

SORVEGLIANZA AMBIENTALE DI POLIOVIRUS E ALTRI ENTEROVIRUS IN ALCUNE CITTÀ ITALIANE NEL 2011

Andrea Battistone (a), Gabriele Buttinelli (a), Stefano Fiore (a), Concetta Amato (a), Paolo Bonomo (a), Anna Di Lonardo (a), Maria Barbi (b), Sandro Binda (b), Laura Pellegrinelli (b), Monia Gambino (b), Maria Luisa Tanzi (c), Catia Cesari (c), Paolo Castiglia (d), Cinzia Germinario (e), Michele Labianca (e), Pietro Mercurio (f), Antonella Cicala (f), Maria Triassi (g), Francesca Pennino (g), Josef Simeoni (h), Adelheid Foppa (h), Rita Frate (i), Lucia Fiore (a)

(a) *Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione dei Prodotti Immunobiologici, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università di Milano, Milano*

(c) *Dipartimento di Salute Pubblica, Unità di Virologia, Università di Parma, Parma*

(d) *Istituto di Igiene e Medicina Preventiva, Università di Sassari, Sassari*

(e) *Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Unità di Igiene, Università di Bari, Bari*

(f) *Agenzia Municipalizzata Acquedotto di Palermo SpA, Palermo*

(g) *Università di Napoli "Federico II", Napoli*

(h) *Comprensorio Sanitario di Bolzano, Bolzano*

(i) *Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Veneto, Venezia*

Introduzione

L'Italia è un Paese libero da polio dal 1982 quando fu notificato l'ultimo caso di poliomielite causato da poliovirus selvaggio indigeno. Nel giugno 2002, l'Italia e tutta la Regione Europea dell'OMS sono state dichiarate libere da polio dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). L'Italia, per la sua particolare posizione geografica, rappresenta un Paese di passaggio per le popolazioni provenienti dall'Africa, dall'Asia e dall'Est Europa e quindi a rischio di importazione di poliovirus. I continui flussi migratori, con particolare rilevanza quelli clandestini, da aree ancora endemiche potrebbero favorire la reintroduzione nel nostro Paese di malattie come la poliomielite da noi eradicate. Gli strumenti più efficaci per monitorare la possibile reintroduzione di poliovirus vaccinali retromutati o selvaggi sono la sorveglianza delle Paralisi Flaccide Acute (PFA) e la sorveglianza ambientale. Entrambe queste attività sono ritenute valide dall'OMS perché hanno degli "indicatori di performance" e sono pertanto attendibili.

La sorveglianza attiva delle PFA in Italia è stata avviata nel 1997 e durante gli anni gli indicatori di performance sono migliorati, ma in alcune regioni i valori raggiunti non sono stati ottimali.

Nel 2005, al fine di rendere più efficiente il monitoraggio della circolazione del poliovirus in Italia, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e il Ministero della Salute hanno deciso di effettuare, come attività supplementare alla sorveglianza delle PFA, la sorveglianza ambientale, monitorando alcune grandi città con alto flusso migratorio e quindi a maggior rischio di reintroduzione di virus selvaggi o vaccinali mutati, *circulating vaccine derived polioviruses* (cVDPVs). È stato possibile effettuare la sorveglianza ambientale perché in Italia dal 2002 è stata introdotta la vaccinazione con vaccino polio inattivato di Salk. Il vaccino di Salk è infatti costituito da virus uccisi e viene iniettato per via parenterale. Dopo l'interruzione della vaccinazione con il vaccino di Sabin (*Oral Polio Vaccine*, OPV) nel nostro Paese non dovrebbero circolare virus polio vaccinali. Questo rende più facile l'individuazione nei liquami di possibili poliovirus selvaggi eventualmente importati dai Paesi ancora endemici (1).

Campionamento

Nella Tabella 1 sono riportati i campioni di liquami, raccolti nel 2011, nelle otto città partecipanti allo studio, suddivisi per i diversi collettori analizzati. I prelievi dei campioni sono stati effettuati secondo i criteri stabiliti dall'OMS (linee guida per la sorveglianza ambientale dei poliovirus) (2). I campionamenti effettuati mensilmente, con cadenza bisettimanale, sono stati da un minimo di due per i collettori più piccoli, con un bacino di utenza inferiore a 300.000 abitanti, ad un massimo di quattro per un bacino di utenza superiore a 300.000 abitanti. In totale sono stati prelevati e sottoposti ad indagini virologiche 503 campioni di acque reflue (Tabella 1).

