac, infezioni ospedaliere</p> <p>Diarrea</p> <p>Leptosirosi (reni e sistema nervoso centrale)</p>
Virus	<p>Adenovirus</p> <p>Enterovirus (poliovirus, echovirus, coxsackievirus, enterovirus 68-71)</p> <p>Epatite A virus</p> <p>Epatite E virus</p> <p>Reovirus</p> <p>Rotavirus</p> <p>Norwalk virus (calicivirus)</p> <p>Astrovirus</p>	<p>Malattie respiratorie, congiuntiviti, gastroenteriti</p> <p>Paralisi, meningiti asettiche, malattie respiratorie, febbri, miocarditi, pericarditi, malattie cardiache congenite, ecc.</p> <p>Epatite infettiva</p> <p>Epatite infettiva</p> <p>Affezioni respiratorie</p> <p>Gastroenteriti</p> <p>Gastroenteriti</p> <p>Gastroenteriti</p>
Protozoi	<p><i>Giardia lamblia</i></p> <p><i>Entamoeba histolytica</i></p> <p><i>Cryptosporidium parvum</i></p>	<p>Giardiasi</p> <p>Dissenteria amebica</p> <p>Diarrea, febbre</p>
Elminti	<p><i>Ascaris lumbricoides</i></p> <p><i>Trichuris trichiura</i></p>	<p>Ascariasi (intestinale)</p> <p>Tricuriasi (intestinale)</p>

Tabella 2. Batteri opportunisti patogeni presenti nei liquami e malattie indotte (3, 4, 5)

BATTERI OPPORTUNISTI	MALATTIE INDOTTE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infezioni di ferite ed ustioni, gastroenteriti in neonati, infezioni urinarie, meningiti, broncopolmoniti, endocarditi, ecc
<i>Aeromonas spp</i>	Gastroenteriti, endocarditi, setticemie, infezioni di ferite
<i>Klebsiella spp</i>	Batteriemie, polmoniti, infezioni urinarie
<i>Flavobacterium spp</i>	Infezioni di ferite e di ustioni, infezioni della gola
<i>Enterobacter cloacae, E. agglomerans</i>	Batteriemie, setticemie in individui immunocompromessi
<i>Citrobacter</i>	Batteriemie, meningiti neonatali, diarree
<i>Serratia marcescens</i>	Batteriemie
<i>Acinetobacter</i>	Setticemie, meningiti, endocarditi, ascessi cerebrali e polmonari, polmoniti, infezioni urinarie
<i>Proteus vulgaris, P. mirabilis</i>	Infezioni urinarie, gastroenteriti da alimenti
<i>Mycobacterium avium-intracellulare e Mycobacterium kansasii</i>	Malattie polmonari ed altri tipi di infezioni ospedaliere

La valutazione degli agenti infettivi è basata sul loro potenziale a causare malattia e sulla loro virulenza, che sono strettamente in relazione sia alla dose minima infettante necessaria per indurre l'infezione ed i conseguenti stati morbosi, sia alla stabilità mostrata alle condizioni ambientali.

Nelle Tabelle 3 e 4 sono riportati i valori delle dosi minime infettanti (DMI) di diversi organismi patogeni (1, 2, 6) e le quantità rilevate nel materiale fecale e nei liquami (Tabella 4) (2, 3, 7, 8, 9, 10, 11). Per i batteri, generalmente, si registrano dosi minime infettanti piuttosto elevate (fino a 10^7 - 10^8), anche se microrganismi come *Shigella* riescono ad indurre infezioni in quantità piuttosto basse. Per protozoi (cisti), elminti (uova) e virus enterici le dosi minime infettanti si aggirano sempre su valori bassi (ordine di unità o decine) (Tabella 3) (1, 2, 6).

Tabella 3. Dosi minime infettanti di alcuni patogeni (1, 2, 6)

ORGANISMI	DOSE MINIMA INFETTANTE
<i>Salmonella spp</i>	10^4-10^7
<i>Shigella spp</i>	10^1-10^2
<i>Escherichia coli</i>	10^6-10^8
<i>Vibrio cholerae</i>	10^3
<i>Giardia lamblia</i>	10^1-10^2 (cisti)
<i>Cryptosporidium</i>	10^1-10^3 (oocisti)
<i>Ascaris</i>	1- 10^1 (uova)
Hepatitis A virus	1-10 UFP
Echovirus 12	17 UFP
Rotavirus	1-10 UFP

UFP= Unità Formanti Placca

Tra i microrganismi patogeni particolare attenzione suscitano

- Salmonelle, batteri della famiglia delle Enterobatteriacee con più di 2.000 sierotipi, largamente distribuite nell'ambiente, predominanti nei liquami e che causano tifo, paratifo e gastroenterite. Sono presenti nei liquami fino a 8.000/100 mL (7).
- Shigelle, batteri agenti della dissenteria emorragica, piuttosto difficili da coltivare, tanto che sono scarsamente disponibili dati quantitativi sulla loro presenza nei liquami.
- *Vibrio cholerae*, batterio a trasmissione quasi esclusivamente idrica. La malattia indotta da questo microrganismo (diarrea, vomito, ecc) è endemica in vari paesi asiatici. È stato rilevato nei liquami in quantità di $10^1-10^5/100$ mL durante periodi epidemici (8). Epidemie di colera sono risultate associate al consumo di vegetali eduli contaminati (2).
- *Escherichia coli*, che può rappresentare un rischio connesso all'induzione di gastroenteriti. Nell'ambito di questa specie esistono varietà enterotossigene, che inducono gastroenteriti, varietà enteropatogene, che costituiscono dal 2 all'8% di *Escherichia coli* isolate dalle acque e che inducono la diarrea del viaggiatore, varietà enteroemorragiche e varietà enteroinvasive. La dose minima infettante è piuttosto alta: 10^6-10^8 organismi (2).

Tabella 4. Quantità di alcuni microrganismi patogeni nei liquami e nelle feci (3, 7, 8, 9, 10, 11)

MICROORGANISMI	N/L DI LIQUAME	N/G DI MATERIALE FECALE
<i>Salmonella spp</i>	10^1-10^4	10^{12}
<i>Shigella spp</i>	$1-10^3$	10^9
<i>Vibrio cholerae</i>	10^1-10^6	n.d.
<i>E. coli</i> enteropatogena	10^0-10^5	n.d.
<i>Bacteroides fragilis</i>	10^6-10^7	n.d.
Virus enterici	10^0-10^5 (liquame grezzo) 10^0-10^2 (liquame trattato)	10^{10} (rotavirus)
<i>Giardia lamblia</i>	10^2-10^3 cisti (liquame grezzo)	$1-10^6$ cisti
Cryptosporidium	10^2-10^4 (liquame grezzo) 10^0-10^3 (effluente)	n.d.
<i>Ascaris lumbricoides</i>	10^1 (liquame grezzo) 10^1 (effluente)	n.d.
<i>Entamoeba histolytica</i>	$0-10^3$ (liquame grezzo)	n.d.

n.d.= non determinato

- I virus enterici sono rappresentati da circa 140 tipi diversi comprendenti specie in grado di indurre un largo spettro di malattie variabili da congiuntiviti, gastroenteriti, affezioni respiratorie a miocarditi, meningiti, paralisi, epatiti (Tabella 1). Tra i virus enterici, il Norwalk virus è sospettato di essere causa di gastroenteriti tra i bagnanti utilizzatori di acque contaminate fecalmente. Il numero e il tipo di virus nei liquami sono caratterizzati da estreme variazioni in funzione della incidenza delle infezioni nella popolazione. Nei liquami grezzi sono riportati valori massimi di 10^5 particelle infettive/L, nei liquami trattati 10^0-10^3 /L. Nei corpi idrici recettori sono presenti in quantità meno consistenti (Tabella 5) poichè soggiacciono agli effetti di diluizione, di inattivazione determinati dall'influenza di temperatura, insolazione solare, pH ecc, nonché a fenomeni di adsorbimento. Nonostante la quantità di queste particelle microbiche risulti generalmente bassa la loro presenza non va sottovalutata per la possibilità che essi producano infezione a dosi infettanti minime, anche dell'ordine delle unità. A ciò si aggiunga che altri fattori, come le sostanze organiche e il materiale particellato nelle matrici ambientali, esplicano funzioni protettive nei loro confronti, prolungandone la sopravvivenza.

Tabella 5. Le quantità dei virus enterici in diverse matrici

MATRICE	QUANTITÀ DI VIRUS ENTERICI
Materiale fecale	Fino a 10^{10} /g
Liquami grezzi	$1-10^5$ /L
Liquami trattati	$0-10^3$ /L
Fiumi e laghi	$0,1-10^2$ /L
Mare	$0,01-10^1$ /L

- Agenti di malattie parassitarie sono protozoi ed elminti, che, come cisti e come uova, vengono eliminati con le feci dell'uomo e di altri animali infetti. Protozoi come *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum*, le cui cisti si possono trovare nei liquami e nei fanghi, sono di interesse sanitario (Tabella 1). Da indagini condotte negli Stati Uniti è stato rilevato che le quantità di cisti di *Giardia* presenti nei liquami grezzi variano da 10^2 a 10^3 /L, con punte di 10^5 /L. Quantità pari a 48 cisti /40L sono state enumerate dopo trattamento a fanghi attivi, quantità molto basse, pari a 0.3 cisti / 40 L sono state rilevate dopo trattamenti di filtrazione su sabbia. Sebbene la usuale modalità di trasmissione è quella da persona a persona, *Giardia* è riconosciuto come uno degli agenti etiologici più importanti nelle malattie epidemiche di origine idrica. La maggior parte delle epidemie di *Giardia* è risultata associata al consumo di acqua non idoneamente trattata o trattata solo per clorazione senza preventiva filtrazione. La filtrazione è, molto efficace nella rimozione delle cisti di questo protozoo (1). *Cryptosporidium parvum* è stato riconosciuto responsabile di epidemie associate all'uso di acque non idoneamente trattate. La recente legislazione europea in tema di acque potabili ne prevede il rilevamento per acque distribuite di origine superficiale non in linea con i limiti stabiliti (12). Gli elminti possono rappresentare un rischio consistente poiché, come uova, sono in grado di resistere a condizioni ambientali anche molto sfavorevoli per tempi molto lunghi. Durante le fasi di trattamento dei liquami le uova di elminti tendono più facilmente e più rapidamente delle cisti di protozoi a sedimentare, essendo in genere più pesanti. Per cui, generalmente, la matrice solida tende ad essere più ricca di uova di elminti e quella acquosa di cisti di protozoi. In ogni caso sia le cisti dei protozoi che le uova di elminti si ritrovano nei liquami e il problema del loro abbattimento deve essere risolto a livello della linea di trattamento affinché non si verifichi una loro diffusione ambientale a seguito di smaltimento in campo agricolo, ecc. Gli elminti sono comunque molto più

Tabella 6. Probabilità di contrarre infezioni microbiche di tipo enterico (13)

MICROORGANISMI	PROBABILITÀ DI INFEZIONE PER ESPOSIZIONE AD UN ORGANISMO
<i>Salmonella spp</i>	$2,3 \times 10^{-3}$
<i>Shigella spp</i>	1×10^{-3}
<i>Vibrio cholerae</i>	7×10^{-6}
Poliovirus 1	$1,49 \times 10^{-2}$
Echovirus 12	$1,7 \times 10^{-2}$
Rotavirus	$3,1 \times 10^{-1}$
<i>Giardia lamblia</i>	$1,98 \times 10^{-2}$

resistenti dei protozoi ai trattamenti di disinfezione, compresa la clorazione. In relazione ai diversi microrganismi è stato calcolato il rischio di contrarre infezione e dai dati mostrati nella Tabella 6 si evidenzia come i rischi maggiori siano connessi a microrganismi di tipo virale e protozoario (13).

Lo smaltimento dei liquami

Gli effluenti e fanghi dovrebbero essere smaltiti in armonia a politiche di recupero e senza interferenza con gli equilibri ambientali e la salute umana.

Qui di seguito verranno trattati i temi connessi allo smaltimento dei liquami per immissione in corpi idrici superficiali e per applicazione sui suoli e/o riutilizzo in agricoltura.

Lo sversamento in corpi idrici recettori

Ogni risorsa idrica va salvaguardata e ciò sulla base del generale principio di equilibrio ecologico. Tra gli obiettivi della Comunità Europea vi è quello di garantire la qualità e quantità delle risorse idriche in modo che sia tutelato e mantenuto lo stato ecologico più prossimo possibile a quello naturale.

Una corretta politica di salvaguardia del patrimonio idrico prevede il raggiungimento di un buono stato delle acque superficiali e sotterranee e di standard di qualità per

ambienti idrici, come quelli destinati alla produzione di acqua potabile, per i quali deve essere garantita un speciale protezione.

Acque di scadente qualità igienica come i liquami trattati e non trattati rappresentano un elemento perturbatore per l'ambiente, potendo contaminare corpi idrici superficiali e sotterranei; che, in funzione dei diversi utilizzi, possono costituire fonte di rischio per la salute pubblica in relazione al livello ed al tipo di microrganismi presenti.

Una volta che gli effluenti sono sversati in mari, laghi, fiumi, ecc il numero dei microrganismi presenti si riduce per gli effetti di diluizione più o meno marcati e per l'azione di "fattori inattivanti", come temperatura, irradiazione solare, ecc. Per le acque marine gli effetti di diluizione sono generalmente consistenti, anche se dipendenti dalla natura delle coste, dalla presenza di correnti, ecc. Inoltre i microrganismi subiscono l'effetto antagonista di fattori inattivanti come salinità, temperatura, irradiazione solare, sostanze tossiche, tra cui i metalli pesanti, ecc. Nonostante questi effetti, le acque costiere risultano generalmente contaminate se oggetto di sversamenti consistenti e talvolta i livelli di contaminazione microbica risultano talmente elevati che il loro utilizzo a fini ricreazionali (balneazione) è interdetto. Lo sversamento di liquami in specchi d'acqua come i laghi può determinare situazioni di contaminazione ancora più gravi, non verificandosi per questi corpi idrici un effetto di diluizione così marcato come quello che si verifica nelle acque di mare. Anche sulle acque correnti (fiumi, canali) l'impatto prodotto da acque contaminate può avere conseguenze identificabili con vistosi peggioramenti della loro qualità igienica. In Italia la percentuale maggiore di risorse idriche utilizzate a fini potabili è di origine sotterranea. Ma il costante aumento della domanda di acqua per la popolazione deve indurre a preservare tutte le nostre risorse idriche, anche quelle superficiali. Si pensi al problema emergente, negli Stati Uniti d'America di giardiasi e criptosporidiosi, derivanti dall'utilizzo di acque potabili di derivazione superficiale.

Studi realizzati nell'ambito del progetto PR28/IS (Attuazione del Programma Triennale per la Tutela dell'Ambiente 1994-1996-Azioni Nazionali in Materia di Ricerca Ambientale. Legge 305/89, Art. 11. Attuazione del programma PR.28/IS) e mirati, tra l'altro, all'accertamento degli effetti prodotti da scarichi fognari trattati su corpi idrici recettori di diverso tipo hanno messo in luce che lo sversamento di effluenti di impianti di depurazione di liquami domestici su corpi idrici riceventi è causa dell'incremento della diffusione di virus enterici, come Reovirus, e di batteri patogeni, come Salmonelle. Le conseguenze possono essere diverse in dipendenza della qualità dell'effluente e della natura dei corpi idrici. Si è rilevato, infatti, che su corsi d'acqua come fiumi e canali si verificano i) modificazioni negative della qualità igienica delle acque o ii) persistenza di condizioni negative preesistenti. Su acque di mare è stato evidenziato come lo sversamento di effluenti produca modificazioni della qualità igienica più contenute rispetto a quanto avviene per acque correnti, in dipendenza degli effetti sopracitati.

La contaminazione di corpi idrici superficiali può riflettersi sul comparto idrico sotterraneo (14). Il suolo funziona da filtro per sostanze e microrganismi inquinanti, ma acque sotterranee possono essere soggette a contaminazioni anche massicce sia a livello di acquifero che alla captazione quando non si attuano misure di protezione adeguate.

Se le acque superficiali per essere destinate alla produzione di acqua potabile devono subire trattamenti di depurazione più o meno spinti in funzione delle diverse categorie nelle quali sono classificate (15), le acque sotterranee, per la opinione diffusa che siano naturalmente protette, sono generalmente immesse in rete senza preventivi trattamenti, se non quelli che prevedono una disinfezione. Gli interventi di clorazione non sono, comunque, sempre efficaci su microrganismi resistenti come i virus enterici ed i protozoi patogeni, che generalmente non vengono ricercati.

Smaltimento dei liquami sul suolo

Lo smaltimento dei liquami sui suoli si attua oltre che per sottoporre ad ulteriori trattamenti i liquami, anche per la ricarica di acque sotterranee e per l'apporto di nutrienti ai suoli. L'applicazione al suolo dei liquami induce la rimozione biologica e chimica degli inquinanti per effetto di processi fisici, come la sedimentazione e la filtrazione, chimici, come l'adsorbimento e la precipitazione e biologici, come le trasformazioni microbiche e il decadimento biologico. Patogeni microbici e parassiti, BOD, solidi sospesi e nutrienti, come l'azoto, subiscono rimozione per sedimentazione e filtrazione, altri nutrienti come il fosforo sono rimossi per adsorbimento alle particelle del suolo, precipitazione chimica e trasformazione vegetale. Su altri contaminanti come i metalli tossici ed i composti organici in tracce è esplicata l'azione microbica ad opera del biofilm formatosi sulle particelle del suolo.

I sistemi di smaltimento dei liquami sui suoli sono essenzialmente di tre tipi: irrigazione a tasso lento, per flusso superficiale e per infiltrazione rapida.

La irrigazione a tasso lento, che si applica su terreni argillosi-sabbiosi mediante una distribuzione a spruzzo o superficiale, ha un elevato potenziale di trattamento del liquame producendo una rimozione del 99% del BOD, di solidi sospesi e di coliformi.

Nel sistema per flusso superficiale, che si applica su suoli argillosi con bassa permeabilità e con pendii dal 2 all'8%, il liquame scorre in un canale di raccolta ed i nutrienti (azoto, fosforo e BOD), i solidi sospesi ed i patogeni sono rimossi per effetto di questo flusso. La percentuale di rimozione di BOD e solidi sospesi è del 95-99%. La rimozione dell'azoto durante il flusso superficiale è dovuta a processi di nitrificazione, di denitrificazione e assorbimento vegetale. Il fosforo è rimosso per adsorbimento e precipitazione.

Con i sistemi di infiltrazione rapida, che consistono in applicazioni intermittenti dei liquami ad elevati tassi di carico su suoli permeabili (sabbia o argilla sabbiosa), la maggior parte dei liquami fluisce su acquiferi sotterranei. I liquami così trattati possono essere convogliati in pozzi di raccolta. Con questi sistemi la rimozione di azoto è, però, piuttosto bassa.

La applicazione di liquami al suolo, qualsiasi sia il sistema utilizzato, può indurre contaminazione delle acque sotterranee, del suolo e dei vegetali che si possono arricchire di microrganismi patogeni, metalli pesanti, nitrati composti organici tossici e carcinogenici (2).

Una volta che i liquami sono applicati ai terreni i microrganismi possono adsorbirsi alle particelle del suolo e, di conseguenza, possono acquisire caratteristiche di persistenza. Intervengono anche fenomeni di trasporto influenzati da diverse variabili come le piogge, la presenza di acidi umici, fulvici, ecc, in conseguenza dei quali si realizzano contaminazioni di acque sotterranee.

I batteri sono biocolloidi caricati che si legano alle particelle che compongono il suolo in funzione diretta alla presenza di cationi e di minerali di argilla (che forniscono i siti di adsorbimento), e in funzione inversa alle concentrazioni di sostanze organiche solubili e valori di pH (16). Anche per i virus si instaurano legami con le particelle del suolo di tipo elettrostatico-idrofobico (17). L'adsorbimento dei virus al suolo è influenzato dalla tessitura del suolo, tendendo ad essere adsorbiti da terreni di tipo argilloso e da quelli caratterizzati da presenza di minerali come ematite e magnetite, meno da suoli sabbiosi e rocciosi (18). L'adsorbimento varia in funzione delle specie virali; è, ad esempio, elevato per Poliovirus 1, e scarso per Echovirus 1 e 11 (19).

La persistenza dei microrganismi nei suoli è influenzata da fattori come temperatura, umidità, luce solare, pH, sostanze organiche, microflora antagonista rappresentata da batteri autoctoni e da protozoi predatori (16, 20). Basse temperature, terreni ad elevata capacità di trattenere l'acqua, bassa insolazione solare sono fattori favorenti la persistenza batterica e virale nei suoli; mentre valori bassi di pH ed elevate quantità di cationi favoriscono la persistenza in modo indiretto poiché agiscono sull'adsorbimento di batteri e di virus alle particelle del suolo. L'umidità influisce molto sulla persistenza batterica, come l'irradiazione solare e la temperatura influenzano la persistenza virale. È stato verificato come coliformi diminuiscano in suoli mescolati con fanghi mano a mano che questi si disseccano (20). Virus nei fanghi applicati ai suoli mostrano vitalità fino a 23 settimane durante la stagione invernale in Olanda e, invece, solo 2-4 settimane in estate o autunno in Florida (1). Poliovirus persiste in suoli argillosi per 180 giorni a 4°C, mentre a 37°C dopo 12 giorni risulta inattivato (21).

La persistenza è anche in funzione di specie virali diverse: Epatite A ha elevati tassi di persistenza nei suoli a differenza di altri virus enterici (1, 22).

I microrganismi possono migrare nei suoli in funzione dei tassi di adsorbimento e di sopravvivenza. I meccanismi di trasporto attraverso il suolo sono legati al tipo di suolo, al sierotipo del virus, alla forza ionica della soluzione del suolo, alla presenza di composti solubili organici dei liquami, al tasso del flusso idraulico. I virus si adsorbono poco in suoli in presenza di soluzioni a bassa forza ionica e per questo motivo, le piogge tendono a deadsorbire i virus legati alle particelle di suolo e ridistribuirle nell'ambito del profilo del suolo (23). Una volta inibito l'adsorbimento, il trasporto dei virus è promosso attraverso il suolo dalle sostanze organiche solubili, che provengono dai liquami smaltiti e degli acidi umici e fulvici, che si trovano nei suoli (1, 24). I virus possono risultare presenti nel suolo a diverse profondità, da pochi metri fino a decine di metri dal sito sul quale sono applicati i liquami. Virus del gruppo degli Enterovirus sono stati, ad esempio, rilevati fino a 27 metri di profondità dopo l'applicazione di effluenti secondari su terreni argillosi (25).

Anche il trasporto batterico attraverso i suoli è indotto da piogge (20). Esperimenti di laboratorio condotti con misture di fanghi e suoli cui erano adsorbiti batteri indicatori

hanno mostrato, però, che solo forti piogge (12,3 cm/giorno) inducono il trasporto di batteri attraverso il suolo. Piogge meno consistenti non producono migrazione significativa di cellule batteriche. In condizioni ambientali i batteri sono ritenuti in modo efficiente dal suolo e sono rilevabili solo in piccole quantità nelle acque sotterranee (23).

I virus presenti nei fanghi applicati al terreno non sono trasportati facilmente attraverso il suolo e quindi agli acquiferi, risultando intrappolati tra i fanghi e la superficie del suolo e ciò è stato confermato anche per i batteri (26, 27).

Il riutilizzo agricolo dei liquami

Una alternativa di smaltimento dei liquami è rappresentata dal riutilizzo di questa matrice su terreni destinati ad uso agricolo, secondo criteri e modalità mirati alla prevenzione di pericoli potenziali per la salute e per l'ambiente. La bonifica dei reflui ed il loro riciclo e riutilizzo sono componenti integrali della gestione della risorsa idrica. Il catalizzatore, che ha reso elevato l'interesse verso il trattamento, il riciclo ed il riutilizzo di questa matrice è la necessità di avere risorse idriche alternative per soddisfare la sempre maggiore domanda di acqua per usi agricoli-industriali e per usi potabili. I benefici generali che ne derivano riguardano la tutela e la conservazione di risorse idriche di più elevata qualità, la protezione ambientale e si traducono in vantaggi economici.

Il riutilizzo agricolo dei liquami è una pratica applicata da centinaia di anni nel mondo. Un riuso pianificato di questa risorsa è documentato per l'Europa già nel 16° secolo, mentre negli Stati Uniti, dove attualmente meno dell'1% dei liquami prodotti è destinato al riutilizzo agricolo, questa pratica ha cominciato ad essere applicata agli inizi del 900 (in California ed Arizona) per l'irrigazione di giardini e prati e per trattamenti di raffreddamento. In altri paesi come l'India, Israele, Sud Africa questa percentuale risulta più elevata: 20-25%. Quest'uso è praticato anche in Nord Africa (Marocco, Tunisia, Libia), nel Medio Oriente (Giordania, Egitto, Arabia Saudita), America Latina (Cile, Perù, Messico) ed Asia (India e Cina) (28). Relativamente all'Italia purtroppo non sono disponibili molti dati relativi al riutilizzo dei liquami di origine domestica.

Il riutilizzo dei liquami in agricoltura, pur aumentando la disponibilità di acqua e di nutrienti per le colture, può avere effetti negativi per problemi di tossicità indotta sulle piante per eccesso di salinità o di ioni tossici come sodio, boro, cloro, cadmio, ecc. La presenza di metalli pesanti, pesticidi, composti clorati ed altri composti xenobiotici, con potere mutageno e cancerogeno, può avere conseguenze sulla salute. Problemi legati alla tossicità dei metalli pesanti possono porsi nel caso in cui essi si accumulino nelle piante. Il cadmio ad esempio, pur essendo presente in quantità non tossiche per le piante può accumularvisi e quindi costituire problemi per gli animali e l'uomo cui i vegetali sono destinati. Animali che pascolano su suoli su cui sono stati applicati liquami, possono assimilare ed accumulare metalli pesanti. È stato, ad esempio, verificato come metalli pesanti possono essere presenti nel latte prodotto da mucche che si sono nutrite di foraggio che li conteneva.

La quantità di sostanze chimiche presenti nei liquami di origine domestica è sempre generalmente piuttosto contenuta ed al di sotto dei livelli di tossicità. La mescolanza di reflui urbani e reflui industriali può comportare, invece, la presenza nei liquami di sostanze organiche e metalli pesanti in concentrazioni tali da sollevare problemi di tossicità per la salute umana. Per questo motivo reflui industriali, se devono essere mescolati a quelli urbani, devono subire trattamenti preventivi di depurazione.

L'utilizzo di liquami in campo agricolo può avere conseguenze sulla salute della popolazione anche per effetti dovuti alla presenza di batteri, virus e parassiti. Il rischio sanitario dipende da vari fattori come l'efficienza di rimozione o di inattivazione nelle acque trattate, la sopravvivenza dei microrganismi nel suolo o sulle piante, il grado di infettività dei patogeni. Tali indicazioni, che emergono dalla letteratura scientifica sull'argomento, debbono essere confermate per ogni realtà territoriale, che è influenzata dalla circolazione del patogeno al suo proprio interno.

Le modalità di infezione dovute agli agenti biologici sono diverse e possono avvenire per contatto diretto con i suoli contaminati, per ingestione di acque contaminate, per esposizione a lungo termine ad aerosols biologici (che si formano presso i siti di irrigazione) e per consumo di vegetali contaminati.

La trasmissione di malattie infettive dovute a irrigazione con liquami trattati e non trattati è un fatto noto da più di cento anni. È per questo motivo che l'irrigazione di vegetali eduli con liquami è generalmente proibita o ammessa solo quando la qualità microbiologica delle acque trattate è simile a quella delle acque potabili.

È opinione generalizzata che il rischio sanitario è maggiore per verdure a foglie e consumate crude (lattughe, finocchi, etc), ma i recenti casi di epidemie connesse al consumo di mele e di lamponi e causate da *Cryptosporidium* (29) e *Cyclospora* (30) portano l'attenzione su altre specie eduli. La contaminazione dei vegetali può anche avvenire successivamente alla raccolta e per cause che dipendono dalle normali manipolazioni prima della vendita (imballaggi, etc). È stato verificato che epidemie da Epatite A virus e da *Cryptosporidium* erano imputabili a vegetali probabilmente contaminatisi durante la coltivazione (31). Sono riportati casi di epidemie da Epatite A virus e da *Cyclospora* indotte dal consumo di vegetali importati (32, 33, 34). È difficile, comunque, risalire alla origine e provare inconfutabilmente la causa della contaminazione, poiché quest'ultima può avvenire secondo distribuzioni random e su aree geografiche molto estese.

Epidemie di colera o di infezioni parassitarie sono risultate associate con l'irrigazione di vegetali con liquami. È stata verificata, nel corso di indagini condotte in Israele, una chiara correlazione tra l'incremento della percentuale di campioni di feci positive per presenza di uova di *Ascaris* ed il consumo di vegetali irrigati con liquami. Il 35% dei campioni di feci mostrava presenza di *Ascaris* nel periodo del riutilizzo dei liquami. Questo valore si abbassava fino all'1% dopo il divieto di utilizzare i liquami (34). Consistenti epidemie di colera per consumo di vegetali contaminati da liquami sono state registrate in Perù (35). In Europa è stata evidenziata la diffusione di elmintiasi per irrigazioni di giardini con liquami (36). Ascariasi in popolazioni dedite all'agricoltura è stata messa in relazione in Italia con smaltimento di liquami e riuso

agricolo. Casi di elmintiasi sono state rilevate in Italia a seguito dell'uso di prodotti ortofrutticoli contaminati da liquami (36).

Epidemie di origine virale derivate dal consumo di verdure fresche sono state associate a virus dell'Epatite A ed E, a Rotavirus, a Norwalk virus, Small Round virus ed Echovirus. La causa di queste epidemie è stata dimostrata essere conseguente alla manipolazione dei vegetali, e ciò dimostra che questi prodotti sono potenzialmente in grado di veicolare microrganismi patogeni (1).

Epidemie di origine batterica sono riportate per *Escherichia coli* enterotossica e *Campilobacter* in associazione al consumo di frutta e verdura (1). Cisti di protozoi ed uova di elminti possono sopravvivere abbastanza a lungo sulle piante da poter indurre infezioni. Le uova di elminti sulle piante sono inattivate più rapidamente che non quando si trovano nel suolo, in cui possono sopravvivere per mesi. Uova di *Ascaris*, che tra gli elminti sono quelle ad avere le caratteristiche di maggiore persistenza, rimangono vitali su pomodori e lattughe per 27-35 giorni (30).

I liquami trattati e non trattati utilizzati per l'irrigazione di vegetali contaminano anche il terreno di crescita dei vegetali stessi. È noto che i microrganismi patogeni hanno caratteristiche di sopravvivenza maggiore nella terra che non sulla superficie dei vegetali. Uova di elminti, specialmente *Ascaris*, possono persistere nei suoli per anni (1). È facile che le verdure si contaminino durante la raccolta con la terra nella quale sono coltivate, questo è un motivo in più per considerare con attenzione l'utilizzo di acque contaminate in campo agricolo. L'irrigazione di suoli su cui sono coltivate verdure deve essere bloccata per alcune settimane prima della raccolta per permettere la inattivazione della maggior parte dei patogeni potenziali e parassiti. L'irrigazione di vegetali che sono consumati crudi dovrebbe essere soggetta ad opportune limitazioni. Animali che pascolano nutrendosi di erba contaminata possono essere il veicolo di malattie di tipo enterico indotte da *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropatogena e *Cryptosporidium* (35).

La sopravvivenza dei patogeni sulle piante, dipendente da diverse variabili è correlata in funzione inversa con temperatura e luce solare e in funzione diretta con la umidità. La sopravvivenza sui vegetali dipende anche dal tipo di patogeno e dal tipo di verdura. Microrganismi patogeni e parassiti possono sopravvivere sulle colture, specialmente se si tratta di vegetali a foglie larghe, per tempi variabili da giorni a mesi. La sopravvivenza è in funzione del periodo stagionale e, in genere, è più elevata durante l'autunno e meno elevata in estate (1).

I virus enterici, una volta contaminate le piante possono sopravvivervi per diversi giorni. Poliovirus resiste su foglie e radici di lattuga da 14 a 36 giorni dopo l'irrigazione, con abbattimenti del 99% nei primi 4-5 giorni (30).

Studi condotti in Messico hanno evidenziato come vegetali a foglie larghe (lattuga e spinaci) mostrino le contaminazioni batteriche più consistenti e che i lavaggi applicati a queste verdure non riducono consistentemente i livelli di contaminazione. Sono risultati presenti in lattughe 10^4 CT (Coliformi Totali) /100g e 10^3 CF (Coliformi Fecali)/100 g e in spinaci 10^3 CT e CF/100g (33).

Su vegetali sono riportati tempi di sopravvivenza per Enterovirus fino a 15-60 giorni, per Salmonella fino a 15-30 giorni, per uova di *Ascaris lumbricoides* fino a 30-60 giorni, per cisti di *Entamoeba histolytica* fino a 2-10 giorni (34).

Il riutilizzo delle acque reflue in alcuni paesi è regolato da limiti restrittivi e prescrizioni di trattamento definiti a seconda anche del tipo di colture da irrigare. Nella Tabella 7 sono riportati i limiti previsti da alcuni paesi per l'utilizzo in agricoltura di acque reflue trattate (37, 38, 39).

La legislazione italiana in materia risale al 1977 (37) e prescrive che per colture agricole possano essere utilizzate acque reflue urbane solo dopo trattamento primario, trattamento secondario o equivalente, eventualmente filtrazione o altri metodi spinti, ed infine disinfezione in modo da ottenere cariche di colibatteri $<2/100$ mL (limite per utilizzo in caso di irrigazione di verdure da consumare crude) e $<20/100$ mL (limite per utilizzo in caso di irrigazione di verdure da consumare dopo trattamenti).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità prevede limiti e trattamenti da applicare ai reflui per il riutilizzo agricolo. Nella Tabella 8 sono riportate alcune delle prescrizioni (34). È previsto che i limiti possano essere modificati a seconda dei fattori epidemiologici, socioculturali ed ambientali, che sono variabili per località geografica. Sono, inoltre, previsti limiti più restrittivi per coliformi fecali ($<200/100$ mL) nel caso in cui i reflui trattati siano utilizzati per parchi pubblici, che si prevede debbano essere a contatto diretto con la popolazione. I trattamenti cui devono essere sottoposti i liquami della categoria "A" devono consistere in stabilizzazione in vasche in serie o in trattamenti equivalenti fino al raggiungimento dei limiti previsti. Per la categoria "C" deve essere attuato almeno un trattamento di sedimentazione primaria (34).

