

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

P. ORSINI, F.A. AULICINO

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

### 1. Introduzione

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

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

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

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

## 2. Adsorbimento virale al particellato

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

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

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

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

### 2.1 Descrizione dell'adsorbimento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabella 1. Effetto dell'adsorbimento sulla sopravvivenza virale (15).

SSosp.: solidi sospesi; SS: sedimento soffice; SC: sedimento compatto;

UFP: Unità Formanti Placca

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

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

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

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

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

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

Nelle parentesi sono indicati i numeri dei campioni analizzati.

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

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

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

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

## 2.2 Adsorbimento in funzione del tipo di particolato

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TCA: Tricloroacetato di sodio.

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

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

Diversi Autori hanno applicato metodiche di trattamento di materiale particolato, che prevedevano l'utilizzo, ad esempio, di una soluzione di estratto di carne al 3% pH 7,5 con aggiunta di citrato di sodio (2M), oppure di una soluzione di estratto di carne al 3% pH 5,5 con aggiunta di nitrato di sodio (2M), oppure una soluzione di estratto di carne al 6% pH 10,5, o ancora, una soluzione tamponata di estratto di carne al 10% pH 7 con aggiunta di acido citrico e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ottenendo percentuali di recupero di particelle virali variabili dal 40 - 71% (13,19,38,39,40).

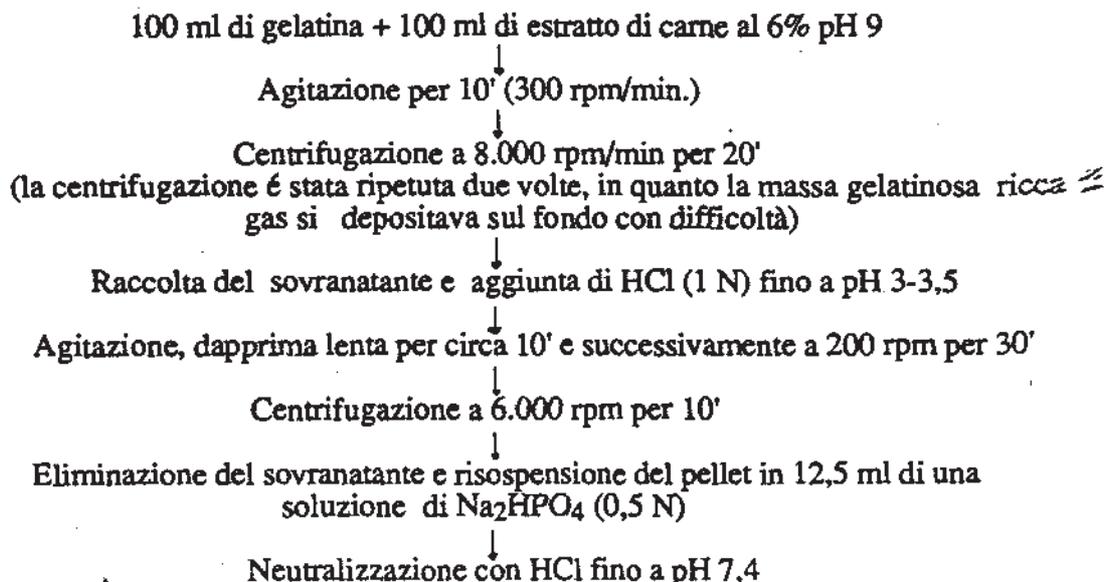
Nella fase sperimentale sono state provate nel nostro laboratorio alcune metodiche di rilevamento virale su campioni di gelatina e solidi sospesi di acque di mare.

##### 4.1 Campioni di gelatina.

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

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

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



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

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

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

↓  
Agitazione magnetica per 30'

↓  
Centrifugazione a 3.000 rpm/min per 30'

↓  
Eliminazione del pellet

↓  
Precipitazione acida sul sovrantante

↓  
Si prosegue come già descritto per la gelatina

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

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

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

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

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

#### Bibliografia

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

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

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