Tabella 1. Campionamenti effettuati nelle 8 città partecipanti allo studio nel 2011 in Italia

Città	Collettore	Bacino di utenza	Campioni/ mese previsti	Campioni prelevati 2011
Milano	Nosedo	300.000	2/2	24
	Nosedo Est	300.000	2/2	24
	Peschiera	300.000	2/2	24
Parma	Parma Est	130.000	2/2	24
	Parma Ovest	160.000	2/2	24
Bolzano	Bolzano	374.000	2/2	21
	Cavarzere*	17.500	2/2	2
Venezia	Ceggia	5.000	2/2	24
	Musile	10.000	2/2	24
	Campalto	110.000	2/2	24
	Fusina	330.000	2/2	24
	S. Stino di Livenza	140.000	2/2	22
Bari	Fesca	300.000	2/2	24
	Mola	300.000	2/2	24
	Japigia	300.000	2/2	24
Palermo	Acqua dei Corsari	130.000	2/2	24
	Fondo Verde	70.000	2/2	18
	Via Diaz	70.000	1/1	0
	Jolly Hotel	70.000	1/1	10
Napoli	Cuma	1.000.000	4/4	48
	S. G. a Teduccio	700.000	2/2	24
	Napoli Est	500.000	2/2	24
Sassari	Caniggia	120.000	2/2	24
Totale				503

* L'impianto di depurazione di Cavarzere (Venezia) ha sospeso la raccolta dei campioni a febbraio 2011 ed è stato sostituito con il collettore di S. Stino di Livenza (Venezia).

Per alcune città, come Venezia e Palermo, sono stati monitorati diversi collettori sia grandi che piccoli in modo da avere un campione il più possibile rappresentativo dell'intera popolazione. I collettori più grandi, analizzati in questo studio, sono stati quelli di Napoli: Cuma con un bacino di utenza di 1.000.000 di abitanti, seguito da San Giovanni a Teduccio e Napoli Est, con 700.000 e 500.000 abitanti rispettivamente.

Gli altri collettori hanno un bacino di utenza che varia da un minimo di 5.000 (Ceggia, Venezia) ad un massimo di 374.000 (Bolzano). I punti di prelievo nelle otto città sono stati 23 per una copertura teorica di circa 5.332.500 abitanti.

Ad eccezione del collettore di Napoli-Est, che esegue un campionamento manuale, con un unico prelievo nelle ore di massimo afflusso, in tutti gli altri impianti, la raccolta dei campioni è

stata effettuata con un sistema automatizzato, che preleva aliquote di campione durante tutto l'arco della giornata. Il campionamento prevede la raccolta di 1 litro di liquame in bottiglie sterili, che deve essere conservato a -20°C, e inviato al laboratorio nazionale di referenza per la polio o al laboratorio regionale di referenza per il trattamento e per le indagini virologiche.

Trattamento dei campioni e isolamento virale

Cinquecento mL di ciascun campione sono stati sottoposti a chiarificazione mediante centrifugazione a 4°C. Il pellet è stato conservato a 4°C e il soprannatante concentrato attraverso precipitazione bifasica con due polimeri, il Destrano e il Glicole polietilenico insieme ad una soluzione di Cloruro di sodio 5N.

La miscela è stata sottoposta ad agitazione, versata in speciali imbuti e lasciata sedimentare per tutta la notte. La sedimentazione porta alla formazione di tre fasi distinte: la fase inferiore e l'interfase che vengono raccolte, unite al pellet della prima centrifugazione, e trattate due volte con cloroformio per eliminare i batteri e le muffe. Dopo agitazione e centrifugazione, il sovrannatante viene aliquotato e utilizzato per l'inoculo su linee cellulari (2).