Tabella 7. Parametri microbiologici e limiti previsti per l'uso di liquami in agricoltura in alcuni paesi (37, 38, 39)

PAESE	PARAMETRO E LIMITI
USA (California)	CF: 2,2 /100 mL
USA (Arizona)	Virus enterici: 1 PFU/40L (vegetali crudi) Giardia: Assente/40L
USA (Florida)	CF: 0/100 mL
Italia	CF: $<2/100$ mL (vegetali crudi) e $<20/100$ mL
Giordania	CF: $<1000/100$ mL Elminti: $<1/ L$
Tunisia	Elminti: $<1/ L$
Francia	CF: 100/100 mL

CT= Coliformi Totali
CF= Coliformi Fecali

Tabella 8. Riutilizzo di liquami in agricoltura: parametri e limiti previsti da WHO

CATEGORIA	PRODOTTI VEGETALI ED AMBIENTI	COLIFORMI FECALI	NEMATODI
A	Vegetali crudi, campi sportivi e parchi pubblici	<1000/100 mL	<1/ L
B	Cereali e altri prodotti da trattare, pascoli	-	<1/ L
C	Come "B" ma senza esposizione umana	-	-

I parametri microbiologici ed i limiti per il riutilizzo di reflui fognari, in uno studio, sono stati selezionati e stabiliti sulla base di fattori diversi, in base ai quali, gruppi di microrganismi patogeni possono assumere rilevanza nella trasmissione di malattie infettive (39). Queste caratteristiche riguardano la persistenza dei patogeni nell'ambiente, il periodo di latenza della malattia, la dose minima infettante, lo stato di immunità dell'ospite, la presenza di modalità di infezione diverse da quelle previste per i liquami. Sono stati anche accuratamente valutati i risultati di studi epidemiologici condotti in Israele, India e Germania (39) dai quali si è dedotto che quando vengono utilizzati liquami non trattati per l'irrigazione di terreni destinati ad uso agricolo, nematodi intestinali e batteri costituiscono un rischio anche elevato. Per i protozoi non vi sono sufficienti dati epidemiologici che diano chiare indicazioni. Per i virus è stato calcolato un rischio più basso, a causa dell'immunità da essi indotta negli individui che si infettano in giovane età attraverso modalità di trasmissione nell'ambito domestico, quando le condizioni igieniche non sono ottimali.

Nell'ambito dei 4 gruppi di patogeni, batteri, virus, protozoi ed elminti, sono gli elminti a rappresentare il rischio più elevato, in considerazione sia degli studi epidemiologici che del fatto che presentano basse dosi minime infettanti (poche unità), elevata persistenza ambientale, elevati periodi di latenza al suolo, lunga persistenza ambientale, praticamente nessuna immunità dell'ospite e limitata possibilità di altre modalità di infezioni se non quella attraverso il suolo o l'utilizzo di materiale contaminato dal suolo (39).

Bibliografia

1. BITTON, G. Pathogens and parasites in domestic wastewater. In: "Wastewater Microbiology". Wiley-Liss, New York, 1994, p. 77-100.

2. BITTON, G. *Introduction to environmental virology*. Wiley and Sons, New York, 1980, p. 1-326.
3. VAN DER WENDL AND CHARACKLIS, W.G. Biofilms in potable water distribution systems. In: *"Drinking water microbiology"*. Gordon MacFeters, Springs Verlag, New York, 1990, p. 249-268.
4. VAN DER KOOIJ, D. Prevention of bacterial aftergrowth in drinking water distribution systems. *Water supply* 1988, 6(57): 13-18.
5. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Holth J.G. and Krieg N.R. (Eds). Williams and Wilkins. Baltimore/London, 1984.
6. GUNNERSON, C.G., SHUVAL, H.I., ARLOSOROFF, S. Health effects of wastewater irrigation and their control in developing countries. In: Proceedings of the Third Water Reuse Symposium. *Am. Water Works Ass.* 1984, Denver, Colorado.
7. FEACHEM, R.G., BRADLEY, D.J., GARELICK, H., MARA, D.D. *Sanitation and disease: health aspect of excreta and wastewater management*. Wiley, chichester, U.K., 1983.
8. KOTT, Y., BETZER, N. The fate of *Vibrio cholerae* (El Tor) in oxidation pond effluents. *Israel. J. Med. Sci.* 1972, 8, 1912.
9. SHOOP, D.S., MYERS, L.L., LE FEVER, J.B. Enumeration of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in municipal sewage. *Appl. Environm. Microbiol.* 1990, 56: 2243-2244.
10. AULICINO, F.A., MASTRANTONIO, A., ORSINI, P., MUSCILLO, M., LAROSA, G. Enteric viruses in a wastewater treatment plant in rome. *Water, air soil poll.* 1996, 91:327-334.
11. CASSON, L.W., SORBER, L.A., SKYKORA, P.D., CAVAGHAN, M.A., SHAPIRO and Jakubowski, W. Giardia in wastewater-Effect of treatment. *J. Wat. Poll. Contr. Fed.* 1990, 62: 670-675.
12. Direttiva 98/83/CE del consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. In: *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee. 5-12-98 L330*.
13. ROSE, J.B., GERBA, C.P. Use of risk assessment for development of microbial standards. *Wat.Sci.Techn.* 1991, 23: 29-34.
14. AULICINO, F.A., MAURO, L., BIONDI, L., MARRANZANO, M., URSINO, A., CARERE, M., MASTRANTONIO, A. Virus enterici ed altri microrganismi di origine fecale in acque influenzate da effluenti fognari. *Annali di Igiene* 1999, 11: 35-42.
15. D.L. 11 maggio 1999 n°152. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque eflue urbane. Supplemento Ordinario G.U.R.I n°124 del 29 maggio 1999.
16. GERBA, C.P., BITTON, G. Microbial pollution: their survival and transport pattern to groundwater. In: *Groundwater Pollution Microbiology*. G. Bitton and Gerba C.P. (Eds) Wiley, New York, 1984.
17. GERBA, C.P. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.* 1984, 30:133-168.

18. SOBSEY, M.D., DEAN, C.W. KNUCKLES, M.E., WAGNER, R.A. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl. Environm. Microbiol.* 1980, 40: 92-101.
19. JANSONS, J., EDMONDS, L.W., SPEIGHT, B., BUCENS, M.R. Survival of viruses in groundwater. *Water Res.* 1989, 23:301-306.
20. ZYMAN, J., SORBER, C.A. Influence of simulated rainfall on the treatment and survival of selected indicator organisms in sludge-amended soils. *J.Wat.Poll.Contr.Fed.* 1988, 60: 2105-2110.
21. YEAGER, J.G., O'BRIEN, T. Enterovirus inactivation in soil. *Appl. Environm. Microbiol.* 1979, 38: 694-698.
22. STRAUB, T.M., PEPPER, I.L., GERBA, C.P. Persistence of viruses in desert soils amended with anaerobically digested sludge. *Appl. Environm. Microbiol.* 1992, 58: 636-641.
23. ALHAJAR, B.J., STRAMER, S.L., CLIVER, D.O., HARKIN, J.M. Transport modelling of biological tracers from septic system. *Water Res.* 1988, 22: 907-915.
24. SCHEUERMAN, P.R., BITTON, G., OVERMAN, A.R., GIFFORD, G.E. Transport of viruses through organic soils and sediments. *J. Environm. Eng. Piv. Am. Soc. Civ. Eng.* 1979, 105: 629-640.
25. GOYAL, S.M., KESWICK, B.H., GERBA, C.P. Viruses in groundwater beneath sewage irrigated cropland. *Water Res.* 1984, 18: 299-302.
26. PANCORBO, O.C., BITTON, G., FARRAH, S.R., GIFFORD, G.E., OVERMAN, A.R. Poliovirus retention in soil columns after application of chemical and polyelectrolyte-conditioned denatured sludges. *Appl. Environm. Microbiol.* 1988, 54: 118-123.
27. BITTON, G., PANCORBO, O.C., FARRAH, S.R. Virus transport and survival after land application of sewage sludge. *Appl. Environm. Microbiol.* 1984, 47: 905-909.
28. BARTONE, C.R., ARLOSOROFF, S. Irrigation reuse of pond effluents in developing countries. *Wat.Sc.Techn.* 1987, 19(12): 289-297.
29. MILARD, P.S., GENSHERMIR, K.F., ADDISS, D.G., SORIN, D.M., BECKETT, G.A., HOUCK-JANKOSKI, A., HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple juice. *J. Amer. Med. Ass.* 1994, 272: 1592-1600.
30. YATES, M.V. Microbial considerations in wastewater reclamation and reuse. In: "*Wastewater reclamation and reuse*". Takashi Asano (Editor). Technomic Publishing Co.Inc. Lancaster-PA 17604 USA, 1988.
31. NIU, M.T., POLISH, L.B., ROBERTSON, B.H., KHANNA, B.K., WOODRUFF, B.A., SHAPIRO, C.N., MILLER, M.A., SMITH, J.D., KEDROSE, J.K., ALTER, M.J., MARGOLIS, H.S. Multistrata outbreak of Hepatitis A virus associated with frozen strawberries. *J. of Inf.Dis.* 1992, 166: 518-524.
32. ROSENBLUM, L.S., MIRKIN, I.R., ALLEN, D.T., SAFFORD, S., HADDLER, S.C. A multifocal outbreak of hepatitis A traced commercially distributed lettuce. *Am. J. Publ. Health* 1990, 80: 1975-1979.
33. ROSAS, I., BAEZ, A., COUNTINO, M. Bacteriological quality of crops irrigated with wastewater in the Xochimilao plots. Mexico City - Mexico - *Appl. Environm. Microbiol.* 1984, 47: 1074-1079.

34. WHO SCIENTIFIC GROUP. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. *WHO Technical Report Series 778* – Geneva, 1989.
35. SHUVAL, H.I. Investigation of cholera and typhoid fever transmission by raw wastewater irrigated in Santiago, Chile. International Water Pollut. Res. Conference Intern. Symp. Washington D.C. May 26-29 1992.
36. VOLTERRA, L., DI GIROLAMO, I. *Riutilizzo agricolo dei reflui di depurazione: aspetti igienico-sanitari*. 1990, Rapporto Istisan 90/1.
37. DPCM 4 febbraio 1977. All.5 comma 2.3.1. In: *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n°48 del 21 febbraio 1977*.
38. HESPANOL, I., PROST, A.M.E. WHO guidelines and national standards for reuse and water quality. *Water Res.* 1994, 28: 119-124.
39. HESPANOL, I. Guidelines and integrated measures for public health protection in agriculture reuse systems. *J. Wat. SRT-Aqua* 1990, 39: 237-249.

TECNICHE ANALITICHE PER IL RILEVAMENTO DI VIRUS ENTERICI NEI LIQUAMI E NEI FANGHI DI IMPIANTI DI DEPURAZIONE

Francesca Anna Aulicino, Mario Carere, Patrizia Orsini
Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità. Roma

Introduzione

La conoscenza della qualità virologica di liquami ed i fanghi può essere di estrema utilità, poiché queste matrici sono fonti di contaminazione primaria e rappresentative della circolazione dei virus nell'ambito della popolazione.

Il saggio virologico di campioni di liquami e fanghi necessita di procedure particolari a causa delle peculiari caratteristiche di tali matrici costituite da una componente solida, di natura organica e inorganica e da una liquida (1). Le particelle virali, quando sono presenti in questi campioni tendono ad aggregarsi e ad adsorbirsi alla componente solida. È dimostrato che in campioni idrici con pH prossimi alla neutralità ed in presenza di elevate concentrazioni di solidi sospesi, l'80% delle particelle virali presenti si adsorbe al particolato. Nel fenomeno dell'adsorbimento si sviluppano interazioni di natura elettrostatica e idrofobica per la presenza di gruppi ionizzabili del capsido virale, il cui comportamento è dipendente dal pH, dalla forza ionica del mezzo e dal tipo di particelle e di colloidali presenti (2, 3). In condizioni naturali sul capsido virale sono presenti cariche elettriche, prevalentemente negative, che interagiscono con cariche elettriche di segno opposto presenti sulla superficie del particolato (4). Le interazioni di natura idrofobica garantiscono stabilità all'adsorbimento, favorendolo dal punto di vista termodinamico. Infatti un minor numero di molecole di acqua viene a contatto con il capsido virale quando esso è adsorbito al particolato solido, diversamente da quanto avviene quando è libero nel mezzo liquido (5, 6).

L'adsorbimento ha effetti protettivi sui virus in relazione a fattori inattivanti, quali, ad esempio, i prodotti utilizzati per la disinfezione applicata nell'ambito di trattamenti di depurazione o potabilizzazione (7). Si verificano, infatti, scarsi abbattimenti dei virus, quando si attuano trattamenti depurativi in cui non vengono efficacemente abbattuti i solidi totali (8, 9).

Attualmente sono disponibili diversi metodi per il rilevamento di virus enterici in liquami e fanghi, ma vanno effettuate opportune valutazioni per la scelta del metodo più idoneo prendendo in considerazione sia gli aspetti connessi alla sua esecuzione, quali, la rapidità e le difficoltà dei saggi, la necessità di attrezzature e ambienti particolari, etc, sia gli aspetti relativi alla sua efficienza.

Nel corso di indagini effettuate su impianti di depurazione di liquami domestici sono stati selezionati metodi, qui di seguito riportati, che, parzialmente, modificano quelli di un precedente rapporto istisan (10-14).

Il rilevamento di virus enterici nei fanghi: metodo della eluizione/concentrazione

I saggi atti al rilevamento di virus enterici da fanghi di impianti di depurazione prevedono, come tappa obbligata, il deadsorbimento dei microrganismi dalla frazione solida organica ed inorganica e ciò rappresenta una fase critica, che se non attuata efficacemente, rende i risultati inattendibili per le basse percentuali di recupero di particelle virali.

Il distacco dei virus dalla matrice solida si può ottenere utilizzando soluzioni eluenti da aggiungere al campione da analizzare, dopo opportuni tempi di contatto. Un contatto ottimale tra l'eluente ed il particolato induce: i) il distacco delle particelle virali dalla matrice solida e ii) l'instaurarsi di nuovi legami tra le particelle virali ed i componenti del mezzo eluente.

Le soluzioni eluenti più comunemente utilizzate e che danno le più elevate percentuali di recupero sono di natura proteica. La funzione delle molecole proteiche, riconducibile alle loro piccole dimensioni, è quella di intercalarsi tra i virioni (di maggiori dimensioni) ed i siti di adsorbimento del particolato, riducendo le mutue forze preesistenti ed instaurando legami con le particelle virali (15).

Le più comuni soluzioni eluenti sono a base di estratto di carne a concentrazione dal 3 al 10% e ph da 5 a 9 (6, 16). Concentrazioni troppo elevate di estratto di carne, soprattutto se si applicano trattamenti successivi di riconcentrazione, possono indurre fenomeni di tossicità (17).

In Tabella 1 sono riportate le composizioni di alcune soluzioni eluenti comunemente utilizzate per la estrazione di virus da campioni di fanghi (6, 18, 19, 20, 26).

Tra i metodi disponibili per il rilevamento di virus enterici in campioni di fanghi, uno dei più semplici è quello che prevede trattamento di eluizione e concentrazione successiva dell'eluato. I fanghi, come i liquami, sono caratterizzati da elevate quantità di microrganismi e si rendono necessari trattamenti di decontaminazione spinti, che prevedono l'utilizzo di cloroformio e di antibiotici e fungicidi.

Tabella 1. Formulazione di alcune soluzioni eluenti a base di estratto di carne

SOLUZIONI	COMPONENTI
Soluzione eluente - pH 7 (18)	Estratto di carne (Lab-lemco powder): 10g, $\text{Na}_2\text{x7H}_2\text{O}$: 1,34g, acido citrico: 0,12g, acqua distillata: 100ml; pH finale 7
Soluzione eluente - pH 9 (26)	Estratto di carne (Lab-Lemco powder): 3g, acqua distillata: 100 ml; pH finale 9
Soluzione eluente - pH 5,5 (19)	Estratto di carne (Lab-Lemco powder): 3g, NaNO_3 : 2M, acqua distillata: 100 ml; pH finale 5,5
Soluzione eluente - pH 9 (6)	Estratto di carne (Lab-Lemco powder): 3g, glicina: 0,38g, acqua distillata: 100ml; pH finale 9

Nella Figura 1 è riportata la procedura completa, che prevede una fase di eluizione, diverse fasi di decontaminazione ed una fase di concentrazione.

Eluizione

90 mL di soluzione eluente a pH 7 (Tabella 1) sono aggiunti a 10 g di fango. La soluzione eluente può essere aggiunta al campione di fango anche in rapporti eluente:fango di 4:1 o di 1:1(18).

La miscela, opportunamente omogeneizzata, è posta in agitazione magnetica per 30' a temperatura ambiente e successivamente sottoposta a centrifugazione per 30' a 3.000 rpm a 4°C. Il sovrnatante, che è l'eluato contenente eventuali particelle virali (eluato 1°), viene recuperato ed il sedimento è eliminato.

Nel caso di persistenza di materiale solido in sospensione, il sovrnatante può essere sottoposto ad ulteriore centrifugazione seguendo le procedure sopra riportate.

Decontaminazione 1

Si aggiunge cloroformio all'eluato 1° in quantità pari al 30% del volume di quest'ultimo.

Si procede ad agitazione per 30', a successiva centrifugazione per 30' a 4.000-6.000 rpm a 4°C e si recupera il sovrnatante (eluato 1° decontaminato).

Concentrazione dell'eluato per ultracentrifugazione

L'eluato I° decontaminato è centrifugato per 2 ore a 32.000 rpm a 4°C. Si elimina il sovrnatante e si risospende il pellet in 6-7 mL di Minimum Essential Medium (MEM Eagle con sali di Earle) privo di siero di vitello fetale (eluato 2°).

Decontaminazione 2

L'eluato concentrato (eluato 2°) è sottoposto ad ulteriore decontaminazione per aggiunta di una miscela di antibiotici in ragione di 1 ml di miscela /10 ml di eluato (21, 22). È necessario lasciare agire gli antibiotici almeno una notte a 4°C oppure 2 ore a 37°C.

Si riporta, qui di seguito la composizione della miscela di antibiotici e fungicida: 0,5g kanamicina; 6g streptomicina; 5×10^6 u.i. penicillina; 1,6ml nistatina; 50 ml di acqua tridistillata (22). La miscela deve essere sottoposta a filtrazione attraverso membrane di 0,22 μ m di porosità).

Decontaminazione 3

Si aggiunge cloroformio all'eluato 1° in quantità pari al 10% del volume di quest'ultimo, seguendo la stessa procedura sopra riportata.

Il sovrnatante recuperato (eluato 2° decontaminato) deve essere mantenuto in agitazione sotto cappa a flusso laminare per 4-5 ore, per la eliminazione di eventuali residui di cloroformio. L'eluato così ottenuto può essere inoculato su colture di cellule.

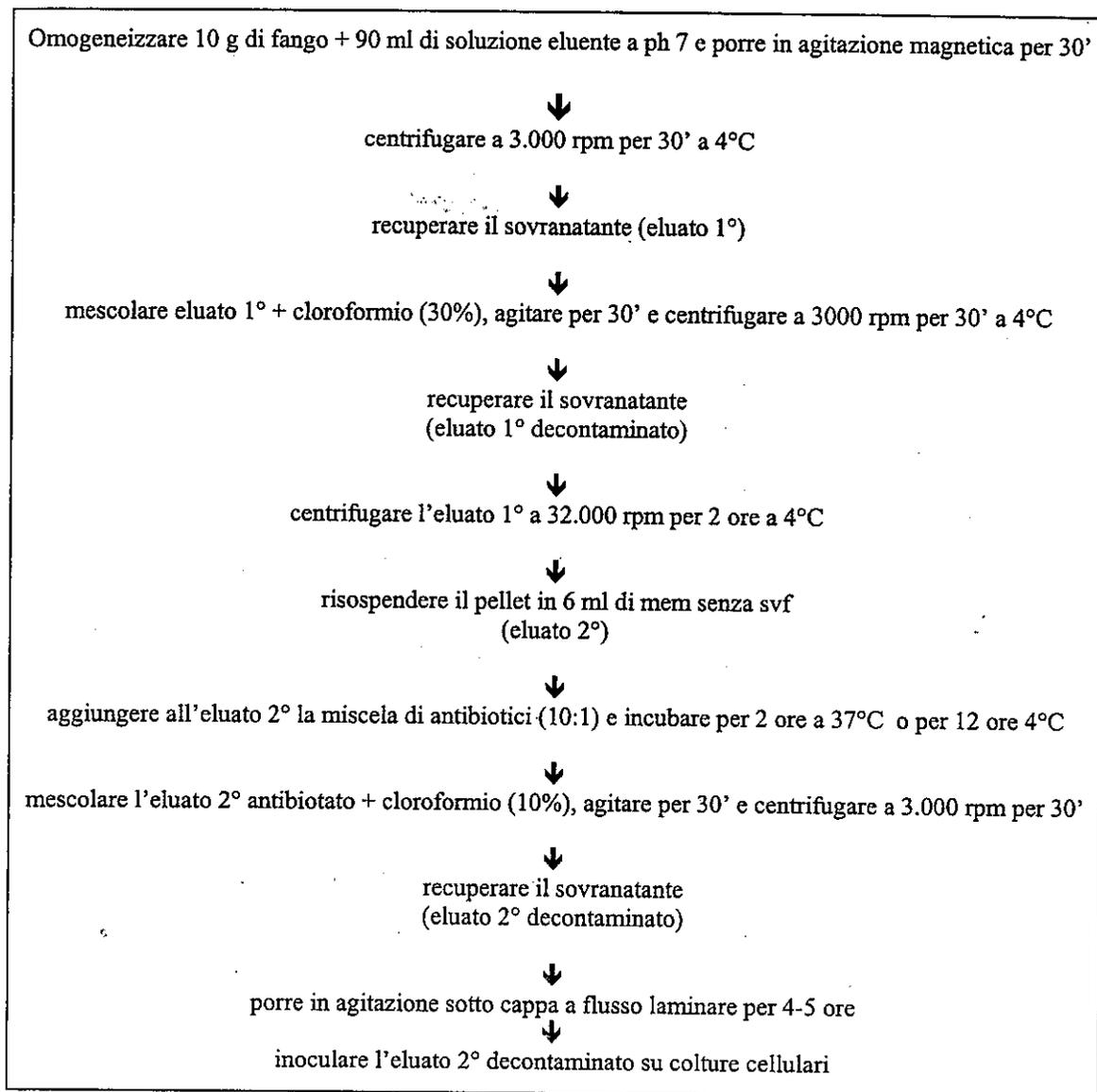


Figura 1. Metodo di estrazione virus da fanghi: ELUIZIONE

Il rilevamento di virus enterici nei liquami: metodo dell'adsorbimento/eluizione e concentrazione

Le metodologie analitiche per il rilevamento dei virus enterici nei liquami prevedono processi di concentrazione, essendo queste matrici costituite prevalentemente da componente acquosa.

La tecnica dell'adsorbimento-eluzione su membrane cariche è quella di uso più comune e si attua operando la filtrazione del campione attraverso membrane idonee, sulle quali si opera, successivamente, procedimento di eluzione utilizzando opportune soluzioni eluenti (13).

Possono essere utilizzate membrane cariche positivamente o negativamente. L'utilizzo di queste ultime prevede un trattamento dei campioni prima della filtrazione, perché deve essere assicurata la presenza di ioni Al^{+++} e Mg^{++} e perché il pH deve avere il valore di 3,5; ciò al fine di permettere l'adsorbimento ottimale delle particelle virali alle membrane (23, 24, 25). L'utilizzo delle membrane elettropositive non necessita di preventivi trattamenti del campione, il cui valore di pH, però, deve risultare prossimo alla neutralità affinché si verifichi efficacemente l'adsorbimento delle particelle virali alle cariche positive delle membrane.

Nella Figura 2 è riportato il metodo che prevede l'utilizzo di membrane elettropositive (13, 26).

Prefiltrazione di campioni torbidi

Campioni molto torbidi debbono essere sottoposti a processi di prefiltrazione per evitare l'occlusione delle membrane e la saturazione delle cariche elettriche per effetto del materiale organico presente.

Per la prefiltrazione si utilizzano membrane in polipropilene di 10μ di porosità e di 142 o 47 mm di diametro rispettivamente per quantità di liquame superiori ad 1L o inferiori ad 1L.

Le membrane devono essere sottoposte a processo di eluizione per il recupero di eventuali particelle virali rimaste aderenti. L'eluizione si effettua ponendo i filtri tagliuzzati in 50-60 mL di una soluzione eluente a pH 9 (Tabella 1), lasciandole in

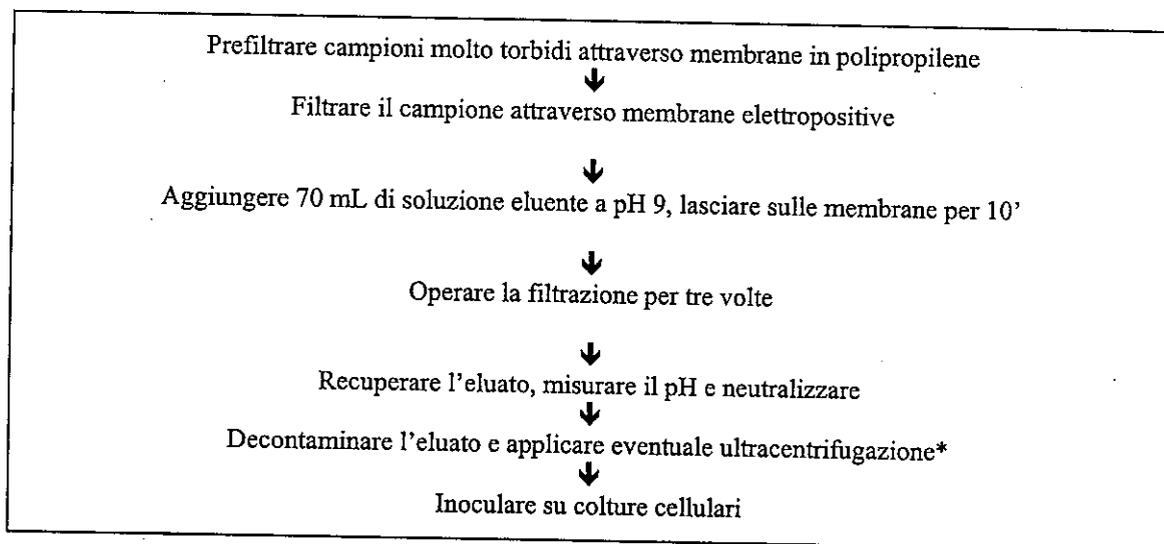


Figura 2. Concentrazione di virus enterici da liquami mediante il sistema dell'adsorbimento / eluizione su membrane elettropositive

*Vedi Figura 1

agitazione per 30'. Il tutto si centrifuga a 3.000 rpm per 30' a 4°C ed il sovranatante, dopo neutralizzazione, si aggiunge al campione prefiltrato.

Adsorbimento. Si utilizzano membrane elettropositive (zetapor cuno division meriden usa, 64085/02/1mds) di 47 o 142 mm di diametro rispettivamente per quantità di liquami grezzi di 100 ml-1-2 l. Nel caso di liquami trattati possono essere utilizzate membrane di 47 mm per filtrare fino a 500 ml di campione e membrane di 142 mm per quantità fino a 5 l. Si utilizzano sempre due membrane per aumentare la superficie di adsorbimento.

Affinché si realizzi l'adsorbimento ottimale dei virus, il pH del campione deve essere intorno a 7,5 (mai superiore ad 8), per cui prima della filtrazione esso deve essere controllato e, nel caso, va modificato.

In fase di filtrazione il flusso del campione non deve superare il valore di 28 mL/min/cm² (26).

Eluizione. Sulle membrane si pone una soluzione eluente a pH 9 (Tabella 1) in quantità di 7-8 mL o di 70 mL, a seconda che si utilizzino membrane di 47 mm o di 142 mm. Si procede alla filtrazione, che deve essere condotta lentamente e ripetuta tre volte, avendo cura, alla fine di ognuno dei due primi cicli di filtrazione di controllare che il pH della soluzione eluente si mantenga sempre attorno al valore 9, nel caso modificandolo. Una volta operata la eluizione, si porta il valore del pH dell'eluato a 7 e si procede alla decontaminazione e alla concentrazione per ultracentrifugazione così come riportato per i fanghi (26).

Isolamento di virus su colture cellulari

Per evidenziare la presenza di particelle virali infettive sono utilizzate cellule BGM (Buffalo Green Monkey) coltivate in terreno liquido. L'utilizzo di colture di cellule in terreno liquido permette di rilevare anche virus a crescita lenta, che necessitano di tempi di incubazione lunghi, cioè superiori ai 7-8 giorni, che è il tempo massimo di incubazione quando si utilizzano monostrati cellulari in terreni agarizzati.

L'incubazione di monostrati di cellule BGM in terreno liquido può essere prolungata anche a 25-30 giorni, se idoneamente condotta.

Infezione dei tappeti cellulari (1° passaggio). L'infezione dei tappeti cellulari deve essere attuata eliminando, preliminarmente, il terreno di crescita (MEM contenente siero di vitello fetale al 10%) ed aggiungendo a ciascuna fiasca il campione da saggiare (eluato decontaminato). Nel caso di quantità esigue di campione si deve aggiungere terreno liquido MEM senza siero di vitello fetale in quantità idonea a ricoprire il tappeto cellulare. L'aggiunta di terreno MEM contenente siero di vitello fetale può pregiudicare i risultati, in quanto il siero di vitello fetale inibisce l'adsorbimento ottimale delle particelle virali alle cellule.

Si incuba a 37°C per circa 1 ora e 30'. Successivamente si sostituisce il campione con terreno di coltura MEM al 2% di SVF, in quantità di circa 7-8 mL per le fiasche da 25 cm², e di circa 20-25 mL per le fiasche da 75 cm².

Incubazione. Le fiasche sono poste in termostato a 37°C. I tappeti cellulari vanno osservati al microscopio dopo 2-3 ore, dopo 6-7 ore e dopo 24 ore dalla infezione per evidenziare anomalie derivanti da eventuali effetti tossici, che, generalmente si evidenziano dopo poche ore dall'inoculo del campione.

Periodicamente (ogni 6-7 giorni) occorre effettuare la sostituzione del terreno di coltura con terreno fresco. L'incubazione deve essere protratta almeno a 15 giorni con osservazioni al microscopio condotte ogni due tre giorni.

Una volta rilevata la distruzione dell'80-90% del monostrato cellulare, i monostrati devono essere congelati a -30°C. Tappeti cellulari rimasti integri al 15° giorno dall'inoculo vanno anch'essi congelati a -30°C.

Passaggi di conferma. Si devono effettuare passaggi successivi di conferma sia per le colture che hanno mostrato positività sia per quelle rimaste integre.

Ai passaggi di conferma si procede sottoponendo, preliminarmente, le fiasche contenenti i tappeti cellulari a 3 cicli di congelamento e scongelamento per ottenere la lisi cellulare. I lisati cellulari vanno decontaminati con cloroformio (10%) prima di effettuare i passaggi di conferma, per tutelarsi contro contaminazioni accidentali, che possono avvenire nell'ambito delle diverse fasi dei trattamenti.

Nel caso in cui i risultati di passaggi successivi siano contraddittori si deve procedere ad un 3° passaggio di conferma.

Identificazione. La identificazione dei ceppi isolati si effettua con pool di antisieri oppure applicando tecniche di biologia molecolare.

Si può effettuare anche una identificazione presuntiva dei virus isolati considerando il tempo intercorso tra l'infezione e la distruzione dei tappeti cellulari e osservando il tipo di effetto citopatico. Ad esempio, per gli enterovirus l'effetto citopatico al 1° passaggio compare generalmente entro 6-9 giorni dall'inoculo, per i reovirus entro 25-30 giorni.

Nel corso del 2° passaggio, gli enterovirus provocano la lisi cellulare già dopo 2-3 giorni (in alcuni casi, anche dopo 24 ore), i reovirus dopo 7-8 giorni. In presenza di enterovirus, generalmente, si osservano delle aree di lisi che tendono ad allargarsi in tempi piuttosto rapidi. Nel caso dei reovirus, il tappeto cellulare mostra anomalie diffuse uniformemente e la distruzione dell'intero tappeto cellulare richiede tempi più lunghi, rispetto a quanto succede per gli enterovirus.

Stima quantitativa

Per la stima quantitativa dei virus si applica la tecnica di enumerazione statistica del Most Probable Number (MPN).

Si possono effettuare inoculi seriali (3 o 5) di quantità scalari di campione (1 mL, 0,1 mL, 0,01 mL, ecc).

L'enumerazione può essere effettuata applicando la formula : $MPN/mL = P/\sqrt{NXQ}$
dove:

P= Numero totale delle colture positive

N= Quantità totale (in mL) del campione inoculato

Q= Quantità totale in mL di tutte le colture negative

Valutazione della efficienza del metodo dell'adsorbimento-eluzione su membrane elettropositive

Sono stati effettuati saggi di enumerazione su campioni di liquami e fanghi infettati sperimentalmente per valutare le percentuali di recupero ottenute applicando le metodiche descritte.

