

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

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

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

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

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

Tabella 1. Virus enterici enumerati in diversi tipi di campioni

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1 Adsorbimento-eluzione

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

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

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

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

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

2.1.1 Adsorbimento a filtri microporosi

a. Filtri microporosi caricati negativamente.

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

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

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

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

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

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

b. Filtri microporosi elettropositivi.

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

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

2.1.2 Adsorbimento a polielettroliti.

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

2.1.3 Adsorbimento a flocculi di idrossido di alluminio.

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

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

2.1.4 Adsorbimento a polvere di vetro.

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

2.2 Ultrafiltrazione

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. Esperienze maturate

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

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

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

I risultati sono mostrati nella tabella 7.

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

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

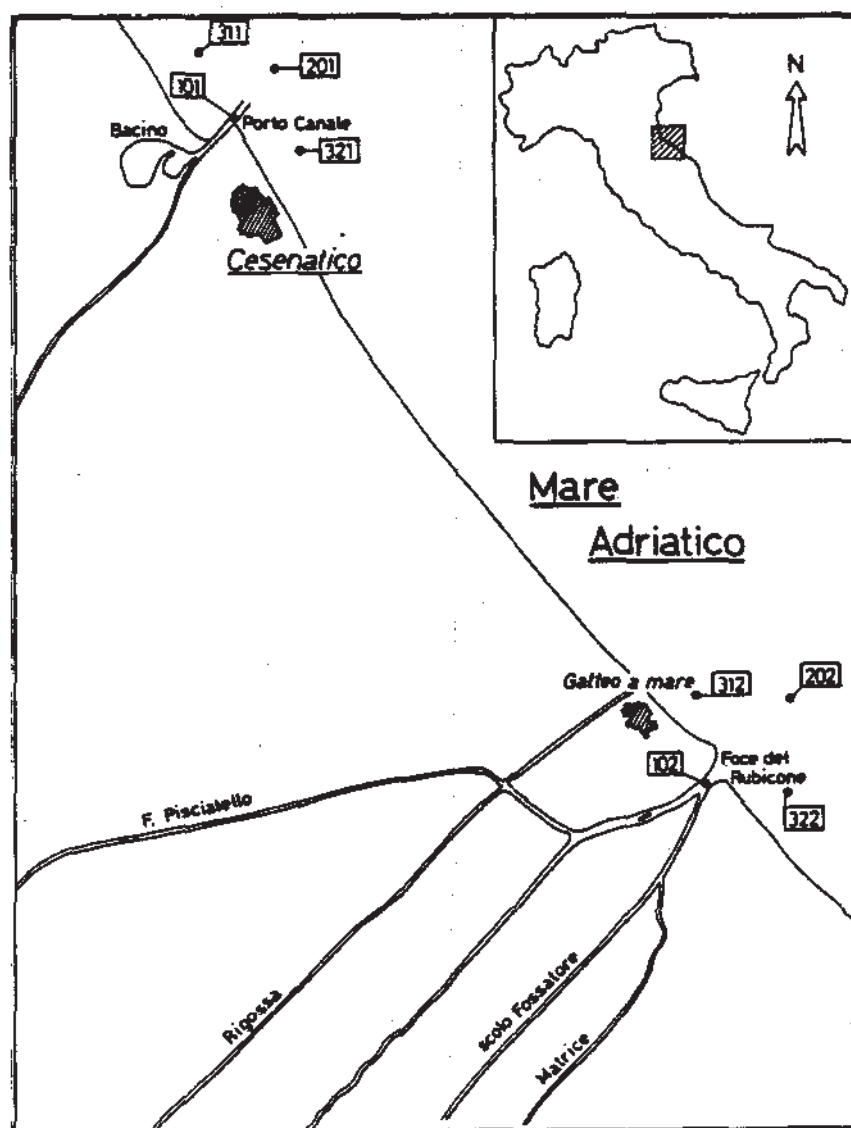


Figura 1. Stazioni di campionamento lungo una zona del litorale adriatico

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

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

* Acque estuariali ** Acque marine

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

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

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

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

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

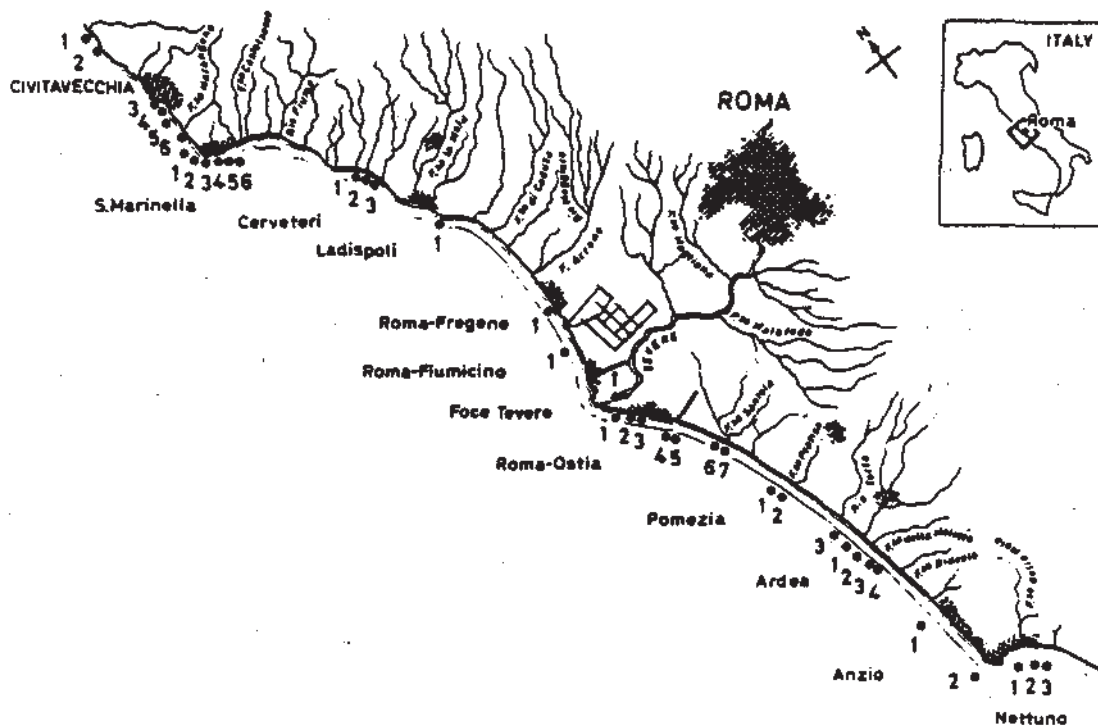


Figura 2. Stazioni di prelievo lungo la zona costiera del litorale tirrenico romano.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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