L'isolamento di poliovirus e altri enterovirus è stato effettuato su cellule RD, una linea cellulare che deriva dal rhabdomyosarcoma umano e che ha un ampio spettro di suscettibilità per gli enterovirus, e su L20B, una linea cellulare murina, geneticamente modificata attraverso la trasfezione del recettore umano per il poliovirus, resa pertanto suscettibile all'infezione specifica dei poliovirus e rari altri enterovirus (3). L'utilizzo all'unisono di queste due linee cellulari permette l'isolamento di poliovirus e altri enterovirus non-polio sia animali che umani, ma anche di altri virus enterici, come Adenovirus, Reovirus, ecc.

Risultati

Dei 503 campioni analizzati, 260 (51,7%) sono risultati positivi per effetto citopatico (CPE) su colture cellulari. Le percentuali di positività per CPE riscontrate nelle città e nei rispettivi collettori sono risultate molto diverse attestandosi da un minimo di 16,7% (Napoli Est) ad un massimo di 87,5% (Campalto, Venezia) (Figura 1).

Secondo le linee guida dell'OMS, un criterio utile da soddisfare per valutare l'efficienza e l'attendibilità della sorveglianza ambientale è il rilevamento di enterovirus non-polio (EVNP) in almeno 30% dei campioni CPE positivi (2). Ad eccezione del depuratore di Napoli Est (Napoli), dove la percentuale di EVNP è risultata essere pari al 16,7%, in tutti gli altri collettori, la percentuale di EVNP nei campioni esaminati ha superato il valore ritenuto ottimale dall'OMS.

Il basso tasso di isolamento di EVNP, riscontrato nel collettore di Napoli Est, potrebbe essere dovuto alla presenza di inquinanti chimici di natura industriale, impropriamente sversati nei sistemi fognari civili, che potrebbero aver inattivato i virus eventualmente presenti.

Per una identificazione rapida dei virus presenti nei sovrannatanti dei 260 campioni CPE positivi è stata utilizzata una RTsn-PCR con primers specifici per enterovirus (AN88, 3'TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT5' e AN89 5'CCAGCACTGACAGCAGYNG ARAYNGG3') (4) diretti verso la regione codificante la VP1. Tutti gli isolati sono risultati positivi in PCR per enterovirus e la loro tipizzazione è stata ottenuta attraverso il sequenziamento delle regioni genomiche amplificate e confronto con le sequenze presenti nella banca dati (GenBank).