Liquami. Quantità di liquami grezzi pari ad 1 litro sono state sottoposte a preventivo trattamento di sterilizzazione in autoclave per 20' e successivamente addizionate di sospensioni di Poliovirus 1 (ATCC VR-192 e di Reovirus 2 (ATCC VR-231) in modo da ottenere un numero totale di particelle dell'ordine di 10^7 - 10^8 /L. I campioni sono stati posti in agitazione per una notte a 4°C per permettere ai virus di adsorbirsi ai solidi sospesi. Successivamente è stato applicato il metodo dell'adsorbimento-eluzione precedentemente descritto. L'eluato è stato sottoposto a processo di ultracentrifugazione per ridurre ulteriormente il volume. I virus presenti nell'eluato e nell'eluato ultracentrifugato sono stati evidenziati ed enumerati su cellule BGM coltivate in piastre a 96 pozzetti. Il titolo virale è stato calcolato applicando la formula di Reed e Muench ed espresso in TCID₅₀ (27).

Nella Tabella 2 sono riportate le percentuali di recupero ottenute dopo trattamento di eluizione e dopo trattamento di ultracentrifugazione dell'eluato (28).

Tabella 2. Percentuali di recupero di Poliovirus 1 (ATCC VR-192) e di Reovirus 2 (ATCC VR-231) in campioni di liquami grezzi infettati sperimentalmente sui quali è stato applicato trattamento di adsorbimento-eluzione e di ultracentrifugazione

CAMPIONI	% RECUPERO DI POLIOVIRUS		% RECUPERO DI REOVIRUS	
	Eluato	Eluato-ultracentrifugato	Eluato	Eluato-ultracentrifugato
1	54	53	20	21
2	72	69	35	30
3	67	65	56	58
4	60	62	50	45

Le prove effettuate per il calcolo dell'efficienza del metodo applicato hanno mostrato percentuali di recupero variabili dal 54 al 72% per virus Polio e dal 20 al 56% per reovirus. Il trattamento di ultracentrifugazione non influenza il recupero virale. Talvolta le percentuali di recupero relative all'eluato ultracentrifugato sono leggermente più elevate o più basse rispetto a quelle verificate sull'eluato. Ciò è, probabilmente, in conseguenza dello stato di aggregazione dei virus, che può variare in funzione dei trattamenti eseguiti sui campioni. In ogni caso, si tratta di variazioni insignificanti.

Fanghi. Quantità di 10 g di campioni di fanghi di impianti di depurazione di liquami domestici sono stati inoculati con una sospensione di Poliovirus 1 (ATCC 192VR) in modo da avere una concentrazione finale di 10^4 - 10^5 TCID₅₀. I campioni sono stati posti a 4-8°C per una notte in agitazione magnetica. Successivamente si è proceduto al saggio, così come descritto in precedenza. La enumerazione di Poliovirus è stata condotta su colture di cellule BGM seguendo il metodo di Reed and Muench method (27).

Il processo di ultracentrifugazione applicato sugli eluati non influenza in modo apprezzabile il recupero del Poliovirus, poiché nel campione ultracentrifugato è stato enumerato il 100% delle particelle virali presenti nell'eluato (12).

Le percentuali di recupero sono del 10-70 e 100%, quindi variano considerevolmente e ciò, probabilmente, in conseguenza della diversa percentuale del contenuto solido dei campioni (Tabella 3).

Rilevamento di virus enterici in campioni di liquami e di fanghi

Sono state realizzate indagini su campioni di liquami grezzi e trattati e di fanghi prelevati presso impianti di depurazione ed analizzati per la presenza di virus enterici applicando le tecniche descritte (12, 13). I risultati sono riportati nella Tabella 4. È stato verificato che la densità virale nei liquami grezzi varia da 1×10 a 1×10^4 MPNCU (Most Probable Number of Citophatogenic Units)/L. Dopo il trattamento primario e

Tabella 3. Percentuali di recupero di Poliovirus 1 (ATCC VR-192) in campioni di fanghi infettati sperimentalmente sui quali è stato applicato trattamento di eluizione e di ultracentrifugazione (12)

CAMPIONE	CONTENUTO IN SOLIDI	% DI RECUPERO
Fango aerobico	24%	10
Miscela di fanghi aerobici ed anaerobici	9%	100
Fango anaerobico	21%	70

Tabella 4. *Virus enterici isolati su cellule BGM da campioni di liquami grezzi e trattati (13)*

LIQUAME GREZZO	EFFLUENTE PRIMARIO	EFFLUENTE SECONDARIO
Virus MPN/L (min-max) $3 \times 10^1 - 1 \times 10^4$	Virus MPN/L (min-max) $2 \times 10^5 - 10^3$	Virus MPN/L (min-max) $3 \times 10^0 - 1 \times 10^2$

secondario i titoli virali sono risultati dell'ordine di $1 \times 10 - 1 \times 10^3/L$ e $1 \times 10^0 - 1 \times 10^2/L$.

I virus isolati sono stati sottoposti anche ad identificazione e sono risultati presenti Enterovirus e Reovirus.

La enumerazione e la identificazione delle particelle virali isolate ha consentito di mettere in evidenza che gli enterovirus risultano isolati con frequenza più bassa dei reovirus a tutte le fasi di trattamento dei liquami e che i rapporti tra i due gruppi di virus identificati variano nell'ambito delle varie fasi di trattamento. In particolare si è evidenziato che gli enterovirus subiscono abbattimenti maggiori rispetto a quelli cui vanno incontro i reovirus. Nei liquami prelevati all'ingresso dell'impianto ed in quelli delle fasi successive, infatti, i reovirus sono presenti nel 100% dei campioni positivi per virus, mentre gli enterovirus costituiscono l'83% dei campioni positivi di liquami grezzi, il 75% di quelli dell'effluente primario e il 27% di quelli dell'effluente secondario (Tabella 5).

È possibile che la diversa efficienza di rimozione dei due gruppi di virus sia legata, in particolare, ai trattamenti di sedimentazione, che sono meno efficaci nella rimozione dei reovirus, che, probabilmente hanno caratteristiche di adsorbimento ai solidi sedimentabili minori di quelle degli enterovirus (13).

La Tabella 6 riporta i numeri di virus rilevati in 25 campioni di fanghi provenienti da impianti di trattamento-di tipo aerobico ed anaerobico (13).

Tabella 5. *Percentuali di campioni positivi per enterovirus e reovirus (13)*

	ENTEROVIRUS	REOVIRUS
CAMPIONE	% campioni positivi	% campioni positivi
Liquame grezzo	83 (10/12)*	100 (12/12)
Effluente primario	75 (6/8)	100 (8/8)
Effluente secondario	27 (3/11)	100 (11/11)

* Nelle parentesi sono riportati i numeri dei campioni in cui sono risultati presenti Enterovirus e Reovirus sul totale dei campioni positivi.

Tabella 6. *Virus enterici (valori minimi e massimi) enumerati in fanghi di impianti di depurazione di liquami domestici*

CAMPIONE	% DI SOLIDI TOTALI (ST) (MIN-MAX)	VIRUS ENTERICI (MPNCU/g ST) (MIN-MAX)	SPECIE VIRALI ISOLATE
Fanghi aerobici	9-24	0,6-123 (6/13)*	Poliovirus, Coxsackievirus, Reovirus
Fanghi anaerobici	7-27	0,8-16 (9/11)	Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus, Reovirus
Fanghi misti	9	12,7 (1/1)	Poliovirus, Coxsackievirus

MPNCU/g ST =Unità citopatogeniche, calcolate applicando il sistema del Most Probable Number, per grammo di sostanza secca

*Nelle parentesi sono riportati i numeri dei campioni positivi sul totale degli analizzati

In 16 di questi campioni (64%) è stata accertata presenza di virus enterici, rilevati in quantità variabili da 0,6 a 123 particelle infettive/g di sostanza secca.

I fanghi aerobici hanno una frequenza di contaminazione virale più bassa dei fanghi anaerobici: i virus enterici sono presenti in 6 campioni su 13 di fanghi anaerobici (82%) e in 9 su 11 di fanghi aerobici (46%) (Tabella 6). Ciò confermerebbe che il trattamento aerobico cui sono sottoposti i fanghi è più efficiente nella rimozione virale del trattamento anaerobico, come è stato verificato da altri autori (29, 30).

Generalmente gli studi condotti su matrici ambientali in relazione alla presenza di virus enterici sono di tipo qualitativo, poiché verificano la presenza/assenza di questi microrganismi. I risultati qui riportati evidenziano, invece, come la enumerazione delle particelle virali isolate e la loro identificazione può essere importante, poiché può essere valutata la efficienza dei diversi trattamenti nei confronti delle diverse specie virali enteriche. Ciò può essere utilizzato per migliorare la efficienza di specifiche fasi dei trattamenti di depurazione, che risultano particolarmente critiche per la rimozione delle particelle virali, in funzione degli usi cui sono destinati i liquami trattati o i fanghi.

Bibliografia

1. SLADE, J.S., FORD, B.J. Discharge to the environment of viruses in wastewater, sludge and aerosols. In: *"Viral Pollution of the environment"* G. Berg. (Ed.), CRC Press. 1984, 1: 3-15.
2. VAUGHN, J.M., LANDRY, E.F. Viruses in soils and groundwaters. In: *"Viral Pollution of the environment"*. G. Berg (Ed), 1983, 9: 163-204.
3. VILKER, V.L., KAMDAR, R.S. and FROMMHAGEN, L.H. Capacity of activated sludge solids for virus adsorption. *Chem. Eng. Co.* 1980, 4: 569-573.

4. SOBSEY, M.D., JONES, B.L. Concentration of Poliovirus from tap-water using positively charged microporous filters. *Appl. Environm. Microbiol.* 1979, 37: 588-595.
5. SCRABE, D.G.D. The Picornavirion: structure and assembly. In "*The molecular biology of Picornaviruses*". R. Perez-Bercoff (Ed.), Plenum Publishing Corp. New York. 1979, p.1-23.
6. WAIT, D.A., SOBSEY, M.D. Method for recovery of Enteric Viruses from estuarine sediments with chaotropic agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983, 46 (2): 379-385.
7. BLOCK, J.C. Viruses in environmental waters. In "*Viral Pollution of the environment*" G. Berg (Ed.), CRC Press. 1983, 7: 117-145.
8. HURST, C.J. Detecting viruses in water. *J. Am. Wat. Works Ass.* 1989, 81: 71-80.
9. ORSINI, P., AULICINO, F.A. Rilevamento di virus enterici in campioni "particolari" come gelatina e solidi sospesi. In "*La ricerca dei virus enterici nelle acque e in varie matrici ambientali*". 1993, Rapporti Istisan 93/20 (ISSN 0391-1675) p.110-124.
10. AULICINO, F.A., COLOMBI, A., CALCATERRA, E., ORSINI, P., MASTRANTONIO, A., BELLUCCI, C. 1997. Virus enterici da fanghi di impianti di depurazione di liquami domestici. *Ann. Ig.* 8 (4): 459-467.
11. AULICINO, F. A., COLOMBI, A., ORSINI, P., MASTRANTONIO, A., BELLUCCI, C. Enteric viruses in domestic sewage sludge. In: *Environmental Contamination 6th Intern. Conf.* October Delphi. CEP Consultants Ltd Edimburg -UK. 1994, p. 54-56.
12. AULICINO, F.A., COLOMBI, A., CALCATERRA, E., CARERE, M., MASTRANTONIO, A., ORSINI, P., Microbiological and chemical quality of sludges from domestic wastewater plants. *Int. J. Environ Health Res.* 1998, 8: 137-144.
13. AULICINO, F.A., MASTRANTONIO, A., ORSINI, P., BELLUCCI, C., MUSCILLO, M., LA ROSA, G. Enteric viruses in a wastewater treatment plant in Rome. *Wat. Air and Soil Pollution* 1996, 91: 327-334.
14. AULICINO, F.A., ORSINI, P., MASTRANTONIO, A., BELLUCCI, C., MUSCILLO, M., PATTI, A.M., VOLTERRA L. Proposte di tecniche per la concentrazione di campioni di provenienza ambientale. In "*La ricerca dei virus enterici nelle acque e in varie matrici ambientali*". Rapporti Istisan 93/20 (ISSN 0391-1675) 1993, p.142-182.
15. ALBERT, M., SCHWARTZBROD, L. Recovery of enterovirus from primary sludge using three elution concentration procedures. *Wat. Sci. Techn.* 1991, 24(2): 225-228.
16. GOYAL, S.M., ADAMS, W.N., O' MALLEY, M.L., LEAR, D.W. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle Atlantic region. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 48(4):758-763.
17. SCHWARTZBROD, L., BOSCH, A., LUCENA, F., GIRONES, R., BERIL, C. and JOFRE, J. Recovery of solid associated viruses: evaluation of different procedures. *Zbl. Bakt. Hyg.B.* 1989, 188: 559-564.
18. BERG, G., SAFFERMANN, R.S., DAHLING, D.R., BERMAN, D., HURST, C.G. USEPA *Manual of methods for virology*: Environm. Protection Agency, 600/4-84-013 Cincinnati OH 5.32, 1984, par.3.2.

19. BERG, G., SAFFERMANN, R.S., DAHLING, D.R., BERMAN, D., HURST, C.G. *USEPA Manual of methods for virology*: Environm. Protection Agency, 600/4-84-013 Cincinnati OH 5.32, 1984, par.3.1.
20. BITTON, G. Adsorption of viruses onto surfaces in soil and water. *Water Res.* 1975, 9: 473-484.
21. BLOCK, J.C, SCHWARTZBROD, L. *Viruses in Water System. Detection and identification*. VCH Publisher Inc. (Germany), 1989.
22. SCHWARTZBROD, L., MATHIEU C. Viruses recovery from wastewater treatment plant sludges. *Water Res.* 1986, 20 (8): 1011-1013.
23. AULICINO, F.A., Il rilevamento dei virus. In "*Virus enterici nelle acque: epidemiologia e tecniche di rilevamento*" Rapporti Istituzionali, 1991, 91/2:56-93.
24. PAYMENT, P., FORTIN, S., TRUDEL, M. Elimination of human viruses during conventional waste water treatment by activated sludge. *Can. J. Microbiol.* 1986, 32: 922-925.
25. SCHWARTZBROD, L., VILAGINES, P., SCHWARTZBROD, J., SORRETTE, B., VILAGINES, R., COLLOMB, J. Evaluation of the viral pollution in two wastewater treatment plants. *Water Res.* 1985, 19 (11): 1353-1356.
26. AUTORI VARI. Detection of enteric viruses. In "*Standard Methods for the examination of water and wastewater*". American Public Health Association. Washington D.C. 20005. 1992, pp.9/101-9/116.
27. REED J.L., MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938, 27: 493-497.
28. AULICINO, F.A., MASTRANTONIO, A., ORSINI, P., CARERE, M. Isolamento di virus enterici nei liquami. In: *Trattamento e riutilizzo di acque reflue e fanghi di origine domestica*. Frigerio A. Faldini F. (Eds). G.S.I.S.R. , 1996, p. 87-94.
29. SCHEURMAN, P.R., FARRAH, S.R., BITTON, G. Laboratory studies of virus survival during aerobic and anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 1991, 25 (3): 241-245.
30. GOYAL, S.M., SCHAUB, S.A., WELLINGS, F.M., BERMANMAN, D., GLASS, J.S. Round Robin Investigation of Methods for recovering Human Enteric Viruses from Sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 48 (3): 531-538.

I VIRUS ENTERICI NEI LIQUAMI

Anna Maria Patti

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

I liquami trasportano una gran quantità di microrganismi, molti dei quali patogeni, eliminati con le feci dall'uomo e dagli animali. Tra questi i virus enterici, agenti eziologici di diverse malattie, alcune delle quali di notevole gravità. La contaminazione virale delle acque reflue non è certo un fatto nuovo, tuttavia negli ultimi anni è diventata un problema emergente di sanità pubblica per una serie di motivi legati alla necessità di smaltire, soprattutto nei grandi centri urbani, quantità sempre crescenti di liquami.

Il problema dello smaltimento dei reflui urbani è stato affrontato da sempre in modo differente nelle zone costiere, nei centri attraversati da corsi d'acqua o nell'entroterra. Ad esempio la pratica di irrigare i suoli con i liquami risale a circa 4000 anni fa ed è tuttora una soluzione indispensabile nelle regioni più aride; costituisce, inoltre, per i paesi industrializzati e più urbanizzati la valvola di sicurezza per smaltire l'enorme quantità di rifiuti liquidi, salvaguardando nel contempo altre risorse idriche che possono essere destinate al consumo umano. È ovvio che il risvolto negativo di tale pratica sta nella contaminazione microbiologica apportata ai vari ambienti naturali che fungono da accettore finale. Soffermandoci solo sull'aspetto della contaminazione virale occorre ricordare che le stime quantitative della presenza di virus enterici variano da 10.000 a 500.000 TCID₅₀ per litro di liquame a seconda della situazione epidemiologica dei vari paesi. La rilevanza di questi dati è palese se si pensa ai virus A ed E dell'epatite a trasmissione oro-fecale, agli enterovirus, ai rotavirus, al numeroso gruppo dei virus di Norwalk, agli astrovirus, ai coronavirus e agli altri la cui scoperta ha via, via contribuito a chiarire l'epidemiologia delle infezioni virali sostenute da acqua contaminata.

Un'importante considerazione sulla pericolosità dell'utilizzazione, per esempio in agricoltura, di acque superficiali contaminate deriva dalla capacità dei virus di dare infezione a dosi veramente basse (in teoria sarebbe sufficiente una sola particella virale) e dalla loro resistenza nell'ambiente, di gran lunga maggiore a quella degli usuali indicatori di contaminazione fecale. I virus inoltre resistono anche ai trattamenti di depurazione dei liquami e pertanto giungono indenni nelle acque di superficie.

Nel 1991 l'OMS in collaborazione con le Nazioni Unite (Programma per l'ambiente) ha formulato alcune linee guida per l'utilizzazione delle acque reflue in agricoltura e nei bacini di acquacoltura al fine di incoraggiarne l'utilizzo e, nello stesso tempo, di salvaguardare sia la salute degli addetti che la salute dei consumatori. L'obiettivo è la limitazione del rischio infettivo dovuto alla contaminazione microbiologica, ma a questo proposito le problematiche emergenti riguardano la contaminazione virale.

D'altra parte neppure nelle citate linee guida dell'OMS vengono formulate delle indicazioni in merito.

Per quel che riguarda l'Italia, al fine di limitare la diffusione delle patologie a trasmissione fecale-orale, il Comitato dei Ministri per la tutela dell'acqua dall'inquinamento ha stabilito che "... nel caso siano interessati raccolti destinati ad essere consumati crudi dall'uomo occorre sottoporre gli scarichi ad un trattamento primario e secondario o equivalente e, se ritenuto opportuno, anche alla filtrazione o ad altro metodo di trattamento spinto; inoltre gli scarichi devono essere sottoposti ad un trattamento adeguato di disinfezione, in modo che il MPN di colibatteri sia inferiore a 2 per 100 ml (il valore MPN è la media delle misurazioni eseguite per 7 giorni consecutivi)....." (Delibera 4 febbraio 1977 - allegato 5, paragrafo 2.3 - G.U. supplemento ordinario 21 febbraio 1977 n° 48).

Anche in questo caso nulla si dice circa la contaminazione virale. Tuttavia appare evidente che il dettato della legge viene di fatto trascurato, data la diffusa contaminazione delle acque superficiali (Tabella 1).

Ne deriva una difficile valutazione del rischio per la salute umana, in particolare di quello legato alla contaminazione da virus enterici, sia derivante da un'esposizione professionale (com'è quella degli addetti agli impianti di depurazione, all'agricoltura, al settore alimentare) sia più in generale per la popolazione generale ad esempio relativamente al consumo di vegetali coltivati con acqua contaminata.

Un esempio emblematico è fornito dal fiume Tevere: i risultati delle analisi microbiologiche delle acque comprese nell'ambito urbano e a valle di Roma delineano una situazione igienica critica ed allarmante con indici di inquinamento da coliformi fecali pari a 10^4 - 10^6 /100 ml. Numerose indagini hanno altresì dimostrato la presenza nel fiume di microrganismi patogeni eliminati con le feci da malati e da portatori; sin dai primi anni '70 sono stati individuati enterovirus, adenovirus e più recentemente anche il virus dell'epatite A e i Reovirus.

Tabella 1. *Virus enterici isolati in campioni ambientali durante il 1997*

Tipo di campione	N	Enterovirus		Non Entero
		Polio	Non Polio	
Liquami	90	9	22	38
Mare	60	-	-	4
Laghi	8	-	-	-
Fiumi	38	5	11	9

Del resto ancora oggi nel territorio del Comune di Roma sono molto numerosi gli scarichi civili che, attraverso collettori pubblici e privati, si immettono nel fitto reticolo idrografico che caratterizza la parte finale del bacino del Tevere. Inoltre anche parte dei liquami che vengono convogliati dalle adduttrici ai grandi depuratori è sversata, a monte di questi, direttamente nell'Aniene o nel Tevere.

Nonostante tale situazione, l'acqua del Tevere viene prelevata a scopo irriguo mediante 9 impianti di sollevamento situati in vari punti del fiume, con una capacità di aggrottamento complessiva di oltre 21.000 litri al secondo. Il trasporto dell'acqua è assicurato da canali aperti o da tubazioni che, nel loro complesso, hanno uno sviluppo pari a 190 km; a partire da tali canali ha luogo la distribuzione agli utenti della zona primaria agricola, che corrisponde a circa 1/3 dei 28.000 ettari dei comprensori di Ostia e di Maccarese.

Nella zona di Maccarese operano aziende di grandi dimensioni e, nell'insieme dei due comprensori, diverse migliaia di ditte consorziate. Limitatamente alla zona di Maccarese, circa 600 ettari sono coltivati ad insalata, finocchi, carote; tali ortaggi, destinati ad essere consumati crudi, vengono distribuiti su tutto il territorio nazionale (1, 2).

Fino ad oggi si è tenuto in poco conto il rischio di infezioni virali trasmesse da vegetali consumati crudi, rischio che pure è suffragato da dati epidemiologici (vedi la recente epidemia di epatite da virus A in Puglia), sia per difficoltà tecniche, sia perché l'alto livello endemico delle infezioni virali a trasmissione fecale-orale faceva sì che tutta la popolazione fosse esposta al contagio con modalità diverse; per gli stessi motivi nell'ambito dell'Igiene del Lavoro non sono finora state prese in considerazioni esposizioni professionali in quanto si presupponeva che gli addetti al settore agricolo fossero esposti non già per la loro professione, ma allo stesso modo della popolazione generale. Oggi con le migliorate condizioni socioeconomiche, culturali e, di conseguenza di igiene personale, l'epidemiologia delle infezioni virali enteriche è cambiata.

La contaminazione virale delle acque superficiali merita quindi particolare attenzione quale che sia il tipo di virus dato che tutti rappresentano un rischio per la salute umana.

Dato il momento epidemiologico appare interessante soffermarsi solo su alcuni punti.

Presenza di enterovirus

Per quel che riguarda i poliovirus, quello attuale è un momento importante di definizione dell'eradicazione dal nostro territorio di tale agente etiologico. La sorveglianza della circolazione ambientale di poliovirus è sicuramente di interesse nazionale soprattutto per accertare che tutti i ceppi isolati siano di origine vaccinale. Tale dato oltre che permettere all'Italia di certificare alla Regione Europea dell'OMS, con maggiore sicurezza, di essere "polio free" è importante perché non tutti gli italiani sono vaccinati e comunque tra i giovani adulti vaccinati una quota consistente, circa il 30%, risulta non protetta nei confronti del poliovirus 3.

Nella regione europea, la maggior parte dei paesi non riporta casi di malattia paralitica già da alcuni anni. Tuttavia epidemie verificatesi nel 1992-93 in Olanda e

quelle più recenti di Albania, Grecia e Kosovo suggeriscono la necessità di intensificare la sorveglianza.

L'eradicazione della poliomielite (Risoluzione WHA 41.28 del maggio 1988) entro i primi anni del prossimo millennio può essere realizzata con l'aumento dei livelli di immunizzazione tramite vaccinazione e con il monitoraggio dei livelli di copertura immunitaria e di circolazione ambientale dei poliovirus selvaggi. Solo dopo attestazione, da parte di ogni singolo paese, dell'assenza di poliovirus selvaggio, come documentato dai risultati ottenuti in almeno due anni di sorveglianza attiva, si potrà affermare che esistono a livello mondiale le condizioni per dichiarare eradicata la poliomielite (3).

Per quel che riguarda i coxsackievirus basta forse ricordare l'associazione con il diabete giovanile. È in ogni caso uno dei tipi virali più diffusi nell'ambiente.

Virus dell'epatite A

Ogni anno nel mondo vengono denunciati circa 1,4 milioni di casi di epatite A non solo nei paesi in via di sviluppo ma anche nei paesi industrializzati. Dato che la malattia, in particolar modo nei primi anni di vita, decorre per lo più in forma asintomatica e che la frequenza di notifica è bassa, si può ipotizzare che la prevalenza reale dell'infezione sia tre-dieci volte superiore e che quindi l'epatite A rappresenti un problema di sanità pubblica.

Fino a un paio di decenni fa l'Italia era un paese a elevata endemia di infezione: il virus circolava molto più di oggi e il contagio avveniva in età pediatrica. Di conseguenza la quasi totalità degli italiani in età adulta era immune e tale immunità persisteva per tutta la vita. Paradossalmente il miglioramento delle condizioni igieniche e di quelle sanitarie ha ridotto l'immunità naturale della popolazione con uno spostamento dell'età di massima incidenza della malattia, come mostrato in Tabella 2 che porta ad esempio i dati della regione Lazio (4), malattia che nell'adulto ha un decorso più grave. Il rischio di contagio dipende dal fatto che l'agente eziologico circola ancora, seppure in modo più limitato. Nell'adulto la malattia richiede l'ospedalizzazione in quanto si ha iperpiressia, ittero intenso, consistente aumento delle transaminasi, ecc. Talvolta la sintomatologia dura molto a lungo, anche diverse settimane o mesi con conseguenze anche economiche a causa delle numerose giornate lavorative perse. Inoltre al di sopra dei 49 anni di età la mortalità sarebbe pari al 2,5% secondo quanto attestato dai CDC di Atlanta (Center for Disease Control - USA).

Nei soggetti affetti da altre epatopatie, in particolare nei soggetti affetti da epatite cronica da virus C, aumenta in ogni caso il rischio di epatite fulminante. La condizione di epatite C cronica rappresenta quindi un'importante indicazione di profilassi immunitaria contro il virus A.

Gli studi epidemiologici effettuati in Italia sottolineano l'evoluzione dell'epidemiologia di questa infezione che resta pur tuttavia endemica con una modalità di trasmissione legata, in oltre il 60% dei casi, al consumo di frutti di mare crudi (5). Come già detto si ha un generale decremento delle percentuali di sieropositività non solo nelle regioni del Nord del Paese ma anche nelle zone centrali, soprattutto per le prime classi di età.

Tabella 2. Incidenza di HAV nel Lazio nel 1997 (6,23/100.000)

Classi di età	Sesso	N. casi
0-14	F	38
	M	48
15-24	F	34
	M	53
25-64	F	53
	M	94
>65	F	2
Totale	F	127
	M	195

In Molise, per esempio Ripabelli *et al.* (6) indicano negli adolescenti una prevalenza pari allo 0,4%.

Per quel che riguarda il Lazio, in particolare la città di Roma, Catania *et al.* (7) riportano tra 2 e 12 anni una prevalenza variabile da 5,35% a 16,41%, con una differenza significativa per sesso: 15% nei maschi e 2% nelle femmine.

Se si analizzano invece i dati di incidenza forniti dalle statistiche ufficiali (5, 8) si vede che nell'ambito del territorio nazionale vi sono realtà molto differenti. Nel 1996 sono stati notificati in Italia 8651 casi di malattia acuta, dei quali 5109 in Puglia e 1252 in Campania (Tabella 3). Il 62% dei casi riportava consumo di frutti di mare crudi. I molluschi bivalvi, consumati crudi o dopo una breve esposizione al calore solo pochi minuti sufficienti a far aprire le valve, rappresentano il maggior fattore di rischio per la trasmissione del virus dell'epatite A. Oltre la zona in cui vengono allevati, nella contaminazione dei mitili gioca un ruolo importante l'abitudine di venderli tenendoli immersi in acqua di mare allo scopo di mostrarli vivi; l'acqua delle vasche viene prelevata nelle zone costiere dove è frequente e più elevata la contaminazione dovuta agli scarichi urbani. In Puglia l'incidenza più elevata si è riscontrata a Bari e nella zona costiera. Anche le verdure, irrigate con acque in cui vengono sversati i liquami, sono state ritenute responsabili dell'epidemia (5).

Questi fattori di rischio interessano tutta la popolazione generale nel suo complesso; tuttavia cominciano a delinearsi gruppi a rischio per esposizione lavorativa. Tra questi, come già accennato, gli addetti ai sistemi di depurazione dei liquami anche a causa dell'elevata resistenza del virus dell'epatite A. Diversi studi, anche in altri paesi, sottolineano una maggiore prevalenza di anticorpi in questa categoria correlata in modo statisticamente significativa con la durata dell'esposizione professionale (9). Le stesse

Tabella 3. Incidenza di HAV in alcune regioni italiane

Anno	Italia	Campania	Puglia	Sicilia
1993	3308	612	915	185
1994	3351	767	1349	140
1995	1434	468	173	67
1996	8651	1252	5109	205

considerazioni sussistono per gli agricoltori che utilizzano le acque superficiali a scopo irriguo.

Bibliografia

1. SANNA, M., FLOCCIA M. *Il Tevere alle porte di Roma*. 1991, ECOEDIZIONI, p. 3-14.
2. FARA, G.M., TAMBURRINO, A., PATTI, A.M., SANTI, A.L., BOCCHINI S. La contaminazione virale delle acque del Tevere. *Panorama della Sanità*. 1995, 27: 34-35.
3. FIORE, L., NOVELLO, F., GRANDOLFO, M.E. *Eradicazione delle paralisi flaccide in Italia* Rapporti Istisan, 96, 22, 1996, p. 1-10.
4. Osservatorio Epidemiologico Regione Lazio. Sistema di Sorveglianza delle Malattie Infettive. Lazio, 1996-1997.
5. Notiziario dell'ISS - 1998 SEIEVA 11 (3).
6. RIPABELLI, G., SAMMARCO, M.L., CAMPO, T., MONTANARO, C., D'ASCENZO, E., GRASSO, G.M. Prevalence of antibodies against enterically transmitted viral hepatitis (HAV and HEV) among adolescents in an inland territory of central Italy. *Eur. J. Epidemiol.* 1997, 13(1): 45-7.
7. CATANIA, S., AJASSA, C., TZANTZOGLU, S., BELLAGAMBA, R., BERARDELLI, G., CATANIA, N. Seroepidemiologic study of the prevalence of anti-HAV antibodies in children in Rome. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* 1996, 18 (1): 7-9.
8. Ministero Della Sanità, Bollettino epidemiologico, 1996.
9. CADILHAC, P., ROUDOT-THORAVAL, F. Seroprevalence of hepatitis A virus infection among sewage workers in the Parisian area, France. *Eur. J. Epidemiol.* 1996, 12(3): 237-240.

I PROTOZOI NEI LIQUAMI: SIGNIFICATO E TECNICHE DI RILEVAMENTO

Patrizia Rossi, Edoardo Pozio

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità. Roma

Introduzione

Lo sviluppo delle tecnologie relative al trattamento dei liquami data ormai di oltre cento anni, ma la maggior parte degli impianti attuali non sono ancora in grado di eliminare i patogeni in maniera soddisfacente. Anche nei paesi più avanzati le acque di superficie, che spesso servono da fonte idrica per il consumo umano, sono contaminate da microrganismi patogeni. Inoltre, gli attuali sistemi di trattamento per la potabilizzazione delle acque non sempre riescono ad abbattere completamente la carica microbica, in particolare la contaminazione da protozoi patogeni per l'uomo. Molti di questi organismi costituiscono un problema sanitario emergente, e le acque, siano esse superficiali, di falda, trattate per uso potabile, o di balneazione, rappresentano un veicolo di trasmissione che espone intere comunità a rischio d'infezione (1).

Negli ultimi anni, l'aumento di soggetti immunocompromessi, dovuto in massima parte alla pandemia da HIV ma anche all'uso sempre più diffuso di chemioterapie antitumorali e immunosoppressive negli organotrapiantati, ha determinato un aumento della prevalenza delle infezioni opportuniste ed il riconoscimento del ruolo patogeno per l'uomo di protozoi intestinali quali *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e i Microsporidi. Il primo caso di criptosporidiosi umana fu riportato nel 1976 e negli anni seguenti si pensò che questa parassitosi fosse unicamente un'infezione opportunistica comune nei soggetti immunodepressi. In seguito la descrizione di casi di criptosporidiosi umana in soggetti immunocompetenti e di epidemie causate dal consumo di acque contaminate, nonché i risultati di studi epidemiologici condotti nella popolazione immunocompetente, hanno dimostrato come *C. parvum* sia uno dei patogeni intestinali più frequenti (2). Le sue oocisti, insieme alle cisti di *Giardia intestinalis*, sono ubiquitarie, e nelle acque di superficie la loro concentrazione è correlata al livello di contaminazione fecale delle stesse. Attraverso il sistema fognario vengono trasportate intatte agli impianti di depurazione, dove riescono a sopravvivere ai trattamenti ai quali sono sottoposti i liquami. Le (oo)cisti sono molto resistenti alle condizioni ambientali e neanche i disinfettanti comunemente usati nei processi di potabilizzazione delle acque riescono ad inattivarle (3). (Oo)cisti vitali ed infettanti si ritrovano sia nelle acque di superficie che nei fanghi, veicolate dagli scarichi primari e secondari. Di qui l'importanza di rilevarne la presenza sia nelle acque trattate destinate all'agricoltura sia negli impianti di potabilizzazione prima e dopo i trattamenti, per determinarne l'efficacia nell'abbattimento della carica parassitaria. Un basso numero di organismi è infatti sufficiente a causare l'infezione nell'uomo. *Cryptosporidium parvum*

e *G. intestinalis* costituiscono quindi uno dei maggiori problemi sanitari relativi al trattamento dei liquami e alla potabilizzazione delle acque. Molte epidemie di giardiasi e di criptosporidiosi descritte nei paesi industrializzati sono state causate da guasti nei sistemi di trattamento o di distribuzione delle acque, o dalla contaminazione delle fonti idriche (4). In concomitanza con alcune epidemie è stato segnalato un aumento significativo dei livelli di coliformi fecali e/o della torbidità delle acque trattate (5), mentre in altri casi i livelli di qualità microbiologica delle acque potabilizzate erano conformi alle linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (6). Gli organismi utilizzati come indicatori per determinare la qualità microbiologica delle acque, sono presenti nelle feci in numero maggiore rispetto ai patogeni con i quali condividono caratteristiche simili per quanto riguarda la resistenza ai trattamenti di rimozione (e disinfezione negli impianti di potabilizzazione) e alle condizioni ambientali. Inoltre si coltivano facilmente *in vitro*, quindi l'analisi di campioni ambientali di modesto volume è sufficiente a rilevarne la presenza. *Cryptosporidium parvum* e *G. intestinalis*, invece, sono molto resistenti ai trattamenti con cloro (sono necessari 16.000 e 10 mg/l per inattivarne le oocisti e le cisti, rispettivamente), sopravvivono per mesi in ambiente umido e non si coltivano facilmente o del tutto *in vitro*. Inoltre quando presenti nelle acque superficiali sono in concentrazioni molto basse (0,001-107 organismi/l), ma sufficienti ad infettare l'uomo dato che la dose minima infettante è di sole 25-100 cisti per *G. intestinalis* (7) e 30 oocisti per *C. parvum* (8). Ne consegue che la presenza di questi protozoi può essere accertata solo mediante tecniche diverse da quelle tradizionalmente utilizzate negli impianti di depurazione e potabilizzazione. Le metodologie attualmente disponibili necessarie al rilevamento di protozoi patogeni sia nei liquami che nelle acque destinate al consumo umano sono basate prevalentemente sull'esame microscopico previa concentrazione di grandi volumi di acqua, e presentano ancora notevoli limitazioni nella sensibilità.

