

I VIRUS NELLE POTABILI, CRITICITÀ E PROSPETTIVE

I VIRUS SONO RESPONSABILI DI UN'AMPIA GAMMA DI PATOLOGIE. I VIRUS TRASMESSI ATTRAVERSO L'ACQUA APPARTENGONO A DIVERSE FAMIGLIE, CON OLTRE 140 TIPI. IN ITALIA E IN EUROPA MANCA UN SISTEMA DI SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA DELLE MALATTIE DI ORIGINE IDRICA, ATTIVO NEGLI USA GIÀ DAL 1971. NON FACILE LA RICERCA ROUTINARIA DEI VIRUS.

La presenza di virus enterici in diverse matrici idriche rappresenta un importante problema per la sanità pubblica.

I virus sono infatti responsabili di un'ampia gamma di patologie che includono gastroenteriti, sindromi delle alte e basse vie respiratorie, congiuntiviti, epatiti, infezioni del sistema nervoso centrale (meningite asettica, encefalite), infezioni del sistema cardio-circolatorio (miocarditi), e malattie croniche (diabete mellito, sindrome da fatica cronica).

I virus enterici infettano il tratto gastrointestinale e sono trasmessi per via fecale-orale; eliminati con le feci a concentrazioni elevate, sono presenti in grande quantità nei reflui urbani.

I trattamenti convenzionali dei reflui civili sono spesso inadeguati a ridurre in modo significativo le concentrazioni virali; i patogeni possono pertanto raggiungere corpi idrici recettori e attraverso il circuito oro-fecale giungere nuovamente all'uomo, utilizzando come veicoli l'acqua e gli alimenti. Negli ultimi anni sono state documentate numerose epidemie associate al consumo di acqua potabile [1], verificatesi per inefficienza dei trattamenti negli impianti di potabilizzazione o per contaminazioni accidentali con la rete delle acque reflue, causate da patogeni virali diversi, tra cui norovirus [2, 3], adenovirus [4] e virus dell'epatite A [5].

I virus trasmessi attraverso l'acqua appartengono a diverse famiglie, con oltre 140 tipi, molti dei quali associati a epidemie idrotrasmesse; le principali, illustrate in *tabella 1*, sono rappresentate da Picornaviridae, Caliciviridae, Adenoviridae e Hepeviridae [1].

Le caratteristiche peculiari che rendono i virus enterici importanti agenti di rischio biologico ambientale includono la bassa carica infettante (10-100 unità virali), l'escrezione in grandi quantità da parte dei soggetti infetti (fino a 10^{10} particelle virali per grammo di feci) e l'elevata resistenza ambientale.

Un sistema di sorveglianza delle malattie idrodifuse

La mancanza di un sistema di sorveglianza epidemiologica delle malattie di origine idrica in Italia e in Europa impedisce di conoscere il rischio reale di patologie virali connesse al consumo di acque potabili.

Negli Usa, paese in cui è attivo fin dal 1971 un sistema di sorveglianza specifico per le patologie idrodifuse, dati degli ultimi anni indicano che i virus sono responsabili di circa il 10% delle epidemie associate ad acque potabili. L'incidenza delle patologie virali idrodifuse è molto probabilmente sottostimata per la difficoltà di associazione tra causa (il consumo di acqua) ed effetto (la malattia), dovuta al lungo tempo di incubazione e alla sintomatologia a carico di diversi organi e apparati; inoltre la ricerca dei virus nelle acque è effettuata raramente per le difficoltà legate alla rilevazione dei virus dalle matrici idriche. Per lo studio della qualità microbiologica delle acque le attuali normative prevedono l'utilizzo di indicatori batterici di contaminazione che non sono, tuttavia, in grado di fornire indicazioni sulla presenza dei virus enterici.

I batteri fecali, infatti, sono escreti in modo consistente e costante da tutti gli

individui; al contrario i virus enterici sono eliminati solo dalle persone infette per limitati periodi di tempo. Inoltre i batteri sono maggiormente sensibili dei virus ai trattamenti chimici e fisici di potabilizzazione. D'altra parte, le difficoltà tecniche insite nella rilevazione dei virus (piccole dimensioni, basse concentrazioni in ambienti idrici, estrema variabilità di concentrazione nel tempo e nello spazio) rendono problematica la ricerca routinaria [6].

I virus sono infatti inclusi nell'attuale normativa solo tra i parametri accessori, per i quali è prevista la ricerca supplementare, a giudizio dell'autorità sanitaria competente, qualora vi sia motivo di sospettare la presenza in concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana. In particolare la normativa richiede l'assenza totale di enterovirus in 100 litri di acqua. Tuttavia l'assenza di enterovirus non esclude necessariamente la presenza di altri patogeni virali; pertanto, in caso di eventi epidemici, l'analisi andrebbe indirizzata alla ricerca di uno spettro di virus enterici da individuare sulla base dei dati clinico-epidemiologici.

Le specie virali che possono essere ricercate nelle matrici idriche sono numerose e presentano caratteristiche diverse in termini di patogenicità,

Tab. 1 Principali gruppi di virus enterici che possono essere trasmessi attraverso l'acqua

Famiglia	Genere	Dimensioni (nm)	Genoma	Patologie associate
Picornaviridae	Enterovirus (Enterovirus umano A-D)	-30	ssRNA	Gastroenteriti, affezioni respiratorie, meningite asettica, encefalite, endocardite, pericardite, epatite virale
	Hepatovirus (Virus dell'Epatite A)			
Caliciviridae	Norovirus	30-35	ssRNA	Gastroenteriti acute epidemiche e sporadiche
	Sapovirus			
Adenoviridae	Mastoadenovirus (Adenovirus umani A-G)	60-90	dsDNA	Affezioni respiratorie, congiuntivite epidemica, gastroenteriti
Hepeviridae	Hepevirus (Virus dell'Epatite E)	-30	ssRNA	Epatite virale
Reoviridae	Rotavirus	70	dsRNA	Diarrea infantile, vomito
Astroviridae	Astrovirus	-30	ssRNA	Diarree infantili
Coronaviridae	Coronavirus	80-130	ssRNA	Affezioni respiratorie, polmonite atipica, gastroenteriti