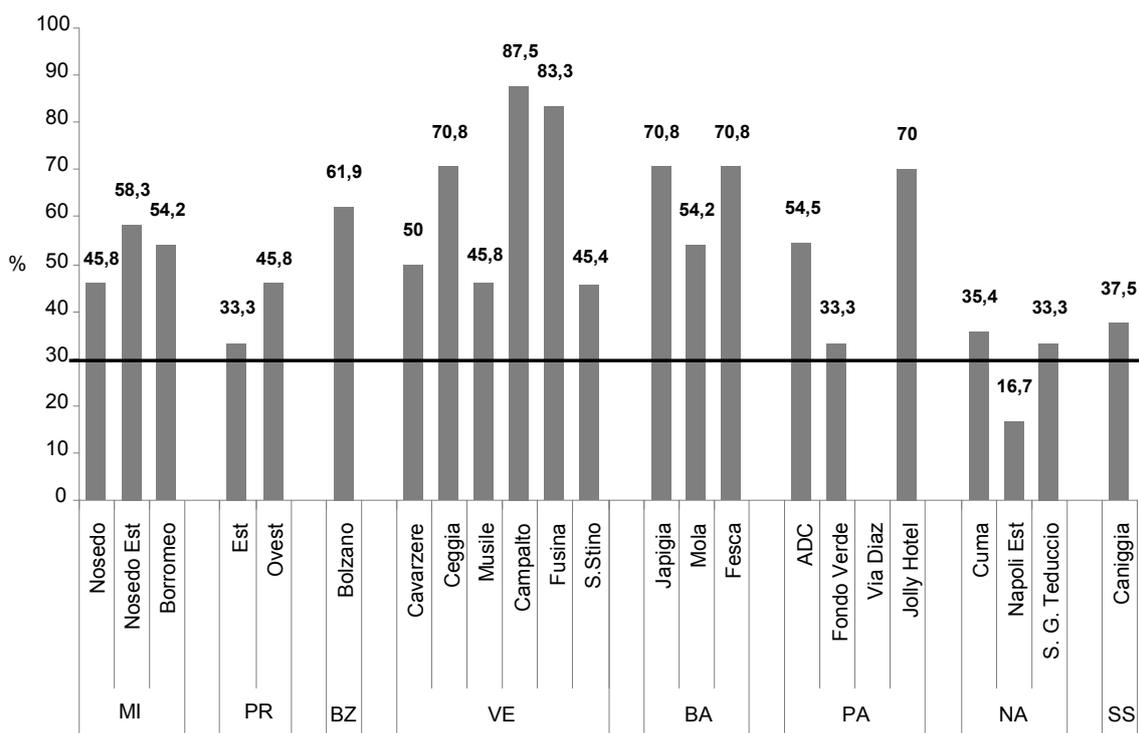


Figura 1. Percentuale di positività (CPE) dei campioni prelevati nei vari collettori delle città partecipanti allo studio nel 2011 in Italia

Dei 260 campioni esaminati, solamente uno, prelevato a Parma (O152), è risultato positivo per CPE su cellule L20B e RD. È stato, infatti, identificato un poliovirus di tipo 1, di origine vaccinale. Il poliovirus è stato sottoposto al sequenziamento parziale di quattro regioni genomiche: la 5'NCR, comune a tutti gli enterovirus, la VP1 contenente i maggiori siti antigenici, la giunzione VP1/2A e la regione polimerasica 3D. Non è stata riscontrata alcuna mutazione nelle regioni sequenziate. È importante segnalare che nel periodo di sorveglianza 2005-2010, sono stati isolati sei poliovirus da campioni provenienti da diverse città: Parma (PV3, 2005), Milano e Napoli (rispettivamente PV2 e PV3, 2007), Milano e Palermo (rispettivamente PV2 e PV3, 2008) e Venezia (PV2, 2010). Tutti questi poliovirus sono risultati essere Sabin-like alla caratterizzazione con test ELISA (RIVM) e test PCR (CDC). La sequenza nucleotidica della regione 5' non codificante (5'NCR) di questi poliovirus isolati ha messo in evidenza la presenza di mutazioni tipiche correlate con la reversione alla neurovirulenza: nucleotide 472 U> C per il polio 3 e nucleotide 481 A> G per il polio di tipo 2.

Il sequenziamento della regione genomica codificante la 3D-polimerasi, ha permesso di identificare ricombinazioni intratipiche Sabin2/Sabin1 in un ceppo PV2 isolato a Milano nel 2007 e Sabin3/Sabin2 in un ceppo PV3 identificato a Palermo nel 2008. Sono state riscontrate anche alcune mutazioni nella regione VP1. I dati di sequenza dimostrano una ridotta circolazione dei poliovirus isolati nella popolazione studiata, confermando l'efficacia dei programmi di immunizzazione contro la polio nel nostro Paese.

Nel 2011, complessivamente sono stati identificati: 100 Coxsackievirus (38,5%), 159 Echovirus (61,1%) e 1 poliovirus (0,4%) (Figura 2).