Tecniche di rilevamento

I numerosi metodi sviluppati negli ultimi anni per la ricerca nelle acque delle forme infettanti di protozoi patogeni, in particolare oocisti di *C. parvum* e cisti di *G. intestinalis*, si articolano in quattro fasi: raccolta del campione, concentrazione, separazione delle (oo)cisti dai detriti e identificazione dei patogeni a livello specifico o di genere. A queste fasi si deve aggiungere la valutazione della vitalità e infettività delle forme di resistenza.

Raccolta e concentrazione del campione. - Il primo metodo sviluppato e attualmente più diffuso, definito come "standard" dall'Environmental Protection Agency degli U.S.A., si basa sull'utilizzo di cartucce contenenti filtri di polipropilene con porosità nominale di 1 μ , attraverso i quali vengono filtrati 10-1000 l di acqua (9). I filtri vengono eluiti tagliandoli e lavandoli varie volte con una soluzione detergente, il cui volume finale, generalmente di 1-4 l, viene ridotto concentrando per centrifugazione. La percentuale di recupero ottenuta con questo metodo varia da 1 a 40%, a seconda della qualità dell'acqua esaminata, del laboratorio nel quale è stato eseguito e del metodo usato per la

conta dei parassiti. Il vantaggio di questo metodo è la sua praticità per l'utilizzo sul campo e la possibilità di esaminare notevoli volumi di acqua, specialmente nel caso di acque potabili.

Un altro metodo "standardizzato" utilizza filtri a membrana sostenuti da un tripode di acciaio, attraverso i quali viene pompata l'acqua da esaminare (10). La membrana viene poi raschiata delicatamente e lavata con soluzione detergente, successivamente concentrata per centrifugazione. Il volume totale filtrato dipende dalla torbidità del campione, variando da 1-2 litri per le acque molto torbide a 10-50 litri per le acque potabili. La percentuale di recupero ottenuta con questo metodo è comparabile a quella del metodo precedente. Una seria limitazione all'utilizzo di questa tecnica è costituita dal limitato volume che può essere filtrato nel caso di acque molto torbide, e dalla difficile applicazione sul campo. Recentemente è stata proposta una modifica di questo metodo che consiste nell'uso di membrane di acetato di cellulosa, che vengono successivamente disciolte in acetone invece di essere eluite (11). Ciò consente di recuperare anche i parassiti che rimangono intrappolati nelle fibre della membrana, aumentando notevolmente la capacità di recupero che può raggiungere anche il 70%.

Un'altra metodica molto utilizzata si basa sulla concentrazione dei parassiti mediante flocculazione con carbonato di calcio (12). Aggiungendo al campione calcio cloruro e sodio bicarbonato a pH 10, si forma un precipitato contenente i parassiti che viene poi disciolto, previa aspirazione del surnatante, con acido sulfamico. La percentuale di recupero ottenuta con questo metodo è piuttosto buona (30-70%), ma la sua applicazione è limitata dallo scarso volume del campione (10-20 l) che deve essere trasportato in laboratorio per l'analisi.

Altri metodi sviluppati recentemente e ancora in fase sperimentale sono la filtrazione tangenziale, la centrifugazione a flusso continuo, e la filtrazione "vortex-flow".

Separazione dei parassiti dai detriti. - Poiché la concentrazione delle (oo)cisti è basata quasi esclusivamente sulla loro dimensione, i metodi usati sono aspecifici e quindi concentrano una gran quantità di particolato organico e inorganico presente nelle acque, comprendente anche batteri, lieviti e alghe. Questo materiale può ostacolare l'individuazione dei parassiti, sia aumentando il volume totale da esaminare al microscopio, sia sovrapponendosi alle (oo)cisti o interferendo con le reazioni specifiche necessarie alla loro identificazione. La maggioranza degli Autori utilizza metodi di centrifugazione in gradiente di densità (saccarosio, saccarosio-Percoll, Percoll-Percoll), che consentono di separare i parassiti dai detriti e riducono quindi la quantità di materiale da esaminare (13). Queste procedure si sono rivelate però estremamente inefficienti poiché è stato dimostrato che il loro uso riduce la percentuale di recupero di circa il 40%. Inoltre, non sono in grado di rimuovere completamente altri microrganismi come lieviti e alghe, la cui autofluorescenza può causare seri problemi nell'identificazione delle (oo)cisti.

Un metodo alternativo recentemente sviluppato è quello della separazione immunomagnetica (14). Anticorpi specifici diretti contro le (oo)cisti vengono legati a particelle magnetiche, che vengono fatte reagire con il campione in esame per consentire la formazione di legami con i parassiti eventualmente presenti, e quindi separate magneticamente. Benché concettualmente semplice, questo metodo presenta

alcune limitazioni, dovute alla qualità e specificità dell'anticorpo utilizzato e al tipo di legame da esso formato con l'epitopo dell'antigene, che se troppo debole o instabile può determinare il distacco dei parassiti e quindi la loro perdita. La torbidità dell'acqua sembra comunque essere il fattore determinante l'efficacia del metodo, essendo stato dimostrato che esiste una relazione inversa tra unità nefelometriche del campione in esame ed efficienza di recupero. Con campioni di acqua relativamente limpida la percentuale di recupero arriva al 90%, ma è proprio nei casi di acqua molto torbida che la separazione dei parassiti dai detriti assume particolare importanza.

Identificazione dei parassiti. - L'identificazione dei parassiti viene routinariamente effettuata in microscopia ad epifluorescenza utilizzando anticorpi monoclonali specifici legati a isotiocianato di fluoresceina (FITC) diretti contro la parete delle (oo)cisti. Alcuni autori, in particolare nordamericani, eseguono la reazione direttamente sul filtro sul quale è stato concentrato il campione, mentre gli autori europei preferiscono allestire vetrini multipozzetto con il materiale concentrato. La limitazione maggiore di questo metodo consiste nella reattività crociata degli anticorpi monoclonali attualmente commercializzati che reagiscono non solo con altre specie del genere *Cryptosporidium* che non parassitano l'uomo e quindi non hanno rilevanza epidemiologica, ma anche con lieviti ed alghe (15).

Alcuni autori britannici hanno usato la citometria di flusso per l'identificazione delle (oo)cisti nei campioni ambientali, facendo reagire in sospensione il materiale concentrato con un anticorpo monoclonale specifico legato a FITC, e processandolo al "Fluorescent Activated Cell Sorter" (FACS) (16). L'identificazione viene poi eseguita in microscopia ad epifluorescenza su vetrino. I vantaggi di questa tecnica risiedono nella maggiore semplicità dell'esame microscopico rispetto al metodo sopra descritto, poiché viene eliminata la maggior parte dei detriti che ostacolano l'individuazione dei parassiti, e nella riduzione del tempo necessario all'esame microscopico dei preparati. La limitazione maggiore al suo utilizzo consiste nell'elevato costo dello strumento (circa 200 milioni), nella sua manutenzione, e nella necessità di disporre di operatori qualificati.

Negli ultimi anni numerosi autori hanno descritto protocolli per l'identificazione di (oo)cisti nei campioni di acque mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) (17, 18), utilizzando una grande varietà di primers. L'alta specificità e sensibilità della metodica, che consente di eseguire l'identificazione di questi parassiti a livello di specie e di evidenziare almeno nominalmente fino ad una sola (oo)cisti in un campione concentrato, renderebbe la PCR il metodo di scelta per ovviare alle limitazioni che le altre metodologie presentano. Tuttavia, sono state incontrate numerose difficoltà nell'applicazione di questa tecnica ai campioni ambientali, dovute alla presenza nelle acque di inibitori della reazione, in particolare cationi divalenti, acido umico e acido fulvico (17). Inoltre, l'uso di PCR diretta contro DNA potrebbe dare luogo a falsi positivi, dovuti alla reattività di oocisti non vitali o di DNA presente nell'ambiente, dove può resistere molto a lungo.

Un approccio molecolare alternativo che è stato applicato per l'identificazione delle oocisti di *C. parvum* è costituito dall'uso dell'ibridazione *in situ* in fluorescenza specie-specifica, utilizzando sonde che hanno come bersaglio la molecola di rRNA della

subunità 18 (19). Questa metodica consente di identificare solo le oocisti vitali, ma la fluorescenza derivata dalle sonde attualmente disponibili è molto debole, facilmente mascherata dall'autofluorescenza di particelle algali e quindi l'uso è fortemente limitato.

Valutazione della vitalità e dell'infettività. - Il reperimento di (oo)cisti in campioni ambientali non ha un significato epidemiologico chiaro, poiché se gli organismi non sono vitali e infettanti non costituiscono un reale rischio sanitario. Quindi è sorto un grande interesse verso lo sviluppo di metodiche che consentano di accertare la vitalità e, soprattutto, l'infettività delle (oo)cisti presenti in questo tipo di campioni.

Le procedure di inclusione/esclusione di coloranti vitali hanno dimostrato una buona correlazione con l'escistazione *in vitro* (20). Si basano sull'uso di propidio ioduro (PI), che non penetra nella membrana, e DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo), che penetra nella membrana, per determinare la vitalità delle (oo)cisti. L'utilizzo di questi coloranti vitali consente di individuare: 1) (oo)cisti vitali che includono DAPI ma escludono PI; 2) vitali che non includono né l'uno né l'altro ma che, se opportunamente stimolate, si comportano come le precedenti; 3) non vitali che includono PI; 4) e (oo)cisti vuote che non includono né PI né DAPI. Nei campioni ambientali è frequente il reperimento di "gusci" vuoti di oocisti che ovviamente non hanno nessun significato in termini di rischio sanitario, ma indicano che i trattamenti non sono stati in grado di abbattere completamente la carica parassitaria e che il campione potrebbe contenere anche oocisti vitali. Attualmente la determinazione della vitalità delle oocisti permette di stabilire il rischio d'infezione legato all'utilizzo di acque contaminate, e la semplicità del metodo lo rende applicabile nella routine.

Recentemente sono stati proposti metodi alternativi alla colorazione vitale DAPI/PI, che utilizzano due nuovi coloranti degli acidi nucleici, SYTO9 e MPR71059, in grado di differenziare (oo)cisti vitali e non, e che hanno dimostrato una buona correlazione con l'infettività saggiata nei topi CD-1 neonati (21).

L'escistazione *in vitro*, di cui esistono molti protocolli descritti in letteratura, si può facilmente ottenere utilizzando sali biliari, enzimi pancreatici, e opportune condizioni di temperatura e pH, riproducendo le condizioni che i parassiti trovano nell'intestino dell'ospite. Tuttavia questi metodi, molto utilizzati nella valutazione della vitalità delle (oo)cisti nei laboratori di ricerca, non sono assolutamente applicabili all'esame dei campioni ambientali che generalmente contengono un numero di organismi molto basso.

Come per numerosi microrganismi patogeni per l'uomo, anche per *C. parvum* e *G. intestinalis* sono stati descritti diversi modelli animali utilizzati per determinare l'infettività delle (oo)cisti. Fra tutti, i modelli più adatti per riprodurre l'infezione *in vivo* sono risultati i topi CD-1 o BALB/c neonati per *C. parvum* (22) ed i gerbilli per *G. intestinalis* (23), ma i risultati ottenuti sono molto variabili a seconda delle dosi infettanti e dei metodi usati per valutare il livello di infezione. Quindi in mancanza di una standardizzazione dei modelli animali da utilizzare, ed in considerazione del loro alto costo, attualmente la determinazione dell'infettività delle (oo)cisti presenti in un campione ambientale non è applicabile nella routine.

Sono stati anche proposti modelli di coltura *in vitro* per la determinazione dell'infettività delle oocisti di *C. parvum* presenti nei campioni ambientali (24, 25). Alla fine dei normali protocolli di raccolta e concentrazione, il materiale residuo viene sterilizzato con cloro a concentrazioni tali da inattivare i batteri eventualmente presenti ma non le oocisti, e poi inoculato su cellule monostrato. Dopo un tempo di contatto tale da consentire ai parassiti di penetrare nelle cellule ospiti, si procede al lavaggio delle cellule che vengono poi esaminate 24-48 ore dopo l'inoculo per rilevare la presenza di antigeni parassitari o di acidi nucleici mediante immunofluorescenza o PCR.

Un approccio alternativo per le determinazioni della vitalità delle (oo)cisti, consiste nell'indurre la produzione di "heat shock protein" (hsp) e quindi dell'RNA messaggero che codifica per esse. Questo metodo, che utilizza in PCR primers specifici diretti verso l'mRNA codificante per l'hsp, è stato descritto sia per *G. intestinalis* (26) che per *C. parvum* (27). Si è rivelato molto sensibile, in grado di mettere in evidenza la presenza di una sola (oo)cista vitale.

Ricerca di altri protozoi

Cyclospora cayetanensis e *Isospora belli*. - Finora non sono stati descritti metodi specifici per la ricerca di questi due protozoi, ma si ritiene che i protocolli sviluppati per *G. intestinalis* e *C. parvum* siano ugualmente efficaci per la ricerca delle oocisti di questi due parassiti date le loro dimensioni. Le oocisti di *C. cayetanensis* misurano infatti 8-10 μ di diametro, quelle di *I. belli* 9-12 x 20-35 μ . Purtroppo per l'identificazione di questi due protozoi non sono disponibili nel commercio anticorpi poli- o monoclonali, quindi si deve ricorrere alle proprietà di autofluorescenza agli UV della parete delle oocisti per la loro individuazione, e allo studio delle loro caratteristiche morfologiche per la loro identificazione. Inoltre per questi due parassiti finora non sono stati descritti né metodi di coltura *in vitro* né modelli animali. Recentemente oocisti di *C. cayetanensis* sono state individuate in acque reflue mediante microscopia ad epifluorescenza ed a contrasto di fase, e la loro identificazione confermata con tecniche molecolari (28).

Microsporidi. - Per questo gruppo di protozoi valgono le stesse considerazioni riportate per *C. cayetanensis* e *I. belli*, riguardo alla mancanza di protocolli specifici per la loro ricerca nelle acque reflue e più in generale nei campioni ambientali. Le dimensioni delle spore dei microsporidi parassiti dell'uomo sono però inferiori a quelle delle oocisti di *C. parvum*, misurando 1-2 μ di lunghezza, e quindi la loro individuazione presenta maggiori difficoltà. Finora sono state descritte numerose tecniche di colorazione (tricromica modificata, Calcofluor White, Uvitex-2B, Giemsa, ecc.) per la diagnosi di microsporidiosi nel materiale biologico (feci, urine, lavaggio broncoalveolare, sezioni istologiche, ecc.) (29), ma si tratta di tecniche aspecifiche che colorano anche altri organismi, come ad esempio i lieviti. Inoltre non esistono kit commerciali che utilizzino anticorpi poli- o monoclonali, e l'identificazione a livello di specie viene effettuata in microscopia elettronica a trasmissione o mediante metodiche immunologiche e/o molecolari. Alcune specie di microsporidi parassiti dell'uomo si

coltivano facilmente *in vitro* su varie linee cellulari monostrate, mentre per *Enterocytozoon bieneusi*, la specie più diffusa che provoca infezioni gastrointestinali nei soggetti HIV-positivi, non sono attualmente disponibili sistemi cellulari che ne consentano la propagazione *in vitro*. Recentemente, tre specie di microsporidi parassiti dell'uomo sono state identificate mediante PCR in acque superficiali, in acque di falda e in acque di scolo (30).

Conclusioni

Quanto più bassa è la concentrazione di patogeni nelle acque grezze, tanto più è possibile ridurre la carica microbica nelle acque trattate a livelli accettabili in termini di rischio sanitario. Perciò, il rilevamento di protozoi patogeni sia nei liquami che nelle acque depurate consente di monitorare la qualità microbiologica di queste ultime, e quindi di ridurre l'immissione di patogeni sia nelle acque di superficie che in quelle utilizzate in agricoltura. La presenza di protozoi patogeni per l'uomo su ortaggi che vengono consumati crudi è stata già documentata (31).

Le tecniche di rilevamento di protozoi patogeni nei campioni ambientali, siano essi acque trattate o liquami, presentano ancora notevoli limitazioni, sia in termini di efficienza che di indagine e costi. È auspicabile che gli studi in corso da alcuni anni riescano a rendere queste metodiche più semplici ed efficaci, e quindi utilizzabili nel lavoro di routine.

Bibliografia

1. MARSHALL, M.M., NAUMOVITZ, D., ORTEGA, Y., STERLING, C.R. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Review* 1997, 10: 67-85.
2. GRIFFITHS, J.K. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Advances in Parasitology* 1998, 40: 38-72.
3. KORICH, D.G., MEAD, J.R., MADORE M.S., SINCLAIR, N.A., STERLING, C.R. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology* 1990, 56: 1423-1428.
4. ROSE, J.B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annual Review of Health* 1997, 18: 135-161.
5. WIDMER, G., CARRAWAY, M., TZIPORI, S. Water-borne *Cryptosporidium*: a perspective from the USA. *Parasitology Today* 1996, 12: 286-290.
6. GOLDSTEIN, S.I., JURANEK, D.D., RAVENHOLT, O., HIGHTOWER, A.W., MARTIN, D.G., MESNIK, J.L., GRIFFITHS, S.D., BRYANT, A.J., REICH, R.R., HERWALDT, B.L. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. *Annals of Internal Medicine*. 1996, 124:459-468.
7. SMITH, H.V., SMITH, P.G. Parasitic protozoa in drinking water. *Endeavour* 1990, 14, 74-79.

8. DUPONT, H.L., CHAPPEL, C.L., STERLING, C.R., OKHUYSEN, P.C., ROSE, J.B., JAKUBOWSKI, W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*. 1995, 332: 855-859.
9. MUSIAL, C.E., ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R., GERBA, C.P. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987, 53: 687-692.
10. ONGERTH, J.E., STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology* 1987, 53: 672-676.
11. ALDOM, J.E., CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. *Letters in Applied Microbiology* 1995, 20: 186-187.
12. VESEY, G. SLADE, J.S., BYRNE, M., SHEPHERD, K., FRICKER, C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Journal of Applied Bacteriology* 1993, 75: 82-86.
13. FRICKER, C.R., CRABB, J.H. Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. *Advances in Parasitology* 1998, 40: 241-278.
14. BIFULCO, J.M., SHAEFER, F.W. Antibody-magnetite method for selective concentration of *G. lamblia* cysts from water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, 59: 772-776.
15. GRACZYK, T.K., CRANFIELD, M.R., FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of other species other than *Cryptosporidium parvum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1996, 54: 274-279.
16. VESEY, G., HUTTON, P., CHAMPION, A., ASHBOLT, N., WILLIAMS, K.L., WARTON, A., VEAL, D.A. Application of flow cytometric methods for the routine detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. *Cytometry* 1994, 16: 1-6.
17. JOHNSON, D.W., PIENIAZEK, N.J., GRIFFIN, D.W., MISENER, L., ROSE, J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1995, 61: 3849-3855.
18. MAYER, C.L., PALMER, C.J. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, 62: 2081-2085.
19. VESEY, G., ASHBOLT, N., FRICKER, E.J., DEERE, D., WILLIAMS, K.L., VEAL, D.A., DORSH, M. The use of ribosomal rRNA targeted oligonucleotide probes for fluorescent labeling of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Journal of Applied Microbiology* 1998, 85: 429-440.
20. CAMPBELL, A.T., ROBERTSON, L.J., SMITH, H.V. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 1992, 58: 3488-3493.
21. BELOSEVIC, M. GUY, R.A., TAGHI-KILANI, R., NEUMAN, N.F., GYUREK, L.L., LIYANAGE, L.R., MILLARD, P.J., FINCH, G.R. Nucleic acid stains as indicators of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *International Journal for Parasitology* 1997, 27: 787-798.

22. PERRYMAN, L.E. Cryptosporidiosis in rodents. In: *Cryptosporidiosis in man and animals*. J.P. Dubey, C.A. Speer, and R. Fayer Eds, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, 1990, pp. 125-131.
23. FAUBERT, G.M., BELOSEVIC, M. Animal models for *Giardia duodenalis* type organisms. In: *Giardiasis*. E.A. Meyer Ed, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Amsterdam, New York, Oxford, 1990, pp. 78-90.
24. ROCHELLE, P.A., FERGUSON, D.M., MANDOJO, T.J., DE LEON, R., STEWART, M.H., WOLFE, R.L. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63: 2029-2037.
25. SLIFKO, T.R., FRIEDMAN, D., ROSE, J.B., JAKUBOWSKI, W. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63: 3669-3675.
26. ABBASZADEGAN, M., HUBER, M.S., GERBA, C.P., PEPPER, I.L. Detection of viable *G. lamblia* cysts by amplification of heat shock-induced mRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63: 324-328.
27. STINEAR, T., MATUSAN, A., HINES, K., SANDERY, M. Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental concentrates by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62: 3385-3390.
28. STURBAUM, G.D. ORTEGA, Y.R., GILMAN, R.M., STERLING, C.R., CABRERER, L., KLEIN, D.A. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, 64: 2284-2286.
29. WEISS, L.M., VOSSBRINCK, C.R. Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. *Advances in Parasitology* 1998, 40: 352-395.
30. DOWD, S.E., GERBA, C.P., PEPPER, I.L. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64: 3332-3335.
31. MONGE, R., ARIAS, M.L. [Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica]. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 1996, 46: 292-294.

I BATTERI PATOGENI E GLI INDICI DI FECALIZZAZIONE NEI LIQUAMI DI ORIGINE DOMESTICA

Rosalaura Oliveri

Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro" Università degli studi. Palermo

Un idoneo smaltimento dei rifiuti liquidi, oltre ad avere come obiettivo la salvaguardia dell'ambiente, rappresenta uno degli interventi fondamentali di prevenzione primaria delle malattie, sia infettive che non infettive, e pertanto costituisce uno dei principali problemi di sanità pubblica per la tutela della salute dei cittadini. La riduzione del carico inquinante delle acque reflue, prima dello smaltimento nell'ambiente, viene generalmente assicurato da una serie di trattamenti di depurazione più o meno complessi in relazione al tipo, alla concentrazione e alla portata dei reflui ed alla capacità autodepurante dei corpi idrici recettori.

La carica microbica totale dei liquami è rappresentata soprattutto da microrganismi saprofiti, ma anche da agenti patogeni. Tra i primi spiccano i batteri intestinali con funzioni digestive (coliformi fecali e streptococchi fecali) i quali, proprio per la loro elevata concentrazione nell'intestino umano ed animale, sono considerati indicatori di inquinamento di origine fecale; nei liquami domestici grezzi i coliformi fecali sono presenti in concentrazione variabile compresa tra 10^6 e 10^8 per 100 ml e gli streptococchi fecali tra 10^5 e 10^7 per 100 ml.

Già durante la sedimentazione primaria la carica microbica totale del liquame subisce una riduzione consistente; l'abbattimento di coliformi e batteri patogeni è stato stimato, in questo stadio, intorno al 30-50%. Più elevata risulta la riduzione dei batteri durante la fase di trattamento secondario a fanghi attivi (90-99%).

Confermano queste percentuali di abbattimento le analisi condotte nell'ambito di un progetto di ricerca sui reflui di due impianti di depurazione nell'area palermitana, finalizzato anche a valutare l'influenza di contaminanti biologici sui corpi idrici recettori. Le indagini, tuttora in corso, sono condotte in collaborazione tra l'Istituto Superiore di Sanità e il laboratorio di Igiene ambientale del Dipartimento di Igiene e Microbiologia dell'Università degli studi di Palermo.

Si tratta di due impianti a fanghi attivi; l'uno, del tipo ad ossidazione totale, tratta i reflui di un Comune (Villafrati) di 4.000 abitanti, l'altro, sito in un quartiere della zona orientale di Palermo (Acqua dei Corsari), tratta al momento 200-300 l/sec di liquame, corrispondenti a 90.000 abitanti equivalenti. Dopo il trattamento ossidativo la riduzione media dei coliformi fecali nei due impianti è pari rispettivamente al 96% e al 99%, e quella degli streptococchi fecali al 92,5% e al 98%.

I batteri coliformi, appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae*, sono microrganismi Gram-negativi, asporigeni, ossidasi-negativi, capaci di fermentare il lattosio a 35-37°C con produzione di acido e gas entro 24-48h. I generi principali sono

Escherichia, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*. Rappresentano un gruppo eterogeneo; alcune specie, infatti, sono esclusivamente commensali intestinali (es. *E.coli*), altre invece possono ritrovarsi nelle feci dell'uomo e degli animali (es. *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*), ma riescono anche a moltiplicarsi nell'ambiente (suolo, acque ricche di sostanze nutritive), altre ancora sono tipiche specie dell'ambiente acquatico (es. *Serratia fonticola*).

Escherichia coli è, notoriamente, un commensale del tratto intestinale dell'uomo e degli animali; fermenta lattosio e mannitolo, con produzione di acido e gas, anche a temperatura di 44-45°C in idonei terreni colturali, produce indolo dal triptofano, non presenta ossidasi e non determina idrolisi dell'urea. È inoltre caratterizzato dalla presenza degli enzimi β -galattosidasi e β -glucuronidasi.

La scelta di *E.coli* quale indicatore di contaminazione fecale delle acque discende dal fatto che più di ogni altro microorganismo esso sembra rispondere ai requisiti che dovrebbe possedere un indicatore ideale, vale a dire: a) presenza in alta concentrazione nelle feci dell'uomo e degli animali; b) rapido rilevamento attraverso metodologie semplici; c) incapacità di svilupparsi nell'ambiente esterno; d) resistenza nell'ambiente abbastanza sovrapponibile a quella di microrganismi patogeni trasmissibili con l'acqua.

Tuttavia, accanto ad *Escherichia coli*, anche altre specie, tra i coliformi (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*), presentano la capacità di fermentare il lattosio a 44-45°C ("coliformi termotolleranti"). Dal momento che questi ultimi, generalmente saprofiti dell'intestino umano e animale, sono presenti anche in materiale vegetale in decomposizione e nel terreno, si è orientati ad non utilizzare più il termine "fecali" per quei coliformi che vengono ricercati alla suddetta temperatura.

Gli Streptococchi fecali, inseriti nel gruppo D di Lancefield, comprendono i generi *Enterococcus* e *Streptococcus*. Sono caratterizzati da una resistenza più spiccata ai fattori ambientali rispetto ai coliformi e ad *E.coli*.

Fatte alcune eccezioni - come ad esempio *E. casseliflavus*, *E. faecalis* var. *liquefaciens*, *E. malodoratus*, *E. solitarius*, sierotipi che si ritrovano principalmente in materiale organico vegetale - gli streptococchi fecali comprendono soprattutto commensali del tratto intestinale dell'uomo e di alcuni animali. *Enterococcus faecalis* rappresenta la specie più frequente nelle feci umane. *Streptococcus bovis* e *Streptococcus equinus* sono presenti soprattutto nell'intestino degli animali. Altre specie sono *E. avium*, *E. faecium*, *E. gallinarum*.

I principali agenti patogeni (batteri, virus, protozoi, funghi, uova di elminti) rinvenibili nei liquami sono microrganismi e parassiti a prevalente eliminazione fecale, la cui presenza e concentrazione nelle acque reflue dipendono dalla situazione epidemiologica locale e dalla resistenza del singolo patogeno, che è a sua volta influenzata da fattori ambientali. Nella Tabella 1 sono riportati i principali batteri patogeni; alcuni di essi sono rappresentati da un numero più o meno elevato di tipi, così nell'ambito del genere *Salmonella* sono stati riconosciuti, sino ad oggi, oltre 2400 sierotipi diversi.

Tabella 1. Principali batteri patogeni rinvenibili nei liquami domestici

<i>Escherichia coli</i> (ceppi enteropatogeni)	<i>Shigella</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Leptospira</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Salmonella</i>	

Rappresentato da bacilli Gram-negativi, asporigeni, anaerobi facoltativi, generalmente mobili per flagelli peritrichi e, tranne rari casi, "lattosio non fermentanti", il genere *Salmonella* comprende sia sierotipi che infettano esclusivamente l'uomo (*S. typhi*) che sierotipi adattati ad alcune specie animali (es. *S. gallinarum*, *S. abortus ovis*, *S. abortus equi*, *S. cholerae suis*, *S. dublin*), di cui *S. dublin* ed *S. cholerae suis* sono patogeni anche per l'uomo, ed ancora sierotipi (detti anche "Salmonelle minori") che infettano indifferentemente l'uomo e un'ampia varietà di animali domestici e selvatici, inclusi animali a sangue freddo (rettili, anfibi).

È stato rilevato da diversi Autori che, in generale, la sopravvivenza nell'ambiente di *Salmonella*, così come di altri patogeni, aumenta alle basse temperature.

Studi di Morifigo et al. (1) hanno messo in evidenza una correlazione statisticamente significativa più elevata in acque dolci piuttosto che in acque di mare tra *Salmonella spp* e Coliformi fecali, e *Salmonella spp* e *C. perfringens*; correlazione è stata anche riscontrata tra Salmonelle e Streptococchi fecali, in acque di mare moderatamente contaminate, e tra Salmonelle e Coliformi fecali in acque di mare altamente contaminate.

Secondo quanto riportato da Mezrioui et al. (2), il tempo di sopravvivenza di *E. coli* e di *S. typhimurium* è più lungo in acque sottoposte ad un incremento graduale della concentrazione salina piuttosto che in quelle mescolate rapidamente con acque salmastre.

La ricerca di Salmonelle nelle acque richiede l'uso di tecniche di prearricchimento in terreni idonei (che inibiscono, peraltro, lo sviluppo di enterobatteri non patogeni), prima di passare al vero e proprio isolamento su terreni selettivi. Il frazionamento del campione d'acqua nel terreno di arricchimento, secondo il metodo MPN, consente inoltre di valutare non solo la loro presenza, ma anche la loro concentrazione.

Il prearricchimento sembrerebbe favorire l'isolamento di ceppi di salmonelle "injured", sottoposti a fattori di stress (2), e ciò potrebbe spiegare il rilevamento da campioni d'acqua di questi patogeni anche in assenza di coliformi fecali e streptococchi fecali.

La ricerca di Salmonelle nei liquami può rivestire un duplice scopo: quello di rilevare l'effettiva presenza e resistenza dei batteri in acque reflue, grezze e trattate, e quello di fornire un'immagine degli eventi infettivi in una determinata area geografica.

Un'indagine condotta, alcuni anni fa (1975-77) da Comes e Oliveri sulla presenza di Salmonelle in acque cloacali a Palermo, con prelievi eseguiti in vari punti della fognatura urbana, ha riscontrato una positività dei campioni del 56%. Su oltre 500 colonie, ascrivibili a *Salmonella*, furono riconosciuti soltanto 9 sierotipi, su cui spiccava

per frequenza di isolamento *S. wien* (48%), a dimostrazione della capacità di propagazione interumana di questo sierotipo in quegli anni (3).

Uno studio successivo (1979), condotto dagli stessi autori sulle acque reflue di un agglomerato di un quartiere popolare nella zona orientale di Palermo, prima e dopo trattamento epurativo in un impianto a fanghi attivi, ha evidenziato un numero di sierotipi abbastanza vario, in relazione al numero modesto di prelievi eseguiti e all'area circoscritta esaminata (4).

Nelle indagini in corso sopra citate, sulle acque reflue degli impianti del Comune di Villafrati e di parte della città di Palermo (Acqua dei Corsari), relativamente alla ricerca di Salmonelle, si evidenzia presenza costante nei liquami grezzi in arrivo, discontinuità di isolamento nel refluo trattato di Acqua dei Corsari ed una più ampia varietà di sierotipi nelle acque grezze convogliate a quest'ultimo impianto. Alcuni dei sierotipi isolati (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. blockley*) rientrano tra gli otto più frequentemente identificati, negli ultimi dieci anni, presso il centro Enterobatteri patogeni dell'Italia meridionale.

Le tecniche di isolamento generalmente applicate alla ricerca delle Salmonelle nell'ambiente, dovrebbero permettere anche l'isolamento delle Shigelle, ma, raramente, il reperto è positivo in tal senso; ciò potrebbe essere dovuto alla minore resistenza di questi batteri ai fattori ambientali, all'antagonismo dimostrato da alcuni microrganismi presenti nei liquami nei confronti di *Shigella*, ma anche al fatto che le tecniche applicate verosimilmente non sono del tutto idonee al loro isolamento.

Il genere *Shigella* comprende quattro sierogruppi, a loro volta suddivisi in sierotipi e sottotipi: *S. dysenteriae* (gruppo A); *S. flexneri* (gruppo B); *S. boydii* (gruppo C) e *S. sonnei* (gruppo D). I primi tre gruppi sono più frequenti nei paesi in via di sviluppo, mentre nei paesi industrializzati è più frequente *S. sonnei*. Serbatoio principale è l'uomo, la dose infettante è bassa: 10-100 microrganismi sono risultati sufficienti a determinare malattia in soggetti volontari.

Come già sottolineato *E. coli* è soprattutto un commensale dell'intestino umano e animale, tuttavia numerosi sono i sierotipi di *E. coli* patogeni responsabili di forme di enterite. Sono distinti in sei categorie principali: enterotossigeni (ETEC), enteroinvasivi (EIEC), enteropatogeni (EPEC), enteroemorragici (EHEC), enteroaggregativi (EAggEC) e ad aderenza diffusa (DAEC).

I ceppi enterotossigeni, causa frequente della diarrea del viaggiatore, si trasmettono soprattutto attraverso alimenti contaminati e, più raramente, tramite acqua contaminata; producono enterotossine, tra cui una tossina termolabile simile a quella prodotta da *Vibrio cholerae*.

I ceppi enteroinvasivi, endemici nei paesi in via di sviluppo, determinano una sindrome clinica dissenteriforme simile a quella sostenuta da Shigelle.

Rappresentante principale degli enteroemorragici è il sierotipo O₁₅₇ H₇ (isolato per la prima volta nel 1970 in maiali irlandesi), il cui serbatoio principale è il tratto gastroenterico dei bovini. È responsabile di una sindrome conosciuta in USA come "hamburger syndrome" o "barbecue syndrome", poiché l'alimento implicato è la carne di manzo macinata. Sono stati anche segnalati casi di infezione dovuti a contatto interpersonale e tramite consumo di acqua contaminata.

I ceppi enteropatogeni sono quelli riconosciuti da più tempo come responsabili di malattia diarroica, che colpisce soprattutto neonati. Ormai scomparsi dai paesi industrializzati, rappresentano invece un'importante causa di diarrea neonatale in aree dell'Asia, dell'Africa e del Sud America.

Agente eziologico di epidemie su vasta scala in aree dei suddetti continenti è *Vibrio cholerae*, il cui biotipo El Tor oggi prevale, nella diffusione, sul biotipo classico.

Studi sull'ambiente e sperimentazioni controllate (5, 6, 7, 8) fanno ipotizzare che *Vibrio cholerae* possa far parte della flora autoctona di zone costiere, bacini di acque salmastre, estuari, anche in associazione con zooplancton e Copepodi. Hanno altresì dimostrato la resistenza di questo microrganismo in acque marine, per lunghi periodi di tempo (mesi e persino anni), anche in carenza di sostanze organiche, con conseguente possibile trasferimento del patogeno a distanza.

Durante gli ultimi dieci anni *Campylobacter jejuni* è stato ritenuto responsabile, nei paesi industrializzati, di una serie di epidemie di enterite di origine idrica, dovute all'uso di acque non trattate o non correttamente trattate. Sebbene l'infezione da parte di questo microrganismo sia determinata anche da una bassa dose infettante, la sua presenza nelle acque sembra, tuttavia, abbastanza controllabile, considerata la sua particolare sensibilità al trattamento con il cloro (9).

Batteri gram-negativi, generalmente bacilli sottili e ricurvi, ma di forma coccoide se provenienti da colture invecchiate, *Campylobacter* spp presentano spiccata mobilità, sono capaci di ridurre i nitrati a nitriti, sono catalasi-positivi e generalmente ossidasi-positivi; microaerofili, richiedono una bassa tensione di ossigeno (3-6%) per la crescita. Tra le specie patogene per l'uomo e gli animali ricordiamo *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus*; non patogene sono invece considerate *C. sputorum* e *C. concisus*.

L'isolamento di *Campylobacter* da campioni d'acqua richiede generalmente l'esame di elevati volumi e l'uso di terreni di arricchimento. I metodi consigliati prevedono la filtrazione attraverso membrane 0,45 μm per acque leggermente torbide e attraverso membrane 0,45 μm associate a prefiltri (3,0 - 1,2 - 0,6 μm) per acque torbide.

I brodi utilizzati per l'arricchimento sono addizionati di tioglicollato, antibiotici e ossibile (per inibire gran parte dei batteri antagonisti) e incubati alla temperatura di 42°C per 48h in condizioni di microaerofilia, cui segue la dissociazione su piastre di terreno selettivo.

Campylobacter jejuni come *Yersinia enterocolitica* riconosce negli animali, selvatici e domestici, il principale serbatoio. La trasmissione (di tipo fecale-orale) si realizza attraverso il consumo di alimenti ed acque contaminate o il contatto diretto con animali e persone infette. Alimenti responsabili di forme diarroiche sostenute da *Campylobacter* sono soprattutto prodotti avicoli.

Yersinia enterocolitica rispetto a *Campylobacter* mostra una resistenza maggiore al trattamento con il cloro, sovrapponibile a quella dimostrata da *E. coli*. Concentrazioni di cloro-residuo libero di norma utilizzate per la disinfezione delle acque (0,2-0,5 mg/l) per un tempo di contatto di 10', tuttavia, sono sufficienti per inattivare questo microrganismo. Inoltre *Yersinia enterocolitica* sopravvive più a lungo di *E. coli* e di *C. jejuni* alle basse temperature (+4°C); un'apprezzabile riduzione del tempo di

sopravvivenza di questo batterio in acque superficiali può essere dovuta anche alla contemporanea presenza di microrganismi antagonisti (9).

Yersinia enterocolitica comprende sia sierotipi patogeni che sierotipi non patogeni, questi ultimi isolati soprattutto da campioni ambientali, come ad esempio campioni d'acqua. I ceppi patogeni sono isolati più frequentemente da animali, soprattutto dai maiali, il cui faringe può risultare ampiamente colonizzato e da prodotti alimentari a base di carne di maiale, ma anche da cani, gatti, volpi, castori, ecc.

Infine ricordiamo le leptospire patogene. Anche questi microrganismi riconoscono in animali selvatici e domestici il principale serbatoio. Ratti, topi campagnoli, cervi, volpi, cani e in alcune aree anche suini, apparentemente sani, possono albergare, per lunghi periodi di tempo, leptospire nei tubuli renali con conseguente escrezione con le urine.

L'uomo si infetta occasionalmente, in modo indiretto, in seguito al contatto con acque contaminate, molto raramente per contatto interpersonale.

La mancanza di isolamento di leptospire patogene da acque naturali non esclude la loro presenza: trattasi, infatti, di batteri labili, il cui rinvenimento è legato all'emissione intermittente da animali infetti, nonché alla competizione operata da flora batterica concomitante ed ancora alla loro tendenza a concentrarsi nei sedimenti di acque stagnanti e di corsi d'acqua. Il prelievo di campioni d'acqua da analizzare, pertanto, deve essere eseguito avendo cura di agitare opportunamente il materiale in corrispondenza dell'interfacie sedimento-acqua.

Le leptospire, microrganismi a lenta crescita, richiedono lunghi tempi di incubazione (circa sei settimane) in terreni di arricchimento e successiva applicazione di prove biochimiche e sierologiche per distinguere i ceppi patogeni da ceppi saprofiti. Sino ad oggi sono stati identificati oltre 200 sierotipi diversi, riuniti in 23 sierogruppi, sulla base della sovrapposizione antigenica.

Bibliografia

1. MORIÑIGO, M.A., CORNAX, R., MUÑOZ, M.A., ROMERO, P., BORREGO, J.J. Relationships between *Salmonella spp* and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Water Res.* 1990, 24 (1): 117-120.
2. MEZRIQUI, N., BALEUX, B., TROUSSELIER, M. A microcosm study of the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in brackish water. *Water Res.* 1995, 29 (2): 459-465.
3. COMES, R., OLIVERI, R. Sull'inquinamento ambientale da Salmonelle, sierotipi isolati da acque cloacali a Palermo. *L'Igiene Moderna* 1978, 71 (9): 1099-1114.
4. COMES, R., OLIVERI, R. Sulla sorveglianza dell'inquinamento ambientale da Salmonelle - Effetti del trattamento di depurazione in un piccolo impianto ad ossidazione totale nella città di Palermo. *Archivio Siciliano di Medicina e Chirurgia* 1979, 20 (4): 23-30.
5. COLWELL, R.R., SIEDLER, R.J., KAPER, J., JOSEPH, S.W., GARGES, S., LOCKMAN, H., MANEVAL, D., BRADFORD, H., ROBERTS, N., REMMERS, E., HUQ, I., HUQ, A. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41 (2): 555-558.

6. SINGLETON, F.L., ATWELL, R.W., JANGI, M.S., COLWELL, R.R. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 43 (5): 1080-1085.
7. HUQ, A., WEST, P.A., SMALL, E.B., HUQ, M.I., COLWELL, R.R. Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live Copepods in laboratory microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 48 (2): 420-424.
8. MUNRO, P.M., COLWELL, R.R. Fate of *Vibrio cholerae* O1 in seawater microcosms. *Water Res.* 1996, 30 (1): 47-50.
9. LUND, V. Evaluation of *E.coli* as an indicator for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* in chlorinated and untreated oligotrophic lake water. *Water Res.* 1996, 30 (6): 1528-1534.

PERSISTENZA DI VIRUS ENTERICI IN ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE

Luciana Croci, Concetta Scalfaro, Alfonsina Fiore e Laura Toti
Laboratorio Alimenti, Istituto Superiore di Sanità. Roma

Introduzione

Gli alimenti possono essere causa della trasmissione all'uomo di vari agenti patogeni di natura batterica o virale, provocando l'insorgenza di sindromi gastroenteriche, che, nonostante i progressi fatti nel settore della prevenzione, rappresentano ancora un serio problema di sanità pubblica. Dati epidemiologici e clinici dimostrano che i virus stanno assumendo una crescente importanza come causa di malattie trasmesse con gli alimenti (1, 2), nonostante ci sia ragione di credere che il numero delle gastroenteriti virali è ancora sottostimato, non solo in Italia, ma anche nel resto del mondo.

Gli alimenti coinvolti nella trasmissione all'uomo di virus sono molteplici, dall'acqua al latte alla carne (3), ma un ruolo preminente è rivestito dai prodotti della pesca (4, 5) e dai prodotti ortofrutticoli. A carico di questi ultimi sono stati registrati dal 1982, data di inizio del censimento delle gastroenteriti virali da parte del Centro per le Infezioni di Atlanta, un crescente numero di episodi gastroenterici (6). Alcuni di questi sono noti per il coinvolgimento di migliaia di persone, dovuti alla trasmissione di Norwalk virus, esistono inoltre evidenze di epidemie di epatite A, più o meno estese in seguito a consumo di verdure crude. Del tutto recentemente è stato segnalato un episodio di gastroenterite da *Calicivirus* che ha coinvolto 15 persone dopo il consumo di lamponi congelati provenienti dalla Serbia.

I prodotti ortofrutticoli possono essere contaminati durante le fasi di preparazione e distribuzione degli alimenti, quando non vengono osservate determinate norme igieniche, oppure possono essere contaminati all'origine, a causa dell'abitudine abbastanza diffusa di impiegare acque inquinate o reflue per l'irrigazione dei campi in cui vengono coltivati. Particolarmente pericolosi sono quei prodotti che presentano un periodo di crescita relativamente breve e vengono consumati crudi, come l'insalata.

Studi sono stati condotti allo scopo di valutare la capacità di adsorbimento e la persistenza di virus, quali Poliovirus e virus dell'epatite A (HAV), su diversi alimenti vegetali.

Materiali e metodi

Contaminazione dei campioni. Allo scopo di verificare la possibilità di contaminazione di prodotti vegetali, quali l'insalata, mediante irrigazione con acqua contaminata, sono

state allestite in laboratorio coltivazioni sperimentali di insalata mista (*Lactuca sativa*, *Cichorium intybus*, *Cichorium endivia*), che venivano regolarmente irrigate durante tutto il periodo di accrescimento, con acqua contaminata con Poliovirus 1, ceppo Mahoney, alla concentrazione di 10^6 TCID₅₀/ml. Per effettuare prove di persistenza del virus, insalata prelevata dal commercio veniva contaminata con una quantità di Poliovirus pari a quella riscontrata sull'insalata appena raccolta dopo la crescita.

Parallelamente campioni di insalata, del tipo già tagliata ed imbustata, carote e finocchi, prelevati dal commercio, venivano sperimentalmente contaminati immergendoli in acqua contenente HAV, ceppo FG, alla concentrazione di 10^6 TCID₅₀/ml.

Tutti i campioni venivano suddivisi in aliquote di 10g ciascuna e mantenuti a 4°C fino a che mantenevano caratteristiche di edibilità. Aliquote degli stessi campioni non contaminati venivano usati come controllo. Prelievi (una aliquota di controllo e due contaminate) venivano effettuati dopo 2, 4, 6, 9 o 10 giorni per evidenziare la presenza dei virus. Una delle due aliquote contaminate veniva sottoposta a lavaggio domestico prima di essere analizzata.

Determinazione della contaminazione virale. L'estrazione del virus veniva effettuata secondo quanto descritto precedentemente (7). Tutti gli estratti venivano quindi saggiati su colture cellulari, cellule VERO per la determinazione del Poliovirus 1 (7) e cellule Frp3 per la determinazione dell'HAV (8). Le cellule venivano poste ad incubare a 37°C in termostato a CO₂, rispettivamente per 72 ore e 15 giorni, quindi venivano osservate per l'eventuale effetto citopatico.

Tutti i risultati venivano confermati mediante PCR (9, 10).

Risultati

È stato evidenziato che un'insalata, irrigata regolarmente durante il suo periodo di accrescimento con acqua contenente Poliovirus 10^6 TCID₅₀/ml, una volta raccolta presentava una quantità di virus adsorbito sulla superficie delle foglie dell'ordine di 10^3 - 10^4 TCID₅₀/ml. Tale contaminazione si manteneva a livelli elevati fino al decimo giorno di stoccaggio dell'insalata a 4°C, inoltre sottoponendo il campione a lavaggio domestico, si notava un decremento di un solo logaritmo (Tabella 1). Le altre prove condotte contaminando sperimentalmente con HAV campioni di insalata, carote e finocchi, hanno evidenziato che i prodotti considerati presentano una diversa capacità di adsorbimento (Tabella 2), che risulta più alta per l'insalata.

I risultati relativi alla persistenza dell' HAV nell'insalata hanno ricalcato quelli ottenuti con il Poliovirus.

Mentre negli altri prodotti si è riscontrato un abbattimento del virus fino al raggiungimento di livelli non determinabili dopo alcuni giorni di mantenimento dei campioni a 4°C (dopo 4 giorni nelle carote e dopo 6 giorni nei finocchi).

Tabella 1. *Persistenza del poliovirus 1 in insalata contaminata mantenuta a 4°C e sottoposta a lavaggio domestico*

Giorni	Insalata contaminata da poliovirus (TCID ₅₀ /ml)*		Insalata controllo
	prima del lavaggio	dopo lavaggio	
0	1,8 x10 ⁴	1,5 X10 ³	neg
2	3,2 x10 ³	8 x10 ²	neg
4	2,7 x10 ³	1,6 x10 ²	neg
6	2,5 x10 ³	1,6 x10 ²	neg
10	2,5 x10 ³	1,6 x10 ²	neg

*media di tre esperimenti

Conclusioni

Da quanto sopra detto è evidente la pericolosità di tali alimenti quando vengono coltivati o manipolati nelle fasi di preparazione in maniera non igienicamente corretta. L'insalata sembra presentare le condizioni più favorevoli per l'adsorbimento e la persistenza dei virus, il minor recupero di virus evidenziato sugli altri prodotti da noi considerati, finocchi e carote, potrebbe essere imputato alle superfici più lisce e meno

Tabella 2. *Persistenza di HAV in prodotti vegetali contaminati, mantenuti a 4°C e sottoposti a lavaggio domestico*

Giorni	HAV TCID ₅₀ /ml*					
	Insalata		Carote		Finocchi	
	A	B	A	B	A	B
0	6,2x10 ⁴	3,8x10 ³	3,0x10 ³	6,2x10 ²	7,3x10 ³	3,6x10 ²
2	5,4x10 ³	5,6x10 ²	5,6x10 ²	5x10 ¹	2,1x10 ³	3,4x10 ²
4	3,2x10 ³	3,5x10 ²	n.d.	n.d.	5,8x10 ²	6,3x10
6	8,0x10 ²	2,8x10 ²	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	6,2x10 ²	2,8x10 ²	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* Media di 3 esperimenti

A: prodotto analizzato prima del lavaggio

B: prodotto analizzato dopo lavaggio domestico

n.d.= non determinabile, inferiore al limite del metodo

Tutti i campioni utilizzati come controllo sono risultati negativi

estese. Inoltre per quanto riguarda in particolare le carote, dove si è riscontrato un decadimento più rapido del virus presente (dopo 4 giorni non era più determinabile quantitativamente), si potrebbe ipotizzare che la presenza di alcune sostanze proprie di tali prodotti facilita l'inattivazione del virus.

Inoltre in tutti i casi presi in considerazione è emerso che il lavaggio domestico non garantisce un abbattimento significativo della contaminazione iniziale.

Allo scopo di prevenire la diffusione di malattie virali veicolate da questi prodotti è di fondamentale importanza la promozione di una efficace campagna informativa rivolta sia ai produttori che ai consumatori, affinché adottino corrette misure igieniche nelle fasi di produzione e di preparazione. Inoltre risulta sempre più pressante la necessità di disporre di metodi sufficientemente rapidi e sensibili che consentano un controllo routinario di tali alimenti che contribuisca a garantirne la salubrità. Tra i metodi di analisi rapidi, affidabili e sensibili si sta valutando l'applicabilità della tecnica nested-PCR direttamente sull'alimento. Una limitazione di questa metodica consiste nel fatto che rileva soltanto la presenza di acidi nucleici virali e non distingue, contrariamente alle colture cellulari, particelle virali con capacità infettanti da quelle che ne sono prive. Occorre comunque sottolineare che in una matrice alimentare l'RNA virale libero, privo cioè della protezione del capsido proteico, ha vita molto breve, a causa dell'alta percentuale di endonucleasi batteriche, pertanto la presenza di acidi nucleici rilevati con tale tecnica si può ritenere con buona probabilità proveniente da particelle virali integre nel campione originario.

Bibliografia

1. MACDONALD, K.L., GRIFFIN, P.M. Foodborne disease outbreaks. Annual Summary, 1982. CDC surveillance summaries, 1986. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1986, 35, 7SS.
2. CLIVER, D.O. Virus Transmission via Foods. *Food Technology* 1988, 241-248.
3. CLIVER, D.O., ELLENDER, R.D., SOBSEY, M.D. Foodborne viruses. In: "Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods", 2nd ed. (Speck M.L. ed.) American Public Health Association, Washington D.C., 1984.
4. KURITSKY, J.N., OSTERHOLM, M.T., KORLATH, J.A., WHITE, K.E., KAPLAN, J.E. A statewide assessment of the role of Norwalk virus in outbreaks of foodborne gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 1985, 151: 568-572.
5. MORSE, D.L., GUZEWICH, J.J., HANRANHAN, J.P., STRIGOF, R., SHAVEGANI, M., DEIBEL, R., GRABAU, J.C., NOWAK, N.A., HERMAN, J.E., CUKOR, G., BLACKLOW, N.R. Widespread outbreaks of clam and oyster associated gastroenteritis. Role of Norwalk virus. *New Eng. J. Med.* 1986, 314: 672-678.
6. WHITE, K.E., OSTERHOLM, M.T., MARIOTTI, J.A., KORLATH, J.A., LAWRENCE, D.H., RISTINEN, T.L., GREENBERG, H.B.A. foodborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis. *Ann. J. Epidemiol.* 1986, 24: 120-124.

7. CROCI, L., FIORE, A., DE MEDICI, D., TOTI, L. Persistence of *Escherichia coli* and Poliovirus 1 in contaminated vegetables. *Microbiologie Aliments Nutrition* 1991, 9: 257-262.
8. CROCI, L., DE MEDICI, D., GABRIELI, R., FRANCO, E., DI PASQUALE, S., TOTI, L. Effectiveness of water disinfection treatment on depuration of shellfish. *Microbiologie Aliments Nutrition* 1992, 10: 229-232.
9. DE MEDICI, D., BENEDEUCE, F., FIORE, A., SCALFARO, C., CROCI L. Application of reverse transcriptase-nested-PCR for detection of poliovirus in mussels. *Int. J. Food Microb.* 1998, 40: 51-56.
10. CROCI, L., COSENTINO, A.M., DE MEDICI, D., FIORE, A., MORETTI, P., COSTANTINI, G., TOTI, L. Isolation of HAV in mussels meeting acceptable bacteriological standards. In: *Proceeding of 4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications*. Berlin 7-12 june 1998 (in press).

GLI IMPIANTI DI DEPURAZIONE DI LIQUAMI E SICUREZZA DEI LAVORATORI

Antonio Colombi (*), Stefano Basilico (**)

(*) *Clinica del Lavoro "L. Devoto" - Dipartimento di Medicina del Lavoro, Università degli studi. Milano*

(**) *CEMOC - Unità Operativa Ospedaliera di Medicina del Lavoro - Azienda Ospedaliera "Istituti Clinici di Perfezionamento". Milano*

Introduzione

Le problematiche sanitarie connesse con il funzionamento e la gestione delle strutture fognarie e degli impianti di depurazione delle acque reflue degli agglomerati urbani rientrano storicamente in un'ottica di igiene e sanità pubblica. In epoche passate, le preoccupazioni risultavano principalmente riferite al pericolo di contaminazione ambientale da parte degli inquinanti chimici e biologici presenti negli scarichi fognari, e ai conseguenti rischi per la popolazione generale. Tuttavia il progressivo aumento dei volumi di scarichi fognari ed acque reflue da trattare - unitamente alla necessità di ulteriore trattamento e smaltimento dei fanghi biologici di risulta - ha determinato nel corso degli ultimi decenni un aumento delle strutture impiantistiche presenti sul territorio, accompagnato da un progressivo ampliamento della popolazione lavorativa addetta nel settore. A riprova della rilevanza ed attualità delle problematiche di medicina professionale in questo comparto, e più in specifico per ciò che attiene all'esposizione ad agenti biologici, in Allegato IX del D.Lgs. 626/1994 proprio lo svolgimento di compiti lavorativi nell'ambito delle reti fognarie e degli impianti di depurazione è espressamente indicato tra le attività tipicamente comportanti una potenziale esposizione ad agenti biologici pericolosi per la salute, prevalentemente compresi in classe 2 di pericolosità ai sensi della medesima normativa.

Sembra opportuno sottolineare che nell'ambito della gestione dei corsi d'acqua e delle strutture che costituiscono il complesso della rete fognaria (canali nel sottosuolo, impianti di depurazione, sistemi di chiuse e griglie), i fattori di rischio presenti possono essere classificati in base alla loro origine in chimici, fisici, e biologici. I rischi di natura chimica costituiscono di norma eventi accidentali, dovuti a fenomeni estemporanei di inquinamento massivo dei reflui (per esempio da sversamenti accidentali o dolosi di solventi) oppure legati alla fermentazione di materiale organico in condizione di carenza di ossigeno, con conseguente formazione di acido solfidrico (H_2S); i rischi di natura fisica sono principalmente connessi con l'esposizione a microclima sfavorevole oppure a sorgenti di rumore, quali pompe o sistemi di sollevamento. I rischi di natura biologica rappresentano invece una peculiarità costante delle acque reflue, e sono da porre in relazione alla presenza in esse di una popolazione di microrganismi variamente rappresentati (batteri, virus, protozoi, ed elminti), e con caratteristiche infettive,

allergogene, e tossinogeniche rilevanti. Se in passato in ambito professionale sono state oggetto di maggiore preoccupazione e studio i rischi infettivi per le vie di esposizione più classiche, quali quella ingestiva e cutanea, più recentemente particolare rilevanza ha assunto la esposizione per via inalatoria ad aerosol veicolanti microorganismi. La formazione degli stessi ha luogo nei corsi d'acqua o negli impianti di depurazione principalmente per azione di organi meccanici in movimento, per gorgogliamento di aria in pressione, nelle fasi di pompaggio, e per la formazione di spruzzi in occasione di vortici e salti di livello nei condotti. La formazione di aerosol e la conseguente esposizione in ambito professionale ai microorganismi da essi veicolati risulta ampiamente documentata nella letteratura scientifica italiana ed internazionale, con particolare riguardo agli impianti di depurazione delle acque reflue (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Se la grande variabilità dei contaminanti in termini quali-quantitativi rende conto delle difficoltà anche nei confronti degli inquinanti chimici, ancora più incerta è la valutazione del rischio biologico, sia relativamente agli effetti subacuti osservabili sia nelle procedure di controllo sanitario - ai fini preventivi - a cui sottoporre gli addetti. Da una prima analisi delle conoscenze sui possibili effetti per la salute conseguenti alla esposizione ad agenti biologici, sembra che uno dei maggiori problemi nella valutazione dell'entità del rischio a priori dell'instaurarsi del danno risieda nella difficoltà a quantificare in modo esaustivo l'entità dell'esposizione: a differenza di quanto si registra nei confronti degli agenti chimici, per gli agenti biologici va infatti sottolineata la mancanza di procedure di indagine standardizzate per il monitoraggio dell'esposizione aerodispersa presente in ambito professionale; inoltre, se in campo tossicologico è generalmente possibile identificare la "dose-soglia" e le relazioni "dose-effetto" e "dose-risposta" per le varie sostanze chimiche, più difficile risulta l'interpretazione delle dosi in termini di frequenza attesa delle diverse manifestazioni patologiche di natura sia infettiva che allergologica.

La presente ricerca è stata sviluppata al seguito del recepimento da parte dell'Italia della normativa dell'Unione Europea in termini di sicurezza e prevenzione dei rischi professionali legati all'esposizione ad agenti biologici (D.Lgs 626/1994-titolo VIII). Tra gli scopi della presente indagine è da annoverare in prima istanza la valutazione dell'entità dell'esposizione ad agenti infettivi, o comunque patogeni, presenti nelle acque reflue e nei liquami di depurazione - tutti apparenti alla già citata classe 2 di pericolosità - e di valutare con un'indagine siero-epidemiologica e sanitaria l'insorgenza di effetti avversi per la salute conseguentemente all'esposizione agli stessi microorganismi. Secondariamente, la formulazione e validazione di un criterio per la valutazione dell'esistenza di rischi di natura infettiva nei soggetti professionalmente esposti (secondo quanto previsto dalla vigente normativa) e la proposta di un protocollo di indagine standardizzato per la loro valutazione e prevenzione.

Materiali e metodi

L'indagine si è articolata secondo i canoni consolidati della medicina e dell'igiene professionali, mediante l'attuazione di monitoraggio ambientale, monitoraggio

biologico e sorveglianza sanitaria.

Monitoraggio ambientale. La valutazione dell'entità della carica microbiologica aerodispersa è stata effettuata in diversi punti della rete fognaria milanese e in 10 impianti di depurazione di acque reflue urbane situati in Lombardia, di diversa capacità (da 3.000 a 900.000 abit./equiv.) e operanti con processo a fanghi attivi e con tecnologie di aerazione diverse (turbina o candele sommerse). Sembra opportuno sottolineare che la misura quali-quantitativa della diffusione degli aerosol contaminati da microrganismi nell'aria presenta una serie di limitazioni tecniche legate alla scelta delle metodiche da impiegare per il campionamento ed alla rilevanza da porre all'identificazione delle diverse specie microbiche presenti quali contaminanti. Nel presente studio, per il campionamento si è utilizzato lo strumento *Surface Air System*, in grado di veicolare volumi di aria noti sulla superficie di piastre Petri contenenti terreno di coltura per le diverse specie microbiologiche ed operante per tempi di aspirazione di 20", con un volume di raccolta di 60 l di aria.

I prelievi nella rete fognaria sono stati effettuati in 5 punti, tutti in ambito sotterraneo confinato, con campionatore statico posizionato ad altezza di circa 1,5 metri; in un punto è stata effettuata una unica misura, nei rimanenti 4 la misura è stata eseguita in doppio, a monte e a valle rispetto al flusso delle acque reflue nei condotti. Per ognuno dei 10 impianti di depurazione indagati sono stati eseguiti prelievi in punti diversi, ed a distanza crescente dalle presunte sorgenti di diffusione ambientale degli aerosol. In ciascun punto i prelievi sono stati eseguiti in quadruplo; i campionamenti sono stati effettuati sottovento ad altezza di circa 1,5 metri, con campionatore rivolto in direzione dell'impianto. La successiva conta della carica batterica totale è stata seguita dalla caratterizzazione morfologica, biochimica e tassonomica dei microorganismi raccolti e (in 4 impianti di depurazione) della carica dei virus batterici (colifagi), assunti in qualità di indicatore della carica pseudo-virale aerodispersa. Le piastre utilizzate per la valutazione della carica batterica (espressa come unità formanti colonie [UFC] per metro cubo di aria [m^3] campionata) contenevano i seguenti terreni di coltura: 1) Plate Count Agar (Difco) per la valutazione della conta microbica aerodispersa totale, incubazione a 30 gradi C per 48 ore; 2) Violet Red Bile Lactose Agar (Biogenetic) per la conta di Coliformi totali e fecali, incubazione rispettivamente a 37°C e 44°C per 24 ore; 3) Kanamycin Aesculin Azide Agar Base (Oxoid) per la conta degli streptococchi fecali, incubazione a 37°C per 48 ore. Per la valutazione della carica dei colifagi (espressa come unità formanti placca [UFP] per metro cubo [m^3] di aria campionata) assunti in qualità di indicatore della carica pseudovirale aerodispersa, si è usato il seguente terreno: 4) Phage Count Agar, inoculato con *Escherichia coli* (ATCC 8113), incubazione a 37°C per 24 ore, e conta delle placche di lisi.

Sorveglianza sanitaria e monitoraggio biologico. Per ciò che concerne l'aspetto più propriamente sanitario dell'indagine, la stessa ha riguardato complessivamente un numero di addetti nell'ordine delle 98 unità. Tale popolazione è stata successivamente suddivisa in gruppi omogenei, classificati in relazione ai compiti lavorativi ed alla struttura di afferenza, in soggetti "potenzialmente esposti", "esposti", "molto esposti". Quale gruppo omogeneo "molto esposto", è stato individuato un gruppo di 56 soggetti, costituito da lavoratori addetti a varie mansioni nell'ambito dei servizi di gestione e

manutenzione della rete fognaria municipale milanese: le evidenze osservate nei confronti di questi lavoratori, confrontate con un gruppo di controllo composto da dipendenti di aziende alimentari e metalmeccaniche (73 soggetti), sono riportate nella presente relazione. Il monitoraggio biologico della avvenuta esposizione è stato attuato mediante valutazione dello stato di attivazione anticorpale specifico nei confronti dei microorganismi patogeni indicati nella letteratura scientifica come maggiormente presenti nelle acque reflue, mentre la sorveglianza sanitaria si è articolata attraverso la raccolta di un questionario anamnestico relativamente alle patologie infettive, un esame clinico obiettivo ed il prelievo di campioni di sangue, feci e urine per analisi di laboratorio. Le informazioni raccolte in maniera semistrutturata durante la visita medica, i riscontri dell'esame obiettivo della stessa e l'esito degli esami di laboratorio sono stati condensati e ridotti agli elementi (variabili) della "scheda codificata dei dati clinici". I dati sono stati poi memorizzati su personal computer con "DB3P" ed analizzati tramite "SAS for personal computer release 6.03". Le differenze esistenti tra i diversi gruppi nelle frequenze delle alterazioni dei diversi parametri studiati, sono state valutate mediante il test del χ^2 (Chi-quadrato). Il protocollo sanitario adottato nella presente indagine è riportato in sinossi in Tabella 1.

Risultati e discussione

Per ciò che attiene al monitoraggio ambientale, il prospetto sinottico dei valori di concentrazione dei diversi agenti biologici aerodispersi osservati nella presente indagine è riportato in Tabella 2 (rete fognaria) e in Tabella 3 (impianti di depurazione). Il complesso dei dati ottenuti ha confermato l'esistenza di punti o aree di formazione e diffusione di aerosol microbici sia nella rete fognaria che negli impianti. In particolare i salti d'acqua e i punti dove il flusso dei liquami si presenta più vorticoso, le vasche di ossidazione, le aree di pretrattamento dei liquami quali sistemi di sollevamento, le aree di trattamento dei fanghi quali filtropresse ed altre zone in cui vi sia movimentazione delle acque, sistemi di pompaggio, ed altre ancora, sono risultate fonti potenziali di contaminazione aerodispersa.

Nella rete fognaria, i valori di contaminazione relativi alla Carica Batterica Standard (CBS) sono risultati compresi nell'intervallo tra 1700 CFU/m³ (punti a minore turbolenza) e 3300 CFU/m³ (punti a maggiore turbolenza), mentre i Coliformi Totali (CT) nell'intervallo tra 600 CFU/m³ (punti a minore turbolenza) e 1200 CFU/m³ (punti a maggiore turbolenza) (Tabella 2). Negli impianti, le indagini condotte hanno verificato concentrazioni di batteri (come CBS) nei pressi dei punti individuati quali fonti di origine con valori nell'ordine di 1000-10.000 UFC/m³, con una rapida riduzione di questa contaminazione all'aumentare della distanza dalle sorgenti. A distanza di 50 metri dalla sorgente la CBS era infatti nell'ordine di 50-200 UFC/m³.