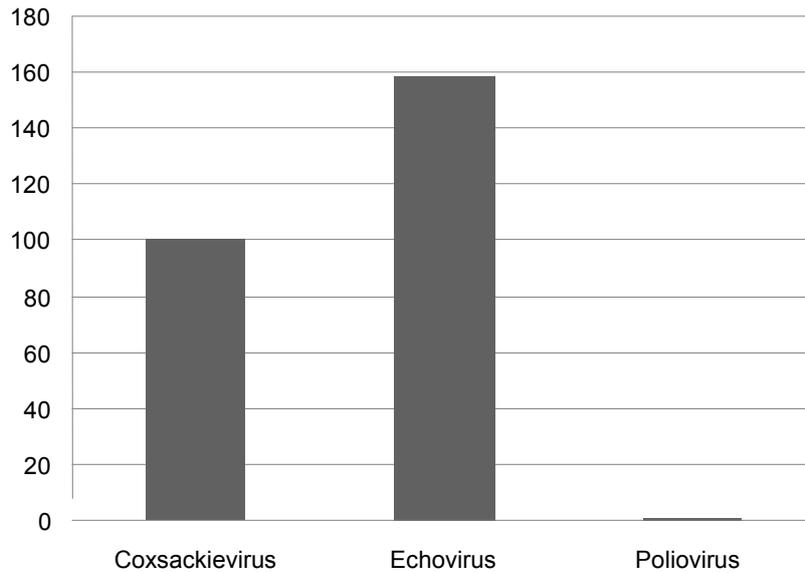


Figura 2. Tipizzazione degli enterovirus isolati in Italia nel 2011

È stata quindi effettuata la sierotipizzazione degli Echovirus e Coxsackievirus isolati. Tra i 159 Echovirus isolati sono stati identificati 12 diversi sierotipi: l'Echovirus 6 riscontrato con maggiore frequenza, 44 isolati (27,7%), seguito da 42 Echovirus 7 (26,4%), 36 Echovirus 11 (22,6%), 20 Echovirus 3 (12,6%), tutti gli altri sierotipi erano presenti in percentuali più basse (Figura 3).

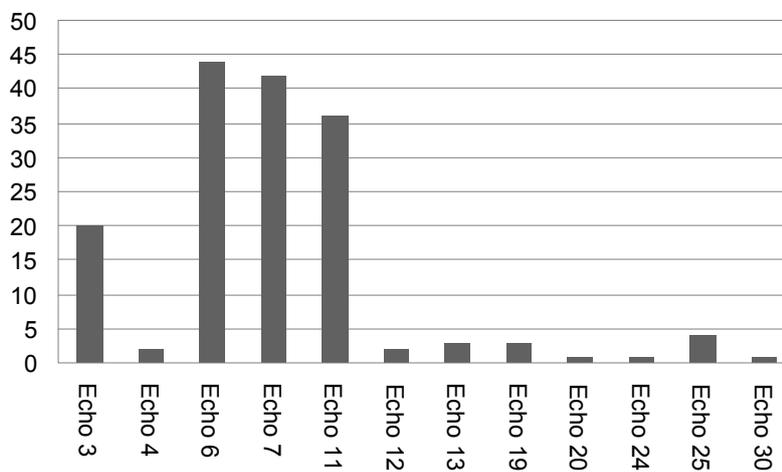


Figura 3. Sierotipi di Echovirus presenti nei campioni analizzati nel 2011

I cento Coxsackievirus isolati, sono risultati tutti appartenere al tipo B (B2-B5). Il sierotipo maggiormente riscontrato è stato il CVB 5, 58 isolati (54%), seguito da 22 CVB 2 (22%), da 10 CVB 3 e 10 CVB entrambi 4 (10%) (Figura 4).

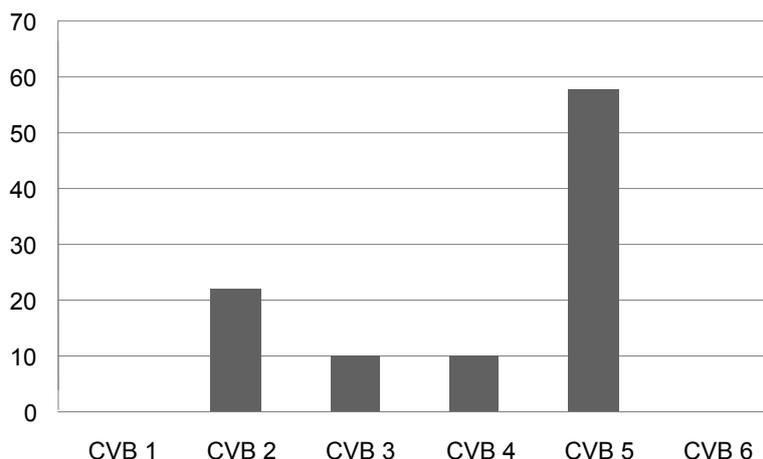


Figura 4. Sierotipi di Coxsackievirus presenti nei campioni analizzati nel 2011

Per verificare l'efficacia dei sistemi di depurazione nell'eliminazione degli enterovirus presenti nei liquami, sono stati monitorati 5 depuratori: Bolzano, Acqua dei Corsari (Palermo), Napoli Est, San Giovanni a Teduccio e Cuma (Napoli) raccogliendo campioni prima e dopo i trattamenti.