Tabella 1. Protocollo sanitario adottato nella presente indagine

Visita medica specialistica di medicina del lavoro	Anamnesi mirata (professionale, familiare, fisiologica, patologica e infettivologica) Esame obiettivo generale Test tine
Esami di laboratorio	VES, emocromo con formula leucocitaria, proteina C reattiva, frazioni di degradazione del fibrinogeno, elettroforesi delle proteine sieriche, fattore reumatoide, IgE, GOT, GPT, γ GT, glicemia, creatininemia; markers HAV, HBV, HCV; ricerca parassiti nelle feci, coprocoltura; esame urine con sedimento; valutazione attivazione anticorpale specifica anti: <i>Entamoeba coli</i> , <i>Leptospira ictero-haemorrhagiae</i> , Rotavirus, <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>Cytomegalovirus</i> , <i>Salmonella typhi</i> (antigene O, antigene H), <i>Toxocara canis</i> , <i>Cryptosporidium sp.</i>

Impianti di potenzialità diversa hanno mostrato apprezzabili, significative differenze nella carica batterica aerodispersa, soprattutto per quanto riguarda l'entità della contaminazione a distanze significative (10-20 metri) dalle vasche di aerazione per il diverso volume di materiale aerosolizzato.

La tipologia dei batteri aerodispersi (quale riportata nelle Tabelle 2 e 3) riflette quella dei microorganismi presenti nelle acque reflue urbane; è infatti stata rilevata una contaminazione aerodispersa da batteri di origine fecale (streptococchi fecali, SF), anche se le proporzioni reciproche tra le diverse specie - ad es. coliformi totali, coliformi fecali e streptococchi fecali - tendevano a non rispettare quelle presenti nelle acque reflue. Questa osservazione risulta al momento difficilmente interpretabile, se non alla luce di fattori interferenti-ambientali o meteo-climatici non identificati. Come già accennato, in 4 impianti si è infine misurata la presenza di colifagi aerodispersi, sia in prossimità delle zone di ingresso dell'acqua reflua negli impianti (grigliatura e sollevamento) che in prossimità delle vasche di aerazione e nelle zone di filtrazione finale. Le variabilità nelle concentrazioni dei fagi (assunti in qualità di indicatore della carica pseudo-virale aerodispersa, rilevati sia in fase di trattamento iniziale dei reflui [20 UFP/m³] che nelle fasi terminali [5 UFP/m³]), così come il loro riscontro nei locali di filtrazione e/o ispessimento dei fanghi, può essere in parte ricondotta alla limitata efficacia del trattamento di ossidazione aerobica, ed in parte all'azione di fattori interferenti non identificati.

Tabella 2. Concentrazione degli aerosol contaminati da microorganismi in 5 diversi punti della rete fognaria milanese

AGENTI BIOLOGICI	PUNTI DI PRELIEVO								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
CBS*	1700	3300	3500	170	1170	1800	6650	1150	1000
SF*	n.v.	100	150	n.v.	n.v.	20	70	n.v.	n.v.
CT*	570	1200	1100	330	290	20	n.v.	n.v.	n.v.
CF*	n.v.	500	350	30	20	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

Il prelievo codificato come "A" si riferisce ad un punto, mentre "B" e "C", così come "D" ed "E", "F" e "G", "H" e "I" si riferiscono a coppie di prelievi effettuati in corrispondenza dei diversi punti della rete, rispettivamente a monte e a valle rispetto alla direzione di flusso delle acque reflue.

Per ciò che attiene ai dati dell'indagine sanitaria effettuata, va in prima istanza sottolineato che nei confronti del gruppo degli esposti non sono rilevabili macroscopiche alterazioni dello stato di salute dei soggetti allo studio. L'unica eccezione è risultata costituita dall'osservazione di 2 casi di parassitosi intestinale (amebiasi e giardiasi, rispettivamente da *Entamoeba coli* e da *Giardia lamblia*), con decorso peraltro asintomatico; dei 2 casi rilevati di infestazione, patologia storicamente legate allo svolgimento di mansioni lavorative a livello delle strutture fognarie, va tuttavia sottolineato come uno dei due casi sia occorso in un soggetto che nell'ambito della Divisione svolge compiti a livello prevalentemente amministrativo, con solo sporadica esecuzione di mansioni con possibile contatto con i contaminanti biologici in ambito fognario e con un pregresso soggiorno a scopo turistico in paesi del Medio Oriente.

Se il reperto di parassitosi da un lato conferma quanto riferito nella letteratura scientifica in merito allo stretto collegamento fra lo svolgimento di mansioni lavorative in ambito fognario e l'insorgenza di questa patologia, l'esiguità della frequenza osservata del fenomeno attesta come le condizioni sia lavorative che di igiene e sanità pubblica nel territorio siano da ritenersi migliorate rispetto a quelle osservate negli anni '60. È infatti evidente che la natura e la concentrazione di microorganismi patogeni presenti nei reflui sono legate alle condizioni igienico-sanitarie della popolazione da cui provengono.

Un'altra fonte di variabilità della potenzialità infettiva o patogenetica delle acque di risulta è senz'altro costituita dall'incidenza che acque reflue da nosocomi possono avere sulla totalità dei reflui di un comprensorio. È altresì evidente che occasionali eventi infettivi epidemici (quali la presenza di tifo, colera, etc.) possono influenzare in senso negativo, anche se temporaneamente, la qualità delle acque di scarico (7). Per ciò che concerne la valutazione della attivazione anticorpale specifica - assunta come già

accennato in qualità di indicatore biologico di pregressa esposizione dei lavoratori a singole specie batteriche e/o virali -l'assenza di variazioni statisticamente significative fra esposti e controlli nella positività nei confronti della *Leptospira icterohaemorrhagiae*, che costituisce storicamente un altro tradizionale elemento di pericolo per la salute per i lavoratori in ambito fognario, suggerisce una condizione di assenza di rischio sulla base delle precedenti considerazioni sulla qualità delle acque. Allo stesso modo, non si sono osservate differenze statisticamente significative tra esposti e controlli per quanto riguarda la titolazione anticorpale anti *Legionella pneumophila*, *Clostridium tetani* (dato corretto per l'esecuzione di vaccinoprofilassi), *Citomegalovirus*, *Toxocara canis*, *Criptosporidium sp.*; ugualmente non significative, le differenze osservate relativamente ai titoli anticorpali per l'antigene O della *Salmonella typhi*, per il virus HAV, per l'antigene HBsAg del virus HBV, ed alla presenza dello stesso antigene HBsAg. Nel gruppo degli "esposti" è invece risultata statisticamente significativa l'aumentata frequenza nella presenza di positività anticorpale nei confronti del *Rotavirus* e dell'antigene H della *Salmonella typhi*.

Tabella 3. Concentrazione degli aerosol contaminati da microorganismi nei 10 impianti di depurazione delle acque reflue oggetto della presente indagine, e dei quali sono indicate le singole capacità nominali

Tabella 3.1. Impianti 1-5

AGENTI BIOLOGICI	IMPIANTI				
	1 3000 ab./eq.	2 4.000 ab./eq.	3 22.000 ab./eq.	4 80.000 ab./eq.	5 80.000 ab./eq.
CBS*	200- 1300	400-4200	200-3500	50-5000	250-2500
SF*	n.v.	0-20	0-100	n.d.	0-50
CT*	0-50	0-100	10-700	n.d.	0-100
CF*	0-20	n.v.	0-250	n.d.	0-50
FAGI**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0-20

Tabella 3.2. Impianti 6-10

AGENTI BIOLOGICI	IMPIANTI				
	6	7	8	9	10
	110.000 ab./eq.	110.000 ab./eq.	150.000 ab./eq.	200.000 ab./eq.	900.000 ab./eq.
CBS*	100-1200	10-7000	50-5000	250-3000	50-10000
SF*	0-50	0-250	n.d.	n.v.	n.v.
CT*	0-50	0-1300	n.d.	0-100	0-900
CF*	0-50	n.v.	n.d.	0-50	0-200
FAGI**	0-50	n.d.	n.d.	0-30	n.v.

CBS: carica batterica standard; CT: coliformi totali; CF: coliformi fecali; SF: streptococchi fecali; FAGI: batteriofagi.

* valori espressi come unità formanti colonie (UFC) per m³ d'aria campionata.

** valori espressi come unità formanti placca (UFP) per m³ d'aria campionata

n.d. non determinato; n.v. non valutabile, ovvero inferiore al limite di sensibilità del metodo.

Conclusioni

L'indagine effettuata nell'ambito della rete fognaria milanese e nei 10 impianti lombardi allo studio conferma quanto già osservato da altri Autori sulla possibilità che i condotti delle acque reflue e gli impianti di depurazione rappresentino, in misura variabile, delle sorgenti di disseminazione ambientale di aerosol contaminati da microorganismi (batteri e fagi). Più in particolare, la contaminazione aerodispersa si è rivelata più elevata in prossimità di punti dove si hanno salti d'acqua, presenza di organi meccanici in movimento, sistemi di chiuse e griglie, stazioni di pompaggio, coclee di sollevamento dei reflui, così come in prossimità delle vasche di aerazione degli impianti, tendendo a decrescere all'aumentare della distanza dalle vasche stesse per poi non essere più distinguibile dai valori naturali di fondo a 30 metri dalle stesse. La tipologia dei contaminanti microbiologici aerodispersi riflette in gran parte quella dei microorganismi presenti nelle acque reflue e nei fanghi biologici di depurazione. Si è tuttavia osservata una certa variabilità nelle concentrazioni delle singole specie: la stessa risulta riferibile in molti casi non alle modalità e condizioni di campionamento, ma a fattori interferenti meteo-climatici non identificati; analoghe considerazioni valgono per la contaminazione aerodispersa da batteriofagi, rilevati sia in fase di trattamento iniziale dei reflui che nelle fasi terminali. Per ciò che concerne gli aspetti più propriamente sanitari, il complesso dei risultati ottenuti - considerando l'ampiezza numerica della popolazione indagata e del gruppo di riferimento adottato e tenendo conto delle diverse variabili analizzate nei confronti tanto dell'esposizione ad agenti

biologici presenti nelle acque reflue quanto degli effetti sulla salute generalmente conseguenti a questa esposizione - suggerisce che i lavoratori in servizio nel comparto allo studio, e con particolare riguardo ai lavoratori addetti presso strutture fognarie municipali, risultano esposti a microorganismi potenzialmente patogeni, ma che il rischio infettivo osservato non risulta molto superiore rispetto a quello presente nella popolazione generale.

In conclusione, i risultati dello studio da noi condotto suggeriscono che nelle reti fognarie e negli impianti di depurazione biologica dei liquami urbani - nelle ordinarie condizioni di lavoro e di igienicità delle acque trattate - l'entità dell'esposizione degli operatori ai microorganismi di origine enterica presenti nei liquami configuri un potenziale rischio per la salute, la cui entità appare tuttavia verosimilmente molto limitata. I rilievi ambientali e le evidenze sanitarie emerse nella presente indagine, pur evidenziando infatti una effettiva condizione di esposizione per via aerodispersa a microorganismi pericolosi, suggeriscono che il fenomeno possa assumere modesta rilevanza nei confronti della salute degli addetti. Per quanto riguarda i due casi di parassitosi osservati, la generalizzazione di queste evidenze necessita di una serie di approfondimenti anamnestici, anche relativamente agli aspetti legati alle abitudini di vita, che non sono stati correttamente approfonditi.

Verosimilmente a causa della migliorata qualità delle acque reflue urbane, nella presente indagine non si sono osservate quadri patologici specifici, quali quelli descritti in epoche passate e riportate in letteratura scientifica: a tale proposito vale la pena di ricordare che, pur non essendo riportata l'insorgenza di forme cliniche conclamate, è stata descritta la comparsa di un quadro caratteristico, la cosiddetta "malattia dei fognaioli" (8, 9) caratterizzata da malessere generale, astenia, rinite acuta, iperpiressia ed alterazioni a carico dei titoli anticorpali e delle immunoglobuline seriche, nonché un'aumentata frequenza di episodi di dissenteria e disordini gastrointestinali, irritazione oculare e dermatiti irritative (6, 10). Sembra infine opportuno sottolineare che gli ambienti oggetto della presente indagine, con particolare riguardo agli impianti di depurazione, presentavano delle buone condizioni di igiene del lavoro, e inoltre che lo studio è stato condotto in aree e periodi in cui erano assenti forme epidemiche rilevanti nel bacino di utenza, e a tali condizioni devono essere riferite le nostre conclusioni.

Bibliografia

1. BUTELLI, P. Impatto da aerosols batterici negli impianti di depurazione. *Ing. Ambientale*. 1988, 17(1): 62-67.
2. CLARK, C.S. Potential and actual biological related health risks of wastewater industry employment. *Journal W.P.C.F.* 1987, 59(12): 999-1008.
3. COLOMBI, A., GIUBILEO, L., BASILICO, S., FOÀ, V. Valutazione dei rischi per la salute negli addetti agli impianti di depurazione delle acque reflue urbane: l'esposizione ad aerosol contaminati da batteri. In: *Atti del 56° Congresso della Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale*, Venezia 20-23 ottobre 1993, II: 717-720.

4. FANNIN, K.F., VANA, S.C., JAKUBOWSKY, W. Effect of an Activated Sludge Wastewater Treatment Plant on Ambient Air Densities of Aerosols Containing Bacteria and Viruses, *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 49(5): 1191-1196.
5. GARZAROLI, C., MAROSI, L., BASILICO, S., COLOMBI, A. Indagine sulla formazione di aerosol batterici in impianti per il trattamento delle acque reflue, *Acqua Aria* 1995, 8: 843-849.
6. SEKLA, L., GEMMILL, D., MANFREDA, J., LYSYK, M., STACKIW, W., KAY, C., HOPPER, C., VANBUCKENHOUT, L., EIBISH, R.T. Sewage Treatment Plant Workers and Their Environment: A Health Study, in Pahren H., Jakubowsky W. (Eds.). In: *Proc. Symposium Wastewater Aerosols and Disease*, September 19-21 1979, EPA-600/9-80-028, United States Environmental Protection Agency, Cincinnati OH 45268.
7. DE SERRES, G., LALIBERTÉ, G. Hepatitis A among Workers from a Wastewater Treatment Plant during a Small Community Outbreak, *Ocup. Environ. Med.* 1997, 54: 60-62.
8. CLARK, C.S., BJORNSON, A., SCHIFF, G.M., PHAIR, G.P., VAN MEER, G.L., GARTSIDE, P.S. Sewage Worker's Syndrome, *The Lancet* 1977: 1009 [7th May 1977].
9. RYLANDER, R., ANDERSSON, K., BELIN, L., BERGLUND, G., BERGSTROM, R., MANSON, L.A., LUNDHOLM, M., MATTSBY, I. Sewage Worker's Syndrome, *The Lancet* 1976, 478 [8th August 1976].
10. LUNDHOLM, M., RYLANDER, R. Work Related Symptoms Among Sewage Workers, *Brit. J. Ind. Med.* 1983, 40: 325-329.

ORIENTAMENTI PER STABILIRE I CRITERI DI CAMPIONAMENTO DI BIOAEROSOL

Achille Marconi

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità. Roma

Caratteristiche generali dei bioaerosol

Le particelle aerodisperse di origine biologica o bioaerosol sono costituite da pollini, spore fungine o frammenti del loro micelio, cellule batteriche, virus, protozoi, escrementi o frammenti di insetti, scaglie di pelle o peli di mammiferi o altri componenti. Da queste particelle possono, inoltre, originare residui o prodotti di organismi come lipopolisaccaridi batterici, e cioè endotossine o micotossine fungine. L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (1) distingue due classi di materiali di origine biologica aerodispersi: una generale, costituita dai "contaminanti di origine biologica" e quella specifica delle "particelle di origine biologica o bioaerosol". In generale il prelievo di queste particelle è basato sugli stessi principi che regolano il campionamento delle particelle aerodisperse (aerosol) non biologiche. Tuttavia l'esigenza di assicurare la sopravvivenza o l'attività biologica delle particelle di bioaerosol durante e dopo il prelievo rende il campionamento diverso da quello usato nel caso delle particelle fisiche. Inoltre la manipolazione e la conservazione del campione, così come l'analisi, presentano considerevoli differenze rispetto a quanto avviene per le particelle non biologiche. I bioaerosol posseggono specifiche caratteristiche che influenzano il loro campionamento. Queste particelle possono presentarsi con diverse forme:

- singole spore, grani di polline, cellule batteriche o virus
- aggregati di diverse spore o cellule
- frammenti di spore o cellule o prodotti del loro metabolismo
- materiali biologici trasportati da particelle non biologiche.

Diversi tipi di bioaerosol, come spore fungine e pollini, sono destinati per natura al trasporto aereo e restano vitali durante i trasferimenti nell'ambiente. Di conseguenza questi bioaerosol sono resistenti allo stress ambientale determinato ad esempio dalla luce ultravioletta, dal freddo, dal calore, dalla secchezza, e dai gas tossici, nonché allo stress del campionamento stesso. Le cellule vegetative batteriche sono facilmente danneggiate e la loro vitalità può essere compromessa dai fattori ambientali e dal processo di campionamento (2, 3). Molti batteri emessi dagli umani sono situati su residui di pelle e probabilmente restano vitali durante la loro residenza in aria, in quanto si sono adattati alle condizioni di secchezza e sono protetti dal substrato di origine. Le cellule microbiche nell'aerosol possono essere vitali o non vitali, le prime sono capaci di riprodursi o hanno un'attività metabolica, le seconde non si riproducono e sono morte. Inoltre molte specie di microorganismi ambientali non possono essere coltivate

sui terreni di laboratorio, poiché non si conoscono i loro requisiti nutrizionali. Il modo di esprimere i risultati dipende dal metodo di analisi impiegato e può essere in termini di unità formanti colonie (UFC), nel caso di organismi vitali, o di numero di cellule, spore o grani di polline, se non viene determinata la vitalità. Nel caso delle determinazioni chimiche, per es. endotossine, i risultati sono espressi in ng o mg/m³. La densità delle cellule microbiche è alquanto variabile, in funzione del livello di idratazione e del contenuto di lipidi, carboidrati ecc. In letteratura per la densità vengono riportati valori variabili generalmente tra 0,9 e 1,3 g/cm³. Le particelle di bioaerosol coprono un ampio intervallo di dimensioni (3). Quando queste particelle vengono trasportate da altro materiale oppure sono presenti come aggregati, la loro migrazione e deposizione dipende dalla dimensione complessiva dell'intera unità aerodispersa.

I batteri sono costituiti da cellule singole con dimensioni comprese tra 0,5 e 30 µm. La loro forma varia da sferica ad allungata (bacillare), da spirale a filamentosa. Molti batteri di forma sferica si ritrovano come aggregati di due o più unità, anche concatenati. Quelli di forma bacillare possono presentarsi singoli o in forma di catene. I batteri sono suddivisi in due gruppi principali in funzione della capacità di trattenere il colorante cristal violetto da parte delle loro pareti cellulari. I batteri gram-positivi (come lo Stafilococco) trattengono il colorante, mentre i gram-negativi (come lo Pseudomonas o la Legionella) no. Le spore batteriche (endospore), che si formano all'interno delle cellule vegetative, sono molto resistenti agli stress ambientali e hanno dimensioni comprese tra 0,5 e 3 µm. Esse restano aerodisperse e sono facilmente trasportate dalle correnti aeree. In aria le particelle batteriche possono essere libere o aderire ad altre particelle. I batteri tendono a moltiplicarsi in forma di colonie sui loro substrati naturali e, quindi, quando vengono aerosolizzati, tendono a presentarsi come aggregati o microcolonie adese ad altri materiali, come ad esempio scaglie di pelle di mammiferi.

Le endotossine batteriche sono lipopolisaccaridi specifici della parete cellulare dei batteri gram-negativi. Le endotossine sono sostanze resistenti e stabili e mantengono la loro attività biologica anche dopo la cessazione della vitalità delle cellule batteriche.

I funghi sono microorganismi onnipresenti nell'ambiente e sono i maggiori responsabili del decadimento aerobico dei materiali organici naturali. Il termine muffa si riferisce alla forma visibile della crescita dei funghi sulle superfici. I funghi possono essere unicellulari, come i lieviti, ma normalmente sono multicellulari e formano lunghe catene di cellule chiamate ife, le quali nel complesso vengono dette micelio. I funghi sono classificati in gruppi diversi sulla base del metodo con cui producono le loro spore. La sporulazione costituisce il modo primario di disseminazione ambientale per questi microorganismi e le loro spore hanno caratteristiche atte al trasporto aereo. Le loro dimensioni, comprese tra 0,5 e 50 µm, consentono il trasporto a lunga distanza. Generalmente sono molto resistenti agli stress ambientali. Molte specie di funghi sono saprofiti, cioè utilizzano e crescono su ogni substrato organico non vivente, a condizione che sia presente un grado adeguato di umidità. Molte specie di funghi possono causare reazioni allergiche e malattie come asma, riniti e pneumoniti (3).

Gli aerosol presenti nell'aria esterna di molte zone del mondo contengono normalmente un numero limitato di specie fungine, come *Cladosporium*, *Alternaria*, basidiospore ed ascospore, con qualche variazione geografica. Nella zone soggette a

variazioni stagionali, la spore fungine sono più numerose in estate e autunno e meno durante l'inverno. Negli ambienti interni (uffici, residenze ecc.) l'aria esterna può costituire una sorgente importante di spore fungine.

I virus differiscono da altri microorganismi, in quanto si riproducono solo all'interno di cellule ospiti. Di conseguenza non crescono mai su substrati non viventi. I virus possono infettare batteri, piante, animali o umani. Tra tutte le specie di microorganismi essi presentano le dimensioni più piccole, 0,02-0,3 μm . I virus possono essere trasmessi attraverso l'aria, anche in assenza di cellule ospiti, e viaggiano nell'aria trasportate ad esempio dalle goccioline prodotte dalle secrezioni respiratorie (3). Le dimensioni di queste particelle sono influenzate da molti fattori, inclusa l'umidità relativa.

I grani di polline sono prodotti dalle piante al fine di trasmettere il materiale genetico maschile alla struttura floreale femminile. Molte piante producono pollini che sono adatti alla dispersione aerea. Questi tipi di pollini sono resistenti agli stress dell'ambiente e del campionamento. Le dimensioni dei grani di polline varia tra 10 e 100 μm , e generalmente sono comprese tra 25 e 50 μm . Diversi tipi di polline contengono sostanze allergogene. Nell'Europa del nord, ad esempio, il più importante polline allergogeno è quello della betulla.

Oltre a questi tipi principali di bioaerosol, possono essere aerodispersi altri tipi di particelle di origine biologica, spesso dotate di attività allergica, costituiti da cellule algali, escrementi di acari (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*), frammenti di materiali originati da artropodi e da mammiferi o uccelli. Nella Tabella 1 vengono riportate le dimensioni medie delle principali particelle di bioaerosol.

Considerazioni generali sul campionamento. Lo scopo del campionamento di bioaerosol è il più delle volte orientato alla verifica e alla quantificazione della loro presenza, per la valutazione dell'esposizione, o per identificare la loro sorgente e mettere in atto le misure di contenimento necessarie. Le relazioni dose-risposta biologica non sono ancora ben conosciute, per cui non sono state stabilite linee-guida

Tabella 1. Dimensioni dei principali tipi di bioaerosol

Tipo	Dimensioni medie prevalenti (μm)
Virus	0,02 - 0,3
Batteri	0,5 - 30
Endospore	0,5 - 3
Funghi	0,5 - 50
Pollini	25 - 50 (10 - 100)*

* Valori minimo e massimo

che indichino livelli di esposizione accettabili ai fini sanitari. L'unico riferimento disponibile attualmente si trova in una pubblicazione dell'Organizzazione mondiale della Sanità (4), nella quale vengono accreditati determinati valori-guida, relativi ai livelli di concentrazione di specifiche specie di funghi, raccomandati dal governo canadese per gli ambienti interni (fino a 150 UFC/m³ in presenza di più specie; ≤ 50 UFC/m³ in presenza di una sola specie; ≤ 500 UFC/m³ se le specie prevalenti sono *Cladosporium* o altri funghi filloplani).

Le concentrazioni di bioaerosol presentano variazioni temporali di diversi ordini di grandezza. Concentrazioni dell'ordine di 10¹-10³ UFC/m³ sono state rilevate in residenze ed ambienti lavorativi con sorgenti moderate e concentrazioni più modeste, dell'ordine di circa 10² UFC/m³ in ambienti ben ventilati, in assenza di sorgenti importanti (5). Livelli più alti con punte di concentrazione da 10⁴ a 10¹⁰ UFC/m³ sono stati riscontrati in specifici ambienti di lavoro o in abitazioni o uffici seriamente contaminati (6, 7, 8). In molte di queste situazioni le concentrazioni variano considerevolmente nello spazio e nel tempo, e ciò è dovuto in parte anche al fatto che le sorgenti non generano bioaerosol in modo continuo. L'attuale mancanza di criteri e metodi di prova standardizzati per la valutazione dei campionatori di bioaerosols ha determinato finora a scelte arbitrarie di sistemi di campionamento, di metodi di riferimento, di procedure analitiche, di tempi e volumi di aria di campionamento, e di condizioni in laboratorio e sul campo. L'adozione di protocolli standardizzati per il campionamento e l'analisi dei bioaerosols avvantaggerebbe gli operatori, fornendo loro una base uniforme per il confronto dei risultati ottenuti nelle diverse indagini ambientali, pur tenendo conto che non esiste, comunque, un unico metodo di campionamento ed analisi applicabile in ogni situazione. Verso il conseguimento di questi obiettivi è rivolta l'iniziativa del Comitato Europeo di Normalizzazione (CEN), il quale ha preparato uno standard denominato "Metodi di analisi e misurazione dell'aerobiocontaminazione nelle aree a rischio" (9). Questo standard si applica a quasi tutti i più importanti ambienti lavorativi potenzialmente interessati dall'aerobiocontaminazione e stabilisce i criteri riguardanti, la strategia e le tecniche di campionamento, nonché l'impostazione delle corrette condizioni di analisi.

L'iniziativa del CEN/TC 243, tuttavia, dovrà essere armonizzata con i principi generali per il campionamento delle particelle aerodisperse preparato nell'ambito dello stesso CEN, ma dal comitato tecnico (TC) 137 (valutazione dell'esposizione negli ambienti di lavoro). Lo sviluppo di criteri di riferimento per la valutazione delle prestazioni dei campionatori può essere affrontato seguendo diversi approcci come il confronto con un campionatore di riferimento, oppure con le curve convenzionali di campionamento elaborate e concordate dal CEN-ISO-ACGIH e adottate nel 1994 dall'UNI (10). Dal punto di vista delle potenziali correlazioni tra misura dell'esposizione ed effetti sanitari, quest'ultimo approccio è preferibile, in quanto le curve sono basate sulle frazioni di particelle di rilievo sanitario, che si depositano nelle diverse regioni dell'organo respiratorio. Le prove necessarie dovrebbero essere realizzate sia in laboratorio, dotato di attrezzature adeguate, sia sul campo, in ambienti rappresentativi delle condizioni reali, interni ed esterni. Infine, occorre considerare che il campionamento di tipo personale per la misura dell'esposizione riveste una

particolare rilevanza al fine di comprendere l'eventuale relazione dose-risposta. Anche se finora non sono stati molto utilizzati, diversi tipi di campionatori commerciali risultano adatti a questo scopo ed, inoltre, consentono l'applicazione di tecniche analitiche non basate sulla coltura dei microorganismi.

L'efficienza di campionamento. L'efficienza complessiva di campionamento di uno strumento campionario per bioaerosol può essere suddivisa in tre componenti (11):

Efficienza dell'apertura d'ingresso. È funzione della capacità posseduta dall'apertura d'ingresso del campionario di estrarre le particelle dall'aria dell'ambiente circostante, senza alterazione delle loro caratteristiche dimensionali, morfologiche, o di comportamento aerodinamico.

Efficienza di raccolta o di trasmissione. È determinata dalla capacità del campionario di rimuovere le particelle dal flusso di aria e di depositarle sul o nel mezzo di raccolta.

Efficienza biologica di campionamento. È funzione della capacità di mantenere inalterate vitalità e/o attività biologica delle particelle durante il processo di campionamento e di provvedere condizioni adatte allo sviluppo di colonie o ad altro tipo di determinazioni.

I parametri fisici e biologici che regolano l'efficienza di campionamento dovrebbero essere valutati separatamente per quantificare i loro effetti. Ad oggi sono disponibili solo pochi dati riguardo all'estensione con cui questi parametri influenzano il campionamento.

Gli specifici aspetti teorici sui quali è basata la valutazione dell'efficienza (Punto 1), peraltro comuni al campionamento degli aerosol fisici (12, 13), sono stati trattati in dettaglio da Grinshpun *et al.* (14). L'efficienza di raccolta o di trasmissione (Punto 2) è stata analizzata facendo riferimento al concetto di "distanza (aerodinamica) di arresto" (*stopping distance*) (15). Ad oggi non esistono ancora modelli teorici per la determinazione degli aspetti biologici (Punto 3). Attualmente nessuno dei vari campionatori disponibili può essere considerato come sistema di riferimento, malgrado l'impinger su liquido in vetro (AGI-30) e l'impattore a sei stadi, tipo Andersen, siano stati suggeriti per questo scopo (16). Solo alcuni dei campionatori per bioaerosol in commercio sono stati caratterizzati riguardo alla determinazione della loro efficienza fisica di campionamento (14, 16). Diversi studi comparativi effettuati sul campo o in laboratorio (13, 17, 18, 19) hanno riportato risultati che sono confrontabili con difficoltà, a causa dei tempi e dei volumi di campionamento variabili, dei diversi principi operativi degli strumenti, della variabilità delle condizioni ambientali e dei sistemi di coltura utilizzati. Da un punto di vista generale, tuttavia, da parte di alcuni campionatori è stata evidenziata una tendenza ad operare con maggiore efficienza di altri.

Il processo di campionamento. Il campionamento dei bioaerosol comporta la separazione della traiettoria delle particelle dalla traiettoria delle linee di flusso dell'aria. A questo fine vengono sfruttati diversi tipi di forze (13). In particolare l'inerzia delle particelle induce il loro impatto su superfici solide o semisolide, in genere un mezzo di coltura o una superficie adesiva (11).

Questo principio viene applicato agli impattori a cascata, ad uno, due o più stadi (ad es. Andersen e SAS equipaggiati con piastre di coltura) e ai campionatori a fessura (Burkard, Casella, Mattson-Garvin, tutti dotati di piastre di coltura). Il principio di separazione per mezzo della forza centrifuga si basa egualmente sul comportamento inerziale delle particelle, ma segue una geometria radiale (ad es. il campionatore RCS). Nel caso della filtrazione il sistema di separazione dal flusso di aria si basa sempre su forze inerziali, ma contemporaneamente su altri meccanismi, come l'intercettazione, la diffusione e l'attrazione elettrostatica. L'impatto su di un liquido è un altro metodo che sfrutta le forze d'inerzia per raccogliere le particelle, ma si avvale anche della diffusione attraverso le bolle di aria. In commercio esistono diverse versioni di impingers su liquido (ad es. AGI-4 e AGI-30). Infine, oltre ad altri sistemi di separazione delle particelle dal flusso di aria basati sull'applicazione di forze esterne, quali forze elettrostatiche e termiche, sono stati usati metodi di campionamento che usano le forze gravitazionali per la raccolta (piastre di coltura per sedimentazione). Tali sistemi, tuttavia, sono molto dipendenti dalle dimensioni delle particelle e sono fortemente influenzati dai movimenti dell'aria.

Impatto inerziale. L'impatto inerziale è il meccanismo più largamente utilizzato per la raccolta delle particelle nei campionatori di bioaerosol. Il processo d'impatto dipende dalle proprietà inerziali delle particelle, quali le dimensioni, la densità, e la velocità, nonché dai parametri fisici dell'impattore, come le dimensioni dell'apertura d'ingresso e le linee di flusso dell'aria al suo interno. Per ogni linea di flusso esiste una determinata distanza d'arresto per cui tutte le particelle più grandi di un certo diametro, d , vengono raccolte (impattano). S_{50} rappresenta la distanza di arresto per la quale il 50% delle particelle viene raccolto e il 50% passa attraverso la superficie d'impatto. Egualmente il "diametro di taglio" (*cutoff size*), d_{50} , indica il diametro delle particelle per cui si ha il 50% di raccolta. Poiché molti degli stadi degli impattori hanno caratteristiche curve di taglio molto impennate, quasi tutte le particelle con dimensioni maggiori di quella di taglio vengono raccolte. Per questo motivo il d_{50} viene considerato come il diametro al di sopra del quale tutte le particelle più larghe di esso vengono raccolte. Questo diametro è una importante caratteristica di ogni campionatore per bioaerosol basato sul principio dell'impatto (11). Occorre tenere presente che durante il processo di campionamento sono possibili delle perdite dovute a deposizione sulle pareti e, ancor più, a rimbalzi sulla superficie d'impatto o su altre particelle già raccolte. Il fenomeno del rimbalzo può influenzare la distribuzione granulometrica prevista per lo strumento, specialmente per le particelle più grandi. Benché il problema non sia stato del tutto chiarito, è pratica comune applicare un sottile film di grasso alle

superfici per ridurre tale effetto. Nel caso di superfici d'impatto costituite da terreni di coltura, tale fenomeno può considerarsi notevolmente ridotto.

Il d_{50} è conosciuto solo nel caso di pochi strumenti. Per la sua valutazione numerica si può utilizzare la seguente equazione (20):

$$d_{50} = \sqrt{9 \eta W Stk_{50} / \rho_p U_0 C_c} \propto \sqrt{Stk_{50}} \quad (1)$$

$$\propto \sqrt{Stk'_{50}} \propto \sqrt{S_{50}}$$

dove:

η = viscosità dell'aria

ρ_p = densità particelle di bioaerosol

W = dimensioni dell'apertura d'ingresso

U_0 = velocità dell'aria entrante

Stk_{50} = numero di Stokes per il *cut off* del 50%

C_c = fattore di Cunningham

Stk'_{50} = numero di Stokes per il *cut off* del 50%

S_{50} = distanza d'arresto al *cut off* del 50% modificato

Stima della dimensione di taglio

Le caratteristiche costruttive e di funzionamento di cinque tipi di campionatori per bioaerosol comunemente utilizzati vengono raffrontate nella Tabella 2. I campionatori differiscono per la portata, Q , che varia tra 10 e 180 l/min ed hanno uno o più stadi di impatto. Per l'impattore Andersen a sei stadi, il primo ed il sesto stadio sono stati considerati come un singolo stadio.