I tre depuratori di Napoli eseguono il trattamento fisico-chimico, quello di Palermo il fisico-biologico e quello di Bolzano il trattamento fisico-chimico e biologico che è il più completo.

Per i collettori con più di 300.000 abitanti, sono stati prelevati mensilmente due campioni prima del trattamento di depurazione e due dopo un ciclo completo, mentre per quelli con meno di 300.000 abitanti è stato raccolto un solo campione a monte e a valle del depuratore. Nel depuratore Acqua dei Corsari (Palermo) che ha un bacino d'utenza di 130.000 abitanti è stato prelevato un numero doppio di campioni rispetto a quelli previsti perché i responsabili erano particolarmente interessati allo studio proposto. Per i tre depuratori di Napoli il campionamento è stato regolare durante tutto l'anno, mentre per i depuratori di Bolzano e di Palermo, in alcuni mesi i campioni non sono stati raccolti per problemi logistici.

Nel collettore di Bolzano, dei 21 campioni prelevati prima del trattamento 13 (61,9%) sono risultati CPE positivi, da questi sono stati isolati 15 virus (presenza di due doppie infezioni). Il Coxsackievirus B5 è stato il virus maggiormente riscontrato (8 isolati, 53,3%) seguito dal 4 Coxsackievirus B3 (26,7%), 2 Echovirus 7 (13,3%) e 1 Echovirus 11 (6,7%). Dei 21 campioni raccolti dopo la depurazione, solo 3 (14,3%) hanno mostrato effetto citopatico su colture cellulari (RD). Sono stati isolati 2 Echovirus di tipo 7 ed un Coxsackievirus di tipo B3.

Nel collettore di Napoli Est (Napoli) sono stati prelevati 24 campioni prima dei trattamenti e solo 4 (16,7%) sono risultati positivi, con isolamento di 1 CVB 4, 2 CVB 5 e 1 Echo 6. Dei 24 campioni prelevati dopo i trattamenti, soltanto 1 ha mostrato CPE su RD con isolamento di un CVB 5.

Nel depuratore di Cuma, prima del trattamento, sono stati prelevati 48 campioni, 17 (35,4%) sono risultati positivi. I virus isolati sono stati 18 (presenza di due EV in 1 campione). Il CVB 5 è stato maggiormente riscontrato, 9 isolati, (50%) seguito dal CVB 4, 7 isolati (38,9%). Dopo depurazione, solo 3 campioni (12,5%) dei 24 prelevati sono risultati positivi con isolamento di 1 CVB 4, 1 Echo 25 e 1 Echo 7.

Nel depuratore di S. Giovanni a Teduccio, 8 (33,3%) dei 24 campioni raccolti prima del trattamento sono risultati positivi in CPE, con isolamento di 5 Echo 6 (62,5%), 2 CVB 5 (25%)

e 1 CVB 4 (12,5%). Solo 3 (12,5%) dei 24 campioni, raccolti dopo il trattamento, sono risultati positivi. Sono stati isolati 2 Echo 6 e 1 CVB 4.

Dei 22 campioni prelevati all'ingresso del collettore Acqua dei Corsari (Palermo), 12 (54,5%) sono risultati positivi in CPE su cellule RD. I virus isolati sono stati: 4 Echo 11 (33,3%), 4 CVB 4 (33,3%), 2 Echo 7 (16,8%), 1 Echo 6 (8,3%) e 1 CVB 3 (8,3%). Dei 22 campioni raccolti dopo il trattamento, solo 2 (9,1%) hanno mostrato CPE positivo. Sono stati identificati 1 Echo 6 e 1 CVB 3.