La S_{50} e il d_{50} per questi campionatori sono stati calcolati per mezzo dell'equazione (1) e assumendo per la viscosità dell'aria $\eta = 1,81 \times 10^{-5}$ Pas (20°C, 1 atm), e una densità delle particelle di bioaerosol approssimativa pari a $\rho_p = 1,0$ g/cm³. Il diametro aerodinamico per particelle biologiche con densità vicina all'unità e morfologia quasi sferica è approssimativamente uguale al diametro fisico.

I valori di taglio calcolati sulla base dei dati approssimativi riportati in Tabella 2, sono un poco inferiori a quelli riportati in letteratura. I d_{50} calcolati per i vari tipi di campionatori, o per i diversi stadi di essi, risultano compresi tra meno di 0,5 μ m ed oltre 6 μ m. Di conseguenza solo il campionatore con la più piccola dimensione di taglio può raccogliere i virus di maggiori dimensioni, a meno che i virus non siano trasportati da particelle più grandi. In questo caso, ogni campionatore con un d_{50} inferiore alla dimensione della particella risulta capace di catturarla. Le differenze tra le dimensioni di

Tabella 2. Parametri di campionamento e valori di taglio calcolati e pubblicati per alcuni campionatori di bioaerosol^a

Campione	Mezzo di raccolta	Q^b (l/min)	U_0 (m/s)	Forma	W (mm)	L^c (mm)	A^d (mm ²)	n^e	S_{50} (mm)	$d_{50}(\mu\text{m})$	
										Calc.	Pubb.
AGI-30	Liquido	12,5	265,2	Circol	1,00		0,79	1	0,125	0,31	
AND -I	Nutriente	28,3	1,08	Circol	1,18		1,09	400	0,148	6,61	7,0 ^f
AND-6	Nutriente	28,3	24,02	Circol	0,25		0,05	400	0,031	0,57	0,65 ^g
BURK	Adesivo	10,0	11,90	Rettan	1,00	14	14	1	0,25	2,52	
SAS	Nutriente	180,0	17,34	Circol	1,00		0,79	219	0,125	1,45	1,9 ^h
MK-II	Nutriente	30,0	51,42	Rettan	0,35	28	9,8	1	0,087	0,67	

a: AND-I e AND-6 = Impattore Andersen ad uno e sei stadi, AGI = All-Glass Impinger, BURK = Burkard Personal Sampler, SAS = Surface Air System Sampler, MK-II = Casella Airborne Bacteria Sampler.

b: Portata di campionamento.

c: Lunghezza dell'apertura d'ingresso.

d: Area dell'apertura d'ingresso.

e: Numero di fori nell'apertura d'ingresso.

f, g: Andersen (22).

h: Lach (23).

taglio dei vari campionatori possono, almeno in parte, spiegare le differenze tra le loro prestazioni. Le distanze di arresto e le dimensioni di taglio possono essere calcolate anche per altri campionatori inerziali, benché in taluni casi ciò sia difficile. Ad esempio, in un campionatore che usa il movimento centrifugo, i parametri lineari d'impatto suddetti non possono essere applicati nello stesso modo al movimento centrifugo d'impatto, poiché la distanza d'arresto aumenta all'approssimarsi della particella alle pareti. Macher e First (21), ad es. hanno riportato un d_{50} sperimentale per il campionatore RCS pari a 3,8 μm .

Filtrazione

La raccolta di particelle da un aerosol non biologico viene comunemente effettuata per filtrazione.

I mezzi filtranti usati sono disponibili sia con struttura fibrosa (ad es. in fibra di vetro), che con struttura a membrana. La deposizione avviene quando, le particelle impattano e vengono intercettate dalle fibre o dalla superficie a membrana dei filtri. In

tal modo anche particelle con dimensioni inferiori alle dimensioni dei pori possono essere raccolte efficientemente. L'efficienza di rimozione delle particelle dall'aria da parte di un filtro dipende dalla velocità facciale (cioè la velocità dell'aria nella sezione trasversale all'ingresso del campionatore contenente il filtro). Per particelle $< 1 \mu\text{m}$, l'efficienza globale decresce con l'aumento della velocità facciale. Per le particelle approssimativamente maggiori di $1 \mu\text{m}$ l'efficienza di campionamento del filtro è $> 99\%$ e raggiunge il 100% per le particelle più grandi dei pori dei filtri a membrana. I filtri a membrana vengono costruiti in una grande varietà di porosità e con diversi materiali polimerici come la cellulosa, il cloruro di polivinile, o il policarbonato. La scelta del mezzo filtrante dipende dal tipo di contaminante di interesse e dai requisiti della tecnica analitica. Per le analisi microscopiche vengono usate abitualmente le membrane in esteri di cellulosa e in policarbonato. La tecnica di filtrazione è usata per la raccolta di funghi e di batteri formanti endospore che resistono all'essiccamento. Generalmente i microorganismi campionati vengono dilavati dalla superficie della membrana e il liquido di lavaggio può essere posto direttamente, o dopo opportune diluizioni, in coltura in un mezzo appropriato, oppure rifiltrato al fine di ridistribuire più uniformemente i microorganismi sulla membrana. In questo caso vengono usate delle tecniche di colorazione per l'esame microscopico (24). Il filtro a membrana con il campione può essere posto direttamente sul mezzo di coltura in una piastra di Petri per consentire la formazione di colonie. L'applicazione di questi metodi si avvale del criterio della flessibilità nell'affrontare il problema associato ad imprevedibili livelli di spore (ad esempio fungine), consentendo un conteggio più rappresentativo delle spore. La tecnica della diluizione, tuttavia, presenta la limitazione determinata dal fatto che essa favorisce la crescita delle popolazioni di funghi predominanti a spese di quelle più rare.

Impatto su liquido (impingement)

Possono essere considerati un tipo speciale di impattori. Essi sono utilizzati per la raccolta di bioaerosol colturabili. Ad esempio il tipo AGI-30 opera con un liquido costituito da una soluzione tampone in acqua (fosfato 0.3 mM). Vengono spesso usati additivi, come proteine, antischiuma, i quali aiutano a prevenire la perdita di liquido di raccolta e minimizzano i danni alle cellule batteriche. La portata di lavoro dell'AGI-30 è di 12.5 L/min , mentre il d_{50} è stato stimato pari a circa $0.3 \mu\text{m}$. La forma dell'ingresso di questo campionatore è ricurva, in modo tale da simulare la deposizione delle particelle attraverso i passaggi nasali (2). Questa caratteristica è vantaggiosa per lo studio dei bioaerosol infettivi, in quanto nel liquido si raccolgono i microorganismi respirabili, mentre nel tubo d'ingresso si depositano quelli non respirabili. Nel caso in cui interessi la raccolta dei microorganismi aerodispersi totali, il tubo ricurvo viene lavato con una quantità nota di liquido di raccolta. Il liquido di campionamento ed il liquido di lavaggio possono essere diluiti e successivamente inoculati, oppure dei volumi noti filtrati su membrana da $0,45 \text{ mm}$, la quale viene poi posta su piastra di coltura con appropriato mezzo (25).

Tempo ottimale di campionamento. Una parte essenziale della strategia di campionamento è costituita dalla scelta del tempo di campionamento per ogni campione. I livelli di concentrazione di bioaerosol possono variare di vari ordini di grandezza nel tempo e le concentrazioni ambientali raramente restano stabili in un intervallo ristretto, a meno che il periodo di tempo non sia molto breve, ad es. minuti, oppure l'atmosfera non resti calma, come avviene in una stanza non ventilata e non abitata. Il campionamento durante periodi di fluttuazione delle concentrazioni deve essere sufficientemente lungo, oppure deve essere effettuato tramite la combinazione di vari campionamenti brevi, perché sia rappresentativo della concentrazione ambientale media. Oltre a ciò il tempo di campionamento influenza anche le successive fasi analitiche, in quanto il conteggio o l'identificazione del numero di colonie o delle specie, raccolte su una capsula o su una superficie adesiva, viene facilitato quando si abbia una adatta densità superficiale di particelle. Densità troppo basse o troppo alte possono indurre errori nei risultati, sia di ordine statistico, che biologico dovuto agli effetti di crescita sovrapposta o inibizioni dei microorganismi raccolti. Tutti questi fattori sono correlati con il tempo di campionamento. Poiché le concentrazioni ambientali e la portata di campionamento non sono controllabili da parte dell'operatore, il modo abituale per minimizzare i problemi di poca rappresentatività o di sovraccarico dei campioni è costituito dal controllo del tempo di campionamento. Un campione ideale è il risultato diretto del raggiungimento di una densità superficiale ottimale per un determinato sistema di campionamento. Il tempo di campionamento ottimale può essere calcolato per ogni campionatore, assumendo un valore desiderabile di densità superficiale e un certo ordine di grandezza della concentrazione attesa di bioaerosol, e cioè:

$$t = \delta A / c_a Q \quad (2)$$

dove δ rappresenta la densità superficiale delle particelle conteggiabili sulla superficie di raccolta, A è l'area della superficie di campionamento (o di raccolta), la quale viene definita diversamente per i vari campionatori. c_a è la concentrazione media ambientale attesa e Q è la portata di campionamento. Nella Tabella 3 vengono riportati i tempi ottimali di campionamento calcolati dalla (2) per diversi tipi di campionatori di bioaerosol utilizzati comunemente. Il tempo ottimale di campionamento per una data concentrazione ambientale sarà diverso per ogni tipo di campionatore, conformemente alla sua specifica portata e all'area della superficie di raccolta. Caso per caso l'operatore competente deve valutare la situazione, scegliendo, in funzione di essa, il tipo di strumento più adatto e spesso la via del compromesso tra le esigenze di rappresentatività del campione e quelle di assicurare condizioni analitiche accettabili. Gli ambienti ed i relativi livelli di concentrazione possono variare in modo considerevole, fino a vari ordini di grandezza. I risultati ottenuti possono allora variare in funzione della procedura di campionamento utilizzata. Benché i vari sistemi di campionamento abbiano la possibilità di impostare diverse portate e diversi tipi di superfici di raccolta e di densità ottimali di particelle, non ci si possono aspettare prestazioni comparabili ed

Tabella 3. Tempi ottimali di campionamento per diversi campionatori di bioaerosol in commercio

Campionatore	Portata di campionamento (l/min)	Tempo di campionamento (min)	Note
<u>A fessura su agar^a</u>			
piastra 100 mm	30	2,6	Alcuni tipi hanno differenti velocità di rotazione
piastra 150 mm	700	0,3	
<u>Impattori^a</u>			
SAS	180	0,14	
AND-6	28,3	17,7	
AND-I (N6)	28,3	3,0	
<u>Centrifughi^b</u>			
RCS	40,0	0,5-8	Impatto su striscia plastica
<u>A fessura^c</u>			
superficie immobile	10	140	Conta diretta microscopio
superficie mobile	10-28,3	1 h-7 giorni	
<u>Impinger</u>			
AGI-4	12,5	1-30	Possibilità di diluizioni in serie
AGI-30	12,5	1-30	
<u>Filtri</u>			
cassetta 37 mm	1-2	5-60	Adatti per bioaerosol resistenti

a: Il tempo ottimale è calcolato per $\delta = 1$ colonia / cm² e $c_a = 1000$ particelle / m³.

b: Tempo di campionamento prestabilito.

c: Il tempo ottimale è calcolato per $\delta = 104$ particelle / cm² e $c_a = 1000$ particelle / m³.

uniformi, anche da uno stesso strumento, in condizioni o in ambienti inadatti ad uno specifico tipo di campione.

Linee guida per campionamento e analisi. Ancora non esistono metodologie standardizzate per la determinazione dei bioaerosol e neppure linee guida specifiche condivise dalla comunità scientifica. Tuttavia attualmente sono disponibili diversi documenti tecnici pubblicati da enti o da sperimentatori autorevoli. Pur non essendo definitivi, ma in continua evoluzione, questi documenti possono costituire un utile

riferimento da prendere in considerazione per intraprendere l'attività di monitoraggio dei bioaerosol. Tra questi riferimenti si possono citare:

- Methods of analyzing and measuring aerobiocontamination in areas at risk*, sviluppato nell'ambito del CEN (9).
- Sampling and characterization of bioaerosols*, pubblicato nel Manual of Analytical Methods del NIOSH (26).
- Biological Particles in Indoor Environments*, preparato dalla Commissione europea (5).
- Bioaerosol samplers-Evaluation of bioaerosol sampler performance*, pubblicato nella rivista dell'ACGIH nel 1997 (1).

Bibliografia

1. WOEBKENBERG, M.L. MACHER, E.J. Bioaerosol samplers-Evaluation of bioaerosol sampler performance (Instrument Performance Criteria). *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 1997, 12 (11): 723-736.
2. COX, C.S. *The Aerobiological Pathway of Microorganisms*. Chichester, Wiley, 1987.
3. BONADONNA, L., MARCONI, A. *Stato attuale ed orientamento degli studi e delle ricerche sulla contaminazione biologica dell'aria degli ambienti chiusi (indoor)*. Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti Istisan 90/14), 1990, 38 p.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Regional Office for Europe. *Indoor Air Quality: Biological Contaminants*. European Series No. 31, Copenhagen: WHO Regional Publications, 1990.
5. EUROPEAN COLLABORATIVE ACTION (ECA)- Indoor Air quality and Its Impact on Man. *Biological Particles in Indoor Environments*. Luxen. bourg; Commission of the European Communities, (Report n° 12, EUR 14988 EN), 1993. p. 88.
6. LACEY, J., CROOK, B. Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *Ann. Occup. Hyg.* 1988, 32: 515-533.
7. KOTIMAA, M. Occupational exposure to spores in the handling of wood chips. *Grana.* 1990, 29: 153-156.
8. EDUARD, W., LACEY, J., KARLSSON, K., PALMGREN, U., STROM, G., BLOMQUIST, G. Evaluation of methods for enumerating microorganisms in filter samples from highly contaminated occupational environments. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1990, 51: 427-436.
9. COMITATO EUROPEO PER LA STANDARDIZZAZIONE (CEN) *Methods of analyzing and measuring aerobiocontamination in areas at risk*. "Cleanroom technology - Microbiological contamination", 1997, CEN/TC 243/WG 2 N 52E. 1994.
10. ENTE ITALIANO DI UNIFICAZIONE (UNI). *Definizione delle frazioni granulometriche per la misurazione delle particelle aerodisperse*, Norma Europea: EN 481, Ottobre 1994. UNI.
11. MARCONI, A. Il campionamento delle particelle aerodisperse di origine biologica (bioaerosol): principi teorici. In: *I Documenti 6, Le Collane della Fondazione Salvatore Maugeri*. G. Bartolucci, D. Cottica, M. Imbriani (Ed.). Pavia, 1996, pp.20-29.
12. VINCENT, J.H. *Aerosol Sampling-Science and Practice*. Chichester, Wiley, 1989.

13. NEVALAINEN, A., WILLEKE, K., LIEBHABER, F., PASTUSZKA, J., BURGE, H., HENNINGSON, E. Bioaerosol Sampling. In: *Aerosol Measurement, Principles, Techniques and Applications*. K. Willeke, P. Baron (Ed.). New York, Van Nostrand Reinhold, 1993.
14. GRINSHUPUN, S.A., CHANG, C.W, NEVALAINEN, A., WILLEKE, K. Inlet characteristics of bioaerosol samplers. *J. Aerosol Sci.* 1994, 25 (8): 1503-1522.
15. NEVALAINEN, A., PASTUSZKA, J., LIEBHABER, F., WILLEKE, K. Performance of bioaerosol samplers: collection characteristics and sampler design considerations. *Atmos. Environ.* 1992, 26A (4): 531-540.
16. UPTON, S.L., MARK, D., DOUGLASS, E.J., HALL, D.J., GRIFFITHS, D. A wind tunnel evaluation of the physical sampling efficiencies of three bioaerosol samplers. *J. Aerosol Sci.* 1994, 25(8): 1493-1501.
17. JENSEN, P.A., TODD, W.F., DAVIS, G.N., SCARPINO, P.V. Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosol of free bacteria. *Am Ind. Hyg. Assoc. J.* 1992, 53(10): 660-667.
18. BONADONNA, L., MARCONI, A. A comparison of two air samplers for recovery of indoor bioaerosols. *Aerobiologia.* 1994, 10 (2): 153-156.
19. JENSEN, P.A. Evaluation of standard and modified sampling heads for the international PBI Surface Air System bioaerosol samplers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1995, 56: 272-279.
20. WILLEKE, K., MCFETERS, J.J. The influence of flow entry and collecting surface on the impaction efficiency of inertial impactors. *J. Colloid Interface Sci.* 1975, 53: 121-127.
21. MACHER, J.M., FIRST, M.W. Reuter centrifugal air sampler. Measurement of effective air flow rate and collection efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983, 45: 1960-1962.
22. ANDERSEN, A.A. New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles. *J. Bacteriol.* 1958, 76: 471-484.
23. LACH, V. Performance of the surface air system air samplers. *J. Hosp. Inf.* 1985, 6: 102-107.
24. PALMGREN, U., STROM, G., BLOMQUIST, G., MALMBERG, P. Collection of airborne micro-organisms on nuclepore filters, estimation and analysis - CANMEA method. *J. Appl. Bacteriol.* 1986, 61: 401-406.
25. GREENBERG, A.E., CLESCERI, L.S. *Standard methods for the examination of water and waste water*. 18th edition, Eaton (Ed.). Washington: American Public Health Association, 1992, p. 9-39.
26. JENSEN, P., SCHAFER, M.P. Sampling and Characterization of Bioaerosols. *NIOSH Manual of Analytical Methods*, 15/5/1996. NIOSH (Ed.), 1996. p. 80-113.

RICERCA DI COLIFAGI IN ACQUE REFLUE, AEROSOL E FANGHI IN UN IMPIANTO DI DEPURAZIONE E IN ACQUE DI LAGO

Livio Marossi

Laboratorio di Microbiologia e Biotecnologie, Sas. Treviolo (BG)

La ricerca di coliformi fecali, è stata ed è tuttora il parametro per eccellenza per monitorare la contaminazione di origine fecale sia nelle acque reflue, che negli aerosol prodotti negli impianti di depurazione. Si è riscontrato che numerosi virus umani sopravvivono più a lungo rispetto agli usuali indicatori batterici di contaminazione fecale. Visto che a tutt'oggi metodiche semplici e di rapida applicazione sull'isolamento di virus enteropatogeni non sono ancora state preparate, vengono ricercati indicatori virali di facile isolamento.

A tale scopo ci si è indirizzati all'isolamento di virus batterici (batteriofagi).

Lavori di diversi autori, hanno evidenziato che i colifagi sono senz'altro gli indicatori ideali per ipotizzare una possibile contaminazione da virus enteropatogeni.

Qui di seguito sono riportati i risultati di alcuni studi nell'ambito dei quali sono stati ricercati i colifagi in vari ambienti e materiali (1, 2).

Tabella 1. Colifagi e virus rilevati in campioni di liquami e di aria prelevati presso impianti di depurazione di liquami di origine domestica (1)

IMPIANTO	VIRUS ENTERICI UFP /L	VIRUS ENTERICI MPN /MC	COLIFAGI (C3000) UFP/L	COLIFAGI (C3000) MPN /MC	COLIFAGI (K12HfrD) UFP /L	COLIFAGI (K12HfrD) MPN /MC
	Liquame	Aria	Liquame	Aria	Liquame	Aria
1	70	0	$5,9 \times 10^4$	0,26	$2,1 \times 10^5$	0,017
2	56	0	$3,9 \times 10^4$	0,11	$1,5 \times 10^4$	0
3	n.d.	0	$7,4 \times 10^4$	0,51	$4,2 \times 10^5$	0,39
4	110	0	$8,1 \times 10^5$	0,29	$5,8 \times 10^5$	0,38
5	180	0	$8,8 \times 10^5$	0,19	$4,6 \times 10^5$	0,14

UFP= Unità Formante Placca MPN= Most Probable Number mc= metro cubo

Tabella 2. Colifagi, coliformi fecali e virus enterici in campioni di liquami (2)

CAMPIONE	COLIFAGI N/ML	COLIFORMI FECALI N/ML	VIRUS ENTERICI UFP/L
1	150	$5,6 \times 10^5$	35
2	140	$4,3 \times 10^5$	26
3	1150	$1,6 \times 10^5$	43
4	100	$5,9 \times 10^4$	32
5	750	$6,7 \times 10^4$	86
6	930	$7,9 \times 10^4$	35
7	140	$9,8 \times 10^4$	69

UFP= Unità Formante Placca

Nei lavori citati si cerca di trovare una correlazione tra la presenza di virus e quella dei colifagi.

Il primo grosso problema che viene evidenziato è la scelta di un ceppo di *Escherichia coli* ideale che dia il massimo recupero di colifagi nel campione analizzato.

Dopo aver valutato alcune tecniche di isolamento di colifagi (3) e scelto il ceppo di *Escherichia coli* sensibile sia a fagi DNA che RNA, è iniziata una indagine mirata all'isolamento di colifagi in diversi ambienti come: depuratori (acque, fanghi e aerosol) e acque di superficie.

Materiali e metodi

Preliminarmente sono state validate e standardizzate le metodiche di estrazione dei colifagi da alcuni materiali considerando anche i tempi di contatto, Ciò al fine di scegliere la soluzione eluente ed i tempi ottimali per la estrazione, in modo da avere il recupero ottimale dei microrganismi ricercati. I risultati ottenuti sono espressi nelle Tabelle 3 e 4.

Per i tempi di contatto è stata utilizzata, come inoculo di colifagi, acqua di ingresso di un depuratore e, in tempi successivi, sono state effettuate le enumerazioni dei fagi. Come si nota nella Tabella 3 non si ottiene replicazione di colifagi sino a 120 minuti.

Tale indicazione ci ha portato a standardizzare nei successivi lavori i tempi di contatto in 40 minuti.

Tabella 3. Valutazione del tempo di contatto per l'infezione dei fagi nei ceppi fago-sensibili *E. coli* 8113 e *Salmonella* WG4

ESCHERICHIA COLI 8113		SALMONELLA WG49	
Tempo	UFP/ml	Tempo	UFP/ml
0'	390	0'	9
20'	380	20'	10
40'	350	40'	4
60'	360	60'	9
120'	maggiore di 1 log	120'	maggiore di 1 log
180'	maggiore di 1 log	180'	maggiore di 1 log
210'	maggiore di 1 log	210'	maggiore di 1 log

Per verificare la tecnica ideale di recupero dei colifagi in materiali solidi come i fanghi si è confrontata la tecnica di estrazione in brodo di carne 3% a pH 9 riportata da vari autori contro una semplice estrazione in acqua (4). I risultati in Tabella 5 mostrano che effettivamente l'estrazione con brodo a pH 9 ha una resa superiore rispetto a quella per la quale si utilizza l'acqua. Inoltre sempre in Tabella 5 si mostrano dei risultati da cui si rileva che il fango ha capacità sequestranti di colifagi e quindi i risultati ottenuti dai fanghi saranno sempre in difetto.

La procedura eseguita è qui di seguito descritta.

Il giorno prima del campionamento si inocula una brodocultura di *E. coli* con una

Tabella 4. Test di recupero di colifagi effettuato utilizzando fango da vasca di ossidazione

CAMPIONI TRATTATI CON:	COLIFAGI RECUPERATI UFP/ML
Campione (1) + brodo pH 9	4400
Campione (2) + acqua	2000
Campione (3)+ fagi tit. noto.	2160000
Campione Acqua (4)+ fago tit. noto.	4600000

UFP= Unità Formante Placca

placca di colifago e si mette a incubare a 36°C per produrre una lisi totale.

Si preparano 4 tubi da centrifuga, contenenti:

- n° 1: 45 ml di estratto di carne 3% pH 9 e 2 ml di cloroformio;
- n° 2: 45 ml di acqua sterile e 2 ml di cloroformio;
- n° 3 e n° 4: 0,5 ml di fago-coltura (10^9 UFP/ml).

Al momento del prelievo, presso il depuratore, si aggiungono 5 ml di fango di ossidazione nei tubi n°1 e n° 2, 45 ml di fango nel n°3, 45 ml di acqua nel n°4. Si agita bene e si porta tutto in laboratorio. Entro 30 min. dal campionamento si aggiungono 2 ml di cloroformio nei tubi n°3 e n° 4. Si riporta a pH 7 il contenuto del tubo n°1. I tubi vengono centrifugati e il sovrnatante fatto evaporare. Si procede, quindi, all'analisi come al punto b (riportato di seguito) ed utilizzando solo *Escherichia coli*.

Per il conteggio tenere presente che i campioni 1 e 2 sono già diluiti 1/10.

Determinazione dei fagi nelle acque di scarico

Tutti i campionamenti effettuati sono prelievi medi giornalieri delle acque in entrata e in uscita dal depuratore di Bergamo.

• Preparazione del campione

10 ml di ogni campione vengono posti in un provettone da centrifuga e trattati con 0,5 ml di cloroformio. Si centrifuga per 10 minuti a 7000-8000 rpm, si elimina il cloroformio e si lascia evaporare a 56°C il sovrinatante.

• Saggio

Ad 1 ml del campione così trattato o delle sue diluizioni decimali vengono aggiunti:

- 8 ml di acqua demineralizzata sterile;
- 0,1 ml di soluzione acquosa di CaCl_2 (13%);
- 0,5 ml di una brodocoltura di 24 ore di *Escherichia coli* 8113 oppure di *Salmonella* WG 49 sensibile ai fagi RNA.

Dopo agitazione su vortex si mettono le provette a incubare a 36°C per 20 minuti. Trascorso questo tempo si versa il contenuto di ogni provetta in una piastra di Petri di 9 cm di diametro, contemporaneamente a 9 ml di PAC (Phage Agar Concentrate: estratto di carne 14 g/l, estratto di lievito 4 g/l, NaCl 4 g/l, peptone 12 g/l, Na_2CO_3 1 g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l, agar 12g/l) mantenuto liquido a 45°C.

Le piastre sono agitate per permettere il mescolamento dei vari componenti e successivamente sono poste non capovolte ad incubare a 36°C per 18 ore. Le placche di lisi sono enumerate sulla piastra corrispondente alla diluizione più opportuna.

I risultati di alcuni saggi sono riportati nella Tabella 8.

Tabella 5. Colifagi e fagi RNA nelle acque di ingresso e di uscita di un depuratore di liquami domestici

DATA	INGRESSO	USCITA	INGRESSO	USCITA
	Colifagi UFP/mL	Colifagi UFP/mL	Fagi RNA UFP/mL	Fagi RNA UFP/mL
14/10/91	380	24	29	0
23/10/91	540	26	5	3
30/10/91	910	19	2	0
06/11/91	590	20	1	0
08/11/91	960	160	28	3
13/11/91	364	23	4	1

UFP: Unità Formanti Placca

Determinazione dei fagi negli aerosol nei pressi delle griglie del depuratore

Utilizzando come campionatore un S.A.S. (Surface Air System), P.B.I, sono stati convogliati 2 mc d'aria sulla superficie di una piastra di Petri di 6 cm di diametro, contenente agar nutritivo.

Dalla capsula Petri, portata in laboratorio, si stacca sterilmente l'agar nutritivo e lo si mette in un sacchetto per Stomacher (Labblender 400, P. 13.1.) aggiungendo 10 ml di estratto di carne al 3% a pH 9. Una volta ottenuta la omogeneizzazione dell'agar, si porta la miscela ottenuta a pH 7 e si aggiunge qualche goccia di cloroformio, agitando il tutto. Tutte queste operazioni vanno effettuate entro 90 minuti dal campionamento.

Si lascia decantare, si preleva 1 mL del sovrantante in doppio, si lascia svaporare a 56°C e si procede come per la conta nelle acque.

Le Tabelle 6 e 7 riportano i risultati di alcuni dei saggi eseguiti. I risultati di altri saggi eseguiti su acque di superficie poste in vicinanza degli scarichi di depuratori sono riportati nelle Tabelle 8 e 9.

Tabella 6. *Colifagi ed altri parametri microbiologici rilevati in aerosol prelevati da zone diverse localizzate nell'ambito di un depuratore di liquami domestici*

ZONA	MICROORGANISMI	QUANTITÀ/MC
Griglie	Coliformi fecali	66 UFC/mc
	Carica totale a 22°C	2166 UFC/mc
	Colifagi	122 UFP/mc
Guardia idraulica	Coliformi fecali	0 UFC/mc
	Carica totale a 22°C	2333 UFC/mc
	Colifagi	0 UFC/mc

UFC: Unità Formanti Colonia

UFP: Unità formanti Placca

Tabella 7. Rilevazione di colifagi (fagi), coliformi fecali (CF) e conta batterica totale a 22°C (CBT) in aerosol campionati in zone particolari di un depuratore di liquami domestici

ZONE	DATA	CBT 22°C N/MC	CF N/MC	FAGI UFP/MC
Griglie	19-12-91	2160	66	122
Guardia idraulica	19-12-91	2333	10	0
Uscita dissabbiatori	10-01-92	984	0	0
Griglie	20-01-92	3600	264	0
Ponte acque ingresso	20-01-92	1032	0	0
Griglie	27-01-92	2000	0	20
Centrifughe	27-01-92	6000	128	n.d.
Griglie	04-02-92	984	182	5
Dissabbiatori	04-02-92	1296	152	10
Griglie	11-02-92	720	112	n.d.
Centrifughe	11-02-92	>10000	1120	n.d.
Centrifughe	19-02-92	>10000	272	115
Griglie	19-02-92	3400	88	15

UFP: Unità Formanti Placca

n.d.: non determinato

Tabella 8. Conte batteriche (CBT), coliformi totali (CT) e fecali (CF), streptococchi fecali (SF), colifagi, Salmonelle e clostridi solfito riduttori in campioni di acque prelevate in diverse zone del lago di Iseo (BG)

MICROORGANISMI	USCITA DEPURATORE	SETTORE B LAGO	SETTORE C LAGO
CBT 22°C/ml	9400000	36000	24000
CBT 36°C/ml	4200000	13000	18000
CT/100ml	2300000	12000	5300
CF/100ml	300000	4200	1700
SF/100 ml	5000	400	30
Clostridi/100ml	1600	8	90
Salmonelle/L	assenti	assenti	assenti
Colifagi /10 litri	4000000	5500	1750

Tabella 9. Conte batteriche (CBT), coliformi totali (CT) e fecali (CF), streptococchi fecali (SF), colifagi, salmonelle e clostridi solfito riduttori in campioni di acque prelevate in diverse zone del lago Al Piano (CO)

MICROORGANISMI	USCITA DEPURATORE	SETTORE B LAGO	SETTORE C LAGO
CBT 22°C/ml	200000	1500	13400
CBT 36°C/ml	88000	1500	3100
CT/100ml	600	420	170
CF/100ml	180	30	100
SF/100 ml	19	5	21
Clostridi/100ml	26	14	8
Salmonelle/litro	assenti	assenti	assenti
Colifagi UFP/10 litri	250	25	250

Conclusioni

Data la semplicità delle metodiche e la rapidità della risposta analitica, si può senz'altro proporre la ricerca di colifagi come un ulteriore parametro di contaminazione fecale (5, 6). Fino a quando non saranno disponibili metodologie rapide e di largo utilizzo, senz'altro la ricerca dei colifagi potrà indicarci un sospetto di contaminazione da virus enteropatogeni.

Bibliografia

1. FANNIN, K.E., SPENDLOVE, J.C. Airborne coliphages from Wastewater Treatment facilities. *Applied and Environmental Microbiology* 1976, 5: 705-710.
2. FUNDERBURG, W., SORBER, C.A. Coliphages as indicators of enteric viruses in activated sludge. *Water Res.* 1985, 19: 547.
3. BONADONNA, L., LIBERTI, R., VOLTERRA, L. Metodologie di indagine per la ricerca dei batteriofagi in campioni ambientali. *Rivista Ordine Biologi* 1989, 19(9): 491.
4. SAFFERMAN, R., ROHR, M.E.. Assessment of recovery efficiency of beef extract reagent of concentrating virus from municipal wastewater sludge solids by the organic flocculation procedure. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988, 54 (2): 309.
5. FANNIN, K.E, GANNON, J.J. Field studies on coliphages and coliforms as indicators of airborne animal viral contamination from wastewater treatment facilities. *Water Res.* 1977, 11:188.
6. BRENNER, K.E, SCARPINO, E. Animal virus, coliphages, and bacteria in aerosols and wastewater at spray irrigation site. *Applied and Environmental Microbiology* 1988, 54 (2): 409.

METODOLOGIE DI CAMPIONAMENTO DELLE ACQUE ED ALTRE MATRICI

Franco Leoncini

ABIAN – Associazione Biologi Italiani Alimenti Nutrizione. Milano

Introduzione

Il convegno discute e prende in esame problemi riguardanti diversi tipi di acque e, a nostro avviso, qualsiasi studio o ricerca in questo campo è, comunque, sempre legata ad un procedimento di controllo e di indagine analitica o processuale, vincolata ad una procedura di campionamento o prelievo di campioni su cui operare.

È noto a tutti come il "sistema acqua" sia complesso in considerazione sia delle sue varie tipologie, sia delle numerose interazioni che coinvolgono non solo l'uomo, ma anche il regno minerale, vegetale ed animale:

non possiamo neppure trascurare che i sette decimi della superficie della Terra è occupata da oceani e mari e che l'Italia, per la sua posizione geografica, vive sul mare e del mare. Non ci si può disinteressare dello stato di tutte le acque a cominciare dalla prima operazione di controllo qual è il campionamento.

Il campionamento, in linea generale, costituisce la prima operazione di ogni procedimento analitico e può condizionare i risultati delle fasi successive.

Contrariamente a quanto potrebbe sembrare, il campionamento delle acque è un'operazione delicata e ricca di numerosi problemi da affrontare caso per caso.

È quindi, facile dedurre quanto diventi importante e di grande interesse la pratica, l'esperienza e la competenza nel prelievo dei campioni.

Questo argomento costituisce, ancora oggi, un problema difficoltoso, incerto, suscettibile di continui sviluppi e trasformazioni per cui, qualsiasi soluzione non può essere accettata a priori senza un preventivo esame approfondito del caso da esaminare.

Il fenomeno dell'inquinamento ha aggravato il problema delle fonti di approvvigionamento, accrescendo le difficoltà analitiche per il controllo delle acque, costringendo non solo chimici e biologi e gli addetti ai lavori, ma anche il legislatore a ricorrere e ad imporre tecniche di indagine più sofisticate e, più complesse per giungere ad un'adeguata verifica dei limiti dei parametri considerati.

La caratterizzazione delle acque, in funzione delle diverse utilizzazioni cui vengono sottoposte, ha determinato la necessità di una normazione dei metodi analitici per il loro controllo, al fine di evitare diversi linguaggi e, quindi, diverse interpretazioni per uno stesso argomento.

L'UNICHIM (Associazione per l'unificazione nel settore dell'industria chimica-federata all'UNI) ha recepito queste esperienze di normazione e, fin dal 1972, ha istituito la "Commissione purezza delle acque" comprendente cinque sottocommissioni che si riferiscono a:

Metodi chimico/fisici

Metodi radiometrici

Metodi microbiologici

Metodi biologici

Metodi di campionamento.

Quest'ultima sottocommissione, ha proceduto alla definizione ed alla stampa di manuali.

Inoltre l'UNICHIM, per sua vocazione è impegnata nel campo della normazione anche a livello internazionale e di elaborare metodi analitici in armonia con le norme UNI ISO e le adegua a quelle della Comunità Europea.

Numerosi tecnici, che fanno parte delle cinque sottocommissioni, partecipano alle commissioni dell'IRSA CNR di Roma, la quale è preposta, secondo quanto è riportato in calce alla Tabella A e C della Legge 319/76, all'emissione e all'aggiornamento dei metodi di campionamento ed analisi per il controllo delle acque (1).

Descrittiva

Una descrizione sintetica e concisa del "sistema acqua" viene presentata nell'Allegato 1 (1): dal sistema a blocchi si può dedurre il ciclo dell'acqua, bene inquadrato secondo un criterio metodologico adatto per mettere in pratica il problema campionamento.

L'obiettivo dell'operazione campionamento è quello di fornire il maggior numero di informazioni sulla qualità dell'acqua del corpo idrico in esame. Il corpo idrico è inserito nel proprio contesto geografico, topografico, geologico, idrogeologico, meteorologico, urbanistico, industriale e agricolo: in sintesi nel proprio bacino imbrifero.

Dal quadro complessivo deve poi chiaramente risultare lo stato del sistema e la sua possibile destinazione d'uso. Nell'ambito del disposto legislativo (legge 319/76 con modifiche ed integrazioni e Leggi per la tutela delle acque dall'inquinamento) viene proposta un'impostazione modellistica di un'entità geografica, il bacino imbrifero, come strumento di unificazione delle metodologie e delle tecniche di campionamento delle acque interne.

Campionamento acque di scarico

Nel caso di acque di scarico è necessario tenere presente le considerazioni in merito al campionamento secondo quanto prescritto dalla Legge n.319 del 10/05/1976 nelle Tabelle A e C allegate e nelle relative annotazioni.

La Legge n°319 prescrive che: "le determinazioni analitiche devono essere effettuate su un campione medio prelevato in un intervallo di tempo minimo di 3 ore", tuttavia l'arco di tempo di prelievo ed il numero di campioni potrà essere stabilito ragionevolmente dal prelevatore in funzione delle caratteristiche del caso in esame, partendo dal tempo minimo fissato dalla Legge.

Per quanto concerne l'ubicazione del punto di campionamento la legge prevede che il "campionamento, la misurazione degli scarichi si intendano effettuati subito a monte del punto di immissione nei corpi idrici ricettori di cui all'art. 1 (lettera a)".

Campionamento acque destinate al consumo umano

- Un discorso particolare va fatto per le acque destinate al consumo umano, cioè:
- acque fornite agli utenti mediante acquedotto od altro sistema di distribuzione;
 - acque immagazzinate, distribuite in bottiglie od altri recipienti;
 - acque di falda, sorgive, di pozzo e/o superficiali direttamente ottenute dagli utenti.

Il campionamento di dette acque va eseguito al fine di controllare i requisiti di potabilità secondo quanto previsto dalla normativa vigente oppure la corrispondenza alla composizione dichiarata o richiesta (DPR 236/88 con modifiche ed integrazioni).

In questo caso il campione deve essere prelevato, trattato confezionato e spedito in modo tale che venga preservato sempre da modificazioni dei suoi componenti chimici, microbiologici (in particolare) e delle caratteristiche da valutare.

Fattori che regolano il campionamento

Un quadro sinottico e rappresentativo dei fattori e degli elementi più salienti che regolano il campionamento delle acque viene presentato in Allegato 2 (1).

In considerazione di quanto già trattato, in relazione alla composizione del "sistema acqua" (Allegato 1) siamo in grado di poter individuare una serie di problemi che governano e influenzano il campionamento delle acque dei vari corpi idrici.

Scopo ed obiettivi del campionamento

È utile ed opportuno stabilire un piano generale fissato sui seguenti principi:

- tipo e caratteristiche del corpo idrico da esaminare;
- obiettivi e finalità che si intendono perseguire;
- determinazioni analitiche che si intendono effettuare;
- caratterizzazione e valutazione finale del corpo idrico in esame.

Il campionamento deve essere effettuato da personale di adeguata qualificazione e che sia stato opportunamente addestrato.

Il personale addetto al campionamento dovrebbe agire sotto la responsabilità di un esperto il quale deve essere in grado di conoscere la situazione dei vari corpi idrici in esame, nonché i processi che determinano le condizioni di formazione degli scarichi.

Tale esperto avrà, quindi, la responsabilità dell'intero procedimento analitico e delle relative conclusioni.

L'obiettivo è quello di fornire il maggior numero possibile di informazioni sulla qualità dell'acqua in esame.

Tra i diversi scopi ed obiettivi da perseguire (Allegato 3) (1) si possono indicare come più frequenti i seguenti:

- controllo dei limiti di accettabilità previsti dalle leggi e regolamenti vigenti;
- valutazione delle diverse e possibili utilizzazioni del corpo idrico in esame, quali ad esempio, l'impiego dell'acqua destinata al consumo umano ed industriale, di irrigazione in agricoltura, la balneazione, la molluschicoltura, la pesca e la navigazione;
- valutazione del contributo all'inquinamento del corpo idrico e più in generale del sistema ricettore; indirettamente controllo della efficienza degli impianti di trattamento e depurazione.

Informazioni generali, interventi e risultati pregressi dei corpi idrici possono costituire la base per banche dati cui fare riferimento e, tramite un computer (che disponga di un particolare software) cui affidare le conclusioni delle indagini successive e poter disporre in *real time* dei dati che sono necessari ad affrontare qualsiasi situazione riguardante ogni campione di esame.

Modalità operative

In riferimento a quanto previsto dalla vigente legislazione si distinguono criteri metodologici da seguire per effettuare campionamenti per:

- determinazioni fisiche, chimico-fisiche, chimiche;
- determinazioni biologiche e microbiologiche;
- determinazioni di radioattività;
- determinazione dei gas disciolti.

Le modalità operative del campionamento si possono consultare su testi specializzati quali i metodi di campionamento editi dal UNICHIM e dall'IRSA oppure dalle norme pubblicate dall'ISO e dagli Standard Methods.

Per quanto concerne i tipi di campionamento da utilizzare per i vari tipi descritti, requisito primario è sempre che il campione sia rappresentativo dell'acqua in esame, tenuto conto dell'obiettivo che si persegue e vengono definiti negli Allegati 5, 5.1, 5.2 (1).

Campione istantaneo

Si intende un campione singolo prelevato in un'unica soluzione in un punto determinato ed in un tempo molto breve. Il campionamento istantaneo si deve considerare rappresentativo limitatamente alle condizioni presenti all'atto del prelievo.

Campione medio

Si intende un campione ottenuto da un prelievo effettuato in dato intervallo di tempo in maniera continua o discontinua proporzionale o non, alla portata dei corpi idrici interessati. La scelta della durata del campionamento, della frequenza e del numero dei prelievi viene stabilita in funzione della variabilità delle caratteristiche qualitative dei corpi idrici in esame.

Campione medio-composito

Viene realizzato mescolando un numero di campioni istantanei prelevati ad opportuni intervalli di tempo, in modo proporzionale o non alla portata.

Campione medio-continuo

Viene effettuato prelevando in maniera continua e per un dato intervallo di tempo una porzione dell'affluente, proporzionale o non alla portata del medesimo.

Campione manuale

Si intende la tecnica di effettuare il prelievo del campione direttamente impiegata dal personale incaricato del prelievo stesso. Da questo tipo di campione si possono trarre informazioni fondamentali per l'impostazione e l'utilizzo dei mezzi meccanici in modo da prelevare automaticamente i campioni.

Qualora sia necessario estendere in un tempo considerevole il campionamento oppure quando è necessario anche un intervento per regolare il prelievo in funzione di certe condizioni (esempio portata) in un determinato punto di campionamento, è molto

più pratico installare un'apparecchiatura per il campionamento automatico continuo od intermittente.

Per quanto si riferisce agli altri fattori che regolano il campionamento (Allegato 6) (1) in particolare a:

- ubicazioni e punti di prelievo
- mezzi ed attrezzature
- scelta dei parametri da determinare, sono da programmare scegliere e definire in funzione delle condizioni e delle caratteristiche che riguardano ciascun tipo di acque identificato "nel sistema acqua".

Per quanto riguarda i fattori:

- volume del campione e contenitori
- precauzioni, raccolta e conservazione dei campioni sono descritte e previste nei volumi precedentemente indicati le norme e le modalità generali praticamente comuni a qualsiasi tipo di acqua. (Allegato 7) (1).

Buona prassi di laboratorio

Per quanto attiene a questo argomento sebbene non esista ancora una normativa universalmente accettata a riguardo, è prassi comune indicare che la ripetibilità, la precisione, la riproducibilità e l'accuratezza delle misure eseguite devono essere conformi alle norme UNI-EN-ISO come indicate dal quaderno 100 dell'IRSA ed in funzione della prassi indicata dagli enti di certificazione.

Conclusioni

Siamo consapevoli delle complessità e dei molteplici aspetti degli argomenti trattati: confidiamo che, quanto esposto sia risultato chiaro, facilmente e correttamente accessibile per gli addetti ai lavori.

E restiamo a disposizione di coloro che vorranno avere più ampi chiarimenti.

Bibliografia

1. CNR. *Quaderni IRSA* n° 100. 1994. Istituto di Ricerca sulle acque. Consiglio Nazionale delle Ricerche

IL TELERILEVAMENTO E LE SUE APPLICAZIONI SUL TERRITORIO

Giorgio Catena

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità. Roma

Che cos'è il Telerilevamento?

La definizione più semplice è "osservare un oggetto senza toccarlo"; nell'osservazione è però insito il concetto di misura per cui occorre usare degli apparecchi in grado di farlo (in questo senso l'occhio umano non è uno strumento di misura affidabile); può essere meglio definito come un insieme di tecniche e di apparecchiature che consente di conoscere in maniera approfondita l'ambiente e di valutarne le eventuali modificazioni verificatesi nel tempo. Si capisce quindi come oggi tenda ad essere sempre più impiegato in settori, quali ad esempio la lotta all'inquinamento (1, 2) e le indagini sulla qualità delle acque (3 - 6) ove occorre mettere in relazione il dato analitico trovato con la situazione che l'ha prodotto, anche al fine di poter intervenire ed eliminare le cause del problema.

La stessa OMS nelle linee guida sulle acque di balneazione in corso di pubblicazione, mette in evidenza l'importanza di acquisire, oltre a quelli analitici, anche dati meteorologici ed idrografici (venti, precipitazioni, correnti, maree, temperatura superficiale del mare) nonché una buona conoscenza del territorio circostante i vari punti di prelievo per valutarne l'influenza sui valori numerici ottenuti. E non basta: se nelle vicinanze dei punti di prelievo vi sono corsi d'acqua o comunque scarichi idrici, l'OMS consiglia di esaminare anche la situazione nell'entroterra, nelle zone attraversate da essi. Il discorso non vale solo per le acque dedicate alla balneazione: lo stesso si può dire nel caso dei bacini per la captazione di acqua potabile, nelle indagini sui bloom algali, nello studio dell'inquinamento delle falde acquifere, ecc.).

Di seguito vengono illustrati brevemente i principali sistemi ora in uso, le piattaforme di ripresa ed alcune delle applicazioni più comuni.

Sistemi di ripresa

Tutti gli apparecchi usati utilizzano le onde elettromagnetiche quale "ponte" tra essi e la scena investigata. È proprio l'esame delle interazioni tra onde elettromagnetiche e materia che fornisce le informazioni necessarie per conoscere l'ambiente. I vari sistemi possono essere suddivisi in:

- attivi, se emettono essi stessi un'onda elettromagnetica e ne rilevano la parte riflessa dall'oggetto, ad es. i radar ed i laser
- passivi, se rilevano la radiazione proveniente dal corpo o per riflessione di quella emessa dal sole (o da altra sorgente adatta) o perché emessa dal corpo stesso, ad es., gli scanner, le telecamere, le macchine fotografiche, i radiometri, gli spettrofotometri.

Con esclusione degli spettrofotometri, tutti gli altri apparecchi producono immagini della zona investigata che, se occorre, possono poi essere interpretate o variamente elaborate. Nel caso di apparecchiature che producono dati in forma numerica (quali, ad es., quelle montate sui satelliti), le immagini si ottengono tramite un elaboratore.

La Figura 1 mostra la parte di spettro elettromagnetico in cui operano le più comuni apparecchiature di Telerilevamento; si tenga presente che la radiazione proveniente dal corpo investigato interagisce con lo strato di atmosfera attraversato per raggiungere lo strumento di misura: il risultato può essere una attenuazione della radiazione sia per diffusione, dovute essenzialmente alla presenza di particolato, che per assorbimento da parte dei composti chimici presenti (Figura 2).

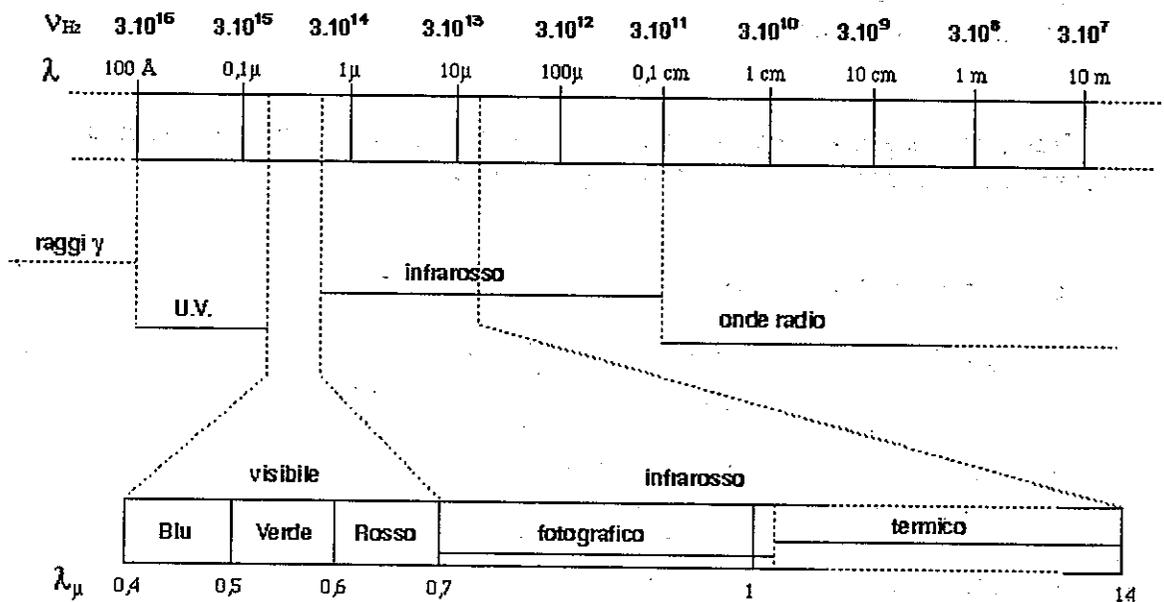


Figura 1. Lo spettro elettromagnetico

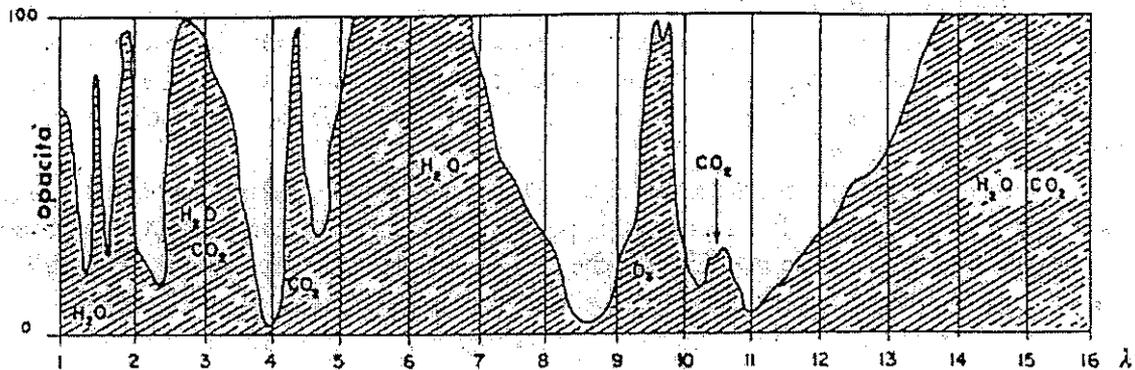


Figura 2. *L'atmosfera non è trasparente in tutto lo spettro: al di là del visibile vi sono zone dove la radiazione è variamente assorbita dai composti chimici presenti: le zone trasparenti si chiamano "finestre" (in bianco)*

Per questi motivi occorre sempre eseguire una verifica a terra, in zone campione accuratamente selezionate, per verificare la rispondenza di quanto misurato con la situazione reale (ground truth): questo consente sia di tarare il sistema che di verificare eventuali situazioni ambigue.

Vengono passati in rassegna dapprima i sistemi passivi che, oltre ad essere stati i primi ad essere introdotti, sono ancora i più utilizzati.

Apparecchiature fotografiche

La macchina fotografica, fino a pochi decenni or sono, era l'unico apparecchio di telerilevamento di cui si disponesse ed è curioso notare come già pochi anni dopo la sua invenzione venisse impiegato in tal senso; nel 1862, nel corso della guerra civile americana, il gen. McLennan, assediando Richmond, fece eseguire una ripresa delle linee sudiste da bordo di un pallone frenato; fatte fare due copie della foto, le fece suddividere in 64 quadratini e ne diede una a due osservatori che mandò a bordo dell'aerostato: essi individuavano le posizioni ed i movimenti nemici sui vari quadratini della foto e comunicavano mediante un telegrafo questo dato a terra, dove c'era la seconda fotografia e l'artiglieria, con i risultati che la storia tramanda.

È con la prima guerra mondiale che viene però universalmente riconosciuta l'utilità e la validità delle foto aeree ma solo negli anni trenta si hanno le prime applicazioni in campo civile; nel secondo dopoguerra, infine, con il grande sviluppo dell'aviazione civile leggera e con l'introduzione di pellicole apposite, questa tecnica trova definitivamente la sua consacrazione come strumento di indagine che consente rapidità di esecuzione, documentazione assolutamente obiettiva e riutilizzabile nel tempo quale termine di confronto, possibilità di studiare in breve tempo grandi

estensioni di territorio, molteplicità di informazioni ottenute con una sola missione usando varie pellicole, ecc. L'introduzione negli anni più recenti delle pellicole all'ultravioletto ed all'infrarosso (sia in bianco e nero che a colori) ha reso accessibile all'occhio umano ulteriori intervalli di lunghezza d'onda che si sono rivelati ricchi di informazioni sull'ambiente.

Radiometri

Hanno una risposta uguale in una banda particolarmente ampia sia alle lunghezze d'onda dell'infrarosso che a quelle delle microonde: i primi sono stati particolarmente utilizzati per misurare la temperatura di grandi distese d'acqua ma le misure sono ostacolate dal vapor d'acqua e ancora di più da nebbia e pioggia; i secondi vengono usati per misurare lo spessore di chiazze di petrolio in mare, per la classificazione dei ghiacci marini, per lo studio dell'uso del territorio, ecc.; così come il radar funzionano sia di giorno che di notte, con la nebbia e con la pioggia.

Sistemi televisivi

Negli ultimi anni il perfezionamento e la miniaturizzazione dei sistemi televisivi ne ha diffuso l'utilizzo anche grazie agli innegabili vantaggi di praticità e semplicità di funzionamento nonché alla possibilità di registrare informazioni o commenti direttamente sul nastro e di rivedere immediatamente quanto ripreso: hanno però gli svantaggi che non si possono confrontare tra loro le immagini e che, al momento, gli apparecchi hanno una bassa risoluzione. Consentono riprese a lunghezze d'onda dall'ultravioletto all'infrarosso.

Apparecchi a scansione

Si chiamano così perché possono esaminare punto per punto e per linee successive tutto il campo di ripresa. Possono essere dotati di uno o più elementi sensibili in differenti intervalli di lunghezze d'onda; un sistema ottico concentra la radiazione elettromagnetica sui vari sensori del sistema: in questo modo si hanno tante risposte quanti sono i sensori, anche in bande al di fuori del visibile, dall'ultravioletto all'infrarosso termico (scanner termici).

Spettrofotometri

Sono strumenti usati abitualmente in laboratorio e misurano l'assorbimento della luce da parte di una sostanza: un raggio luminoso emesso da una sorgente attraversa un campione ed un adatto rivelatore misura l'attenuazione del raggio luminoso dovuta

all'assorbimento da parte della sostanza, consentendo di risalire alla sua concentrazione. Di recente sono stati anche usati per misure di telerilevamento [determinazione dei gas presenti nell'atmosfera (Cospec e Teletec), misurazione della CO₂ nei gas di scarico delle auto durante la marcia, ecc.].

Tutti i sistemi fin qui descritti sono di tipo passivo e, ad esclusione del radiometro a microonde, sono utilizzabili solo con buone condizioni atmosferiche e di illuminazione: di seguito vengono illustrati gli strumenti di tipo attivo.

Radar ad apertura sintetica (SAR) e radar ad apertura sintetica ad esplorazione laterale (SASLAR)

Sono apparecchi che inviano una radiazione della lunghezza d'onda dell'ordine dei centimetri e registrano l'energia riflessa dagli oggetti. I due sistemi citati sono un recente perfezionamento del radar classico, detto di navigazione: l'antenna rotante di cui esso era dotato è stata sostituita da un'antenna fissa ma ci si accorse ben presto che per avere buone sensibilità occorrevano antenne molto lunghe, di difficile impiego a bordo di aerei e, a maggior ragione, di satelliti; venne pertanto introdotta l'antenna "sintetica" così detta perché ha le caratteristiche di una antenna "reale" di lunghezza maggiore: ad esempio, una antenna "sintetica" lunga 1 metro funziona come un'antenna "reale" lunga 5 metri. La stessa antenna riceve il fascio di ritorno riflesso dal bersaglio (il cosiddetto "eco") ed i dati possono essere presentati su uno schermo luminoso per la lettura immediata o registrati su nastro magnetico e successivamente elaborati. Mentre il SAR esplora la zona sottostante all'antenna, il SASLAR esplora una zona laterale lontana dalla verticale anche alcune decine di chilometri. Il radar viene oggi impiegato principalmente per localizzare le macchie di idrocarburi in mare, per studiare la qualità dei ghiacci, in geologia ed in cartografia. I principali vantaggi del sistema ad antenna sintetica sono la possibilità di riprendere vastissime zone di territorio e di funzionare giorno e notte e la scarsa influenza della visibilità e delle condizioni meteorologiche sulla resa delle immagini. Tra gli svantaggi vanno ricordati la scala piccola e la scarsa definizione delle immagini ottenute.

Laser

Questa apparecchiatura lavora nel campo delle lunghezze d'onda che vanno dall'ultravioletto all'infrarosso: le caratteristiche principali del raggio laser sono la grande direzionalità (la divergenza del fascio è di circa 10 cm al chilometro), che rende possibile il trasporto di energia elettromagnetica a grande distanza e la monocromaticità della radiazione che non trova uguali in natura. Anche questa apparecchiatura invia sul bersaglio un pennello luminoso e riceve, mediante un telescopio, la radiazione riflessa. Se poi un impulso di luce laser viene usato come il

radar si ottiene il Lidar: ambedue possono essere usati sia di giorno che di notte ma risentono della presenza delle nubi. Utilizzando un laser come un sistema a scansione, si possono ottenere delle immagini della zona investigata. Tra i suoi usi principali sono da ricordare la determinazione della profondità dei corpi idrici, l'altezza degli alberi e la stima della biomassa nelle foreste; un'altra importante applicazione è la misura della fluorescenza indotta dal laser sui vari materiali: questa proprietà è stata impiegata per individuare le macchie di idrocarburi in mare e per valutare la clorofilla presente nei corpi idrici.

Piattaforme di ripresa

Esistono vari modi di osservare a distanza; si può farlo da:

1) satellite (o navetta spaziale): consente di osservare vaste zone del pianeta ma con pochi dettagli; nel caso di immagini la scala è da piccola a media (da 1:5.000.000 a 1:25.000).

I satelliti si dicono:

- a) geostazionari se ruotano con la Terra: sono posti in orbita alla distanza di circa 36.000 chilometri; poiché mantengono fissa la loro posizione relativa al suolo, osservano sempre la stessa porzione del globo (ad es., satelliti meteorologici)
- b) eliosincroni se ruotano intorno alla Terra e ripassano su una stessa zona a distanza di vari giorni ma sempre alla stessa ora (la loro distanza dalla Terra è dell'ordine delle centinaia di chilometri)

La navetta spaziale orbita alla distanza di circa 400 chilometri; la missione ha in genere una durata limitata e fornisce soltanto riprese fotografiche.

Il satellite è utile per studiare su scala continentale:

- a) fenomeni geologici: tettonica, morfologia, orografia, idrografia, ecc.
- b) eventi naturali: eruzioni, terremoti, alluvioni, erosione costiera, fioriture algali, ecc.
- c) grandi opere: vie di comunicazione, ecc.
- d) aspetti naturalistici: distribuzione e stato della vegetazione, uso del suolo, stato del territorio, fenomeni meteorologici, analisi dei gas atmosferici, ecc.
- e) disastri: sversamenti di idrocarburi in mare, emissioni incontrollate in seguito ad incidenti, ecc.

2) aereo: consente di osservare zone di terreno più limitate a scale medio-grandi e quindi, oltre a poter seguire gli stessi fenomeni che vede il satellite ma con maggiori dettagli, permette di studiare fenomeni in rapida evoluzione su aree limitate, da regionali a locali.

3) piattaforma terrestre: le indagini vengono effettuate da posizioni naturali elevate, piattaforme mobili, palloni frenati, ecc.; consente l'esecuzione di indagini accurate (le

immagini sono di grande dettaglio) su obiettivi di ridotte dimensioni in quanto il campo abbracciato da una singola immagine è molto limitato.

Elaborazioni dell'immagine

La validità del metodo viene ulteriormente migliorata dall'impiego di processi di elaborazione e di interpretazione delle immagini ottenute: in tal modo si possono avere delle informazioni e delle correlazioni che sfuggono all'occhio umano e che sono spesso di fondamentale importanza. La differenza tra i due processi consiste principalmente nel fatto che quello di elaborazione utilizza apparecchiature elettroniche che trattano i segnali elettrici e gli insiemi numerici forniti direttamente dai sensori o nei quali, per poter eseguire le elaborazioni, sono state trasformate le informazioni contenute sui vari supporti mentre il processo di interpretazione presuppone la "lettura" delle immagini da parte di un fotointerprete esperto nel settore in esame con l'ausilio di semplici strumenti - lenti di ingrandimento o, se le foto sono state riprese in modo opportuno, stereoscopi: con questi ultimi è possibile anche evidenziare la terza dimensione di una scena ed apprezzare la differenza di altezza tra i vari oggetti presenti.

Settori d'impiego

A voler citare solo le discipline scientifiche ove il telerilevamento è ormai di uso comune o i campi principali di impiego (7-12) si ha: agricoltura, ecologia, geologia, pianificazione e catasto urbano, uso del territorio, uso del suolo, idrologia, archeologia, scienze forestali, mineralogia, ingegneria civile, industria petrolifera, studio dell'erosione costiera, ricerca ed inventario delle risorse naturali, interventi di protezione civile, ecc. Il controllo dell'ambiente e la valutazione dell'impatto ambientale sono altri impieghi peculiari ove questa tecnica ha mostrato in pieno le grandi possibilità sia nella prevenzione che nella pianificazione dell'intervento risanatore.

Apparecchi simili a quelli utilizzati da bordo dei satelliti possono essere usati da aereo o da terra: un'applicazione interessante, da terra, di uno scanner termico consiste nella valutazione della stabilità delle piante grazie alla evidenziazione di eventuali cavità presenti al loro interno (13).

Conclusioni

Dopo alcuni decenni, durante i quali l'impiego dei dati telerilevati è rimasto confinato nel mondo accademico o tra un ristretto numero di utenti specializzati che avevano dedicato la propria attività alla loro utilizzazione, si assiste alla diffusione del loro uso anche tra utenti "comuni". Questo è dovuto a varie cause: innanzitutto la

diffusa convinzione dell'utilità del loro impiego (visti buoni risultati ottenuti) e poi la comparsa di sistemi di elaborazione anche su Personal Computer, la diminuzione del costo dei dati stessi ed infine il proliferare di ditte dedicate all'elaborazione dei dati su commissione, in grado di fornire un prodotto finito secondo le necessità dell'utilizzatore finale tale che questi lo possa impiegare, con un minimo di preparazione, nell'ambito della sua solita attività. È ormai prossimo il lancio di satelliti commerciali aventi sensori ad alta risoluzione in grado di produrre immagini con una risoluzione a terra addirittura di 1 m: questo significa avere a disposizione immagini "quasi fotografiche" a costi accessibili e soprattutto con cadenze di ripresa regolari.

Oggi tutte le Regioni italiane hanno un ufficio dedicato alla cartografia ed al telerilevamento, al quale poter fare riferimento e dove è possibile trovare informazioni, dati e soprattutto, consulenze: addirittura la Regione Toscana ha creato nel 1997 il LaMMA (Laboratorio per la Meteorologia e la Modellistica Ambientale) che nei suoi intenti ricerca proprio la collaborazione dei PMP e delle altre strutture locali per fornire supporto tecnico e dati.

Se poi, qualcuno particolarmente interessato alla problematica volesse saperne di più ed entrare direttamente nel settore, oggi vi sono molte società in grado di fornire la consulenza necessaria; è possibile avere, addirittura tramite Internet, non solo le informazioni territoriali e meteorologiche desiderate ma le stesse immagini elaborate in tempo quasi reale.

Quanto detto non significa che i tecnici e/o i responsabili della gestione delle acque superficiali debbono diventare esperti di Telerilevamento: basta che al momento di pianificare le proprie indagini o di decidere, ad es., dove far situare un impianto di acquacoltura prevedano il ricorso agli esperti di telerilevamento, almeno per discutere con loro il problema.

Bibliografia

1. CATENA, G., PALLA, L. Il telerilevamento nello studio delle situazioni ambientali a rischio: nota introduttiva. *Inquinamento*. 1988, 10: 64-68.
2. PALLA, L., CATENA, G. Il telerilevamento nello studio delle situazioni ambientali a rischio: le discariche di rifiuti solidi. *Inquinamento*. 1988, 12: 40-49.
3. CATENA, G., PALLA, L. Remote sensing techniques complementary to chemical and microbiological determinations in coastal water studies. In CIESM-UNEP: *V^{es} journées d'études sur les pollutions marines en Méditerranée*, Cagliari, 9-13 ottobre 1980, p. 959-962.
4. CATENA, G., PALLA, L. Individuazione dei pennacchi dei fiumi a mare. *Porti Mare Territorio*. 1988, 1-2: 27-32.
5. CATENA, G., PALLA, L. Il telerilevamento nello studio delle situazioni ambientali a rischio. Gli stabilimenti industriali costieri: studio dei corsi d'acqua sui quali gravitano. *Inquinamento*. 1989, 10: 42-46.

6. CATENA, G., PALLA, L. Il telerilevamento nello studio delle situazioni ambientali a rischio. Gli stabilimenti industriali costieri: evidenziazione dei loro scarichi e delle macchie di idrocarburi in mare. *Inquinamento*. 1989, 11: 74-78.
7. TONELLI, A.M. *Misurare l'ambiente: introduzione al Telerilevamento*. Bologna: Zanichelli, 1979, p. 104.
8. LECHI, G.M. Le tecniche di Telerilevamento. *Bollettino della Società Italiana di Topografia e Fotogrammetria* 1984, 2: 7-47; 1985, 2: 25-53; 1985, 3-4: 17-47; 1986, 2: 25-60.
9. CURRAN, P.J. *Principles of remote sensing*. Harlow: Longman Scientific & Technica, 1985, p.282.
10. SABINS, F.F., JR. *Remote sensing, principles and interpretation*, 2nd ed. New York: Freeman & Co, 1986, p.449.
11. LILLESAND, T.M., KIEFER, R.W. *Remote sensing and image interpretation*. New York : John Wiley & Sons, 1994, p.750.
12. GOMARASCA, M. *Introduzione a Telerilevamento e Gis per la gestione delle risorse agricole e ambientali*. Milano: A.I.T., 1997, p. 246.
13. CATENA, G., PALLA, L., CATALANO, M., MAZZOLA, S. Indagine campione sullo stato del verde urbano di Roma: seconda nota. *Agricoltura Ricerca*. 1990, 105: 11-20.

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Giuseppe Benagiano*

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 2000 (n. 2) 6° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*