Conclusioni

Dai campioni ambientali, raccolti nelle 8 città monitorate nel 2011, non sono stati isolati poliovirus selvaggi, ma un poliovirus tipo 1, di origine vaccinale (PV1 SL), è stato riscontrato in un campione prelevato a Parma. Essendo stata introdotta nel 2002 in Italia la vaccinazione con vaccino inattivato di Salk (IPV), il poliovirus Sabin-like isolato è stato verosimilmente importato da bambini vaccinati all'estero con il vaccino Sabin (OPV) o loro contatti adulti. Questo dimostra come l'importazione di virus sia un evento sempre possibile (sia per virus vaccinali che selvaggi). L'assenza di mutazioni, nelle regioni genomiche sequenziate del poliovirus isolato, rispetto al ceppo di referenza Sabin, dimostra che il virus non ha circolato a lungo nella popolazione, confermando l'alta copertura verso la polio nel nostro Paese (5). L'alto tasso di isolamento di enterovirus non-polio (NPEV), dai campioni raccolti prima della depurazione, dimostra la larga diffusione di questi virus nella popolazione. Questi virus possono dare infezioni asintomatiche ma causare anche patologie gravi quali meningiti asettiche, encefaliti, miocarditi, pericarditi, epatiti ecc. (6-10).

Il monitoraggio dell'efficienza dei sistemi di depurazione nell'abbattere la carica virale, in particolare degli enterovirus, ha mostrato risultati buoni, ma non completi, e questo sottolinea la necessità di introdurre i parametri virologici, accanto a quelli batteriologici richiesti per legge (11) per la verifica della sicurezza microbiologica dei reflui in uscita. L'assenza di rilevamento di poliovirus dai soggetti con PFA dopo l'introduzione della vaccinazione con il vaccino inattivato di Salk nel 2002 e il ritrovamento dal 2005 di rari poliovirus vaccinali nell'ambiente, dimostra come la sorveglianza ambientale rappresenti una valida attività di supporto a quella della sorveglianza delle PFA, per la verifica del mantenimento dello status *polio free* del nostro Paese.

Bibliografia

1. Ruggeri FM, Fiore L. Vaccine preventable viral diseases and risks associated with waterborne transmission. *Ann Ist Super Sanita* 2012;48(4):460-72.
2. World Health Organization - Department of Vaccines and Biologicals. *Guidelines for environmental surveillance of Poliovirus circulation*. Geneva, World Health Organization, 2003. Disponibile all'indirizzo: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/who_v&b_03.03.pdf; ultima consultazione 9/4/2013)
3. World Health Organization. *Polio laboratory manual, and supplement to the WHO polio laboratory manual*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2004. Disponibile all'indirizzo: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_IVB_04.10.pdf; ultima consultazione 9/4/2013.
4. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2698-704.

5. Patti AM, Martini V, Calvani A, Vulcano A, Santi AL, Candelori E, Musacchio E, Semeraro V, Casagni L, Lamberti A, Battellito S, Pontesilli M. La sorveglianza della poliomielite in Italia: stato immunitario della popolazione di età 0-14 anni. *Ann Ig.* 2008;20(5):77-80.
6. Hyypiä T, Hovi T, Knowles, Nicholas J, Stanway G. Classification of Enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 1):1-11.
7. Roivainen M, Rasilainen S, Ylipaasto P, Nissinen R, Ustinov J, Bouwens L, Eizirik L, Hovi T, Otonkoski T. Mechanisms of Coxsackievirus-Induced Damage to Human Pancreatic b-Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(1):432-40.
8. Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M. Enteroviruses in water environment -a potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med* 2008;15: 199-203.
9. Van der Meulen M, Van Doornum GJ, Corel LJ, Dalinghaus M, Fraaij PL, De Hoog M. Acute myocarditis due to Coxsackie virus B3 in two infants. *Ned Tijdschr Geneesk* 2009;153: A152.
10. Rabenau HF, Richter M, Doerr HW. Hand, foot and mouth disease: seroprevalence of Coxsackie A16 and Enterovirus 71 in Germany. *Med Microbiol Immunol* 2010; 199: 45-51.
11. Italia. Decreto Ministeriale 12 giugno 2003, n.185. Regolamento recante norme tecniche per il riutilizzo delle acque reflue in attuazione dell'articolo 26, comma 2, del decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152. *Gazzetta Ufficiale* n. 169, 23 luglio 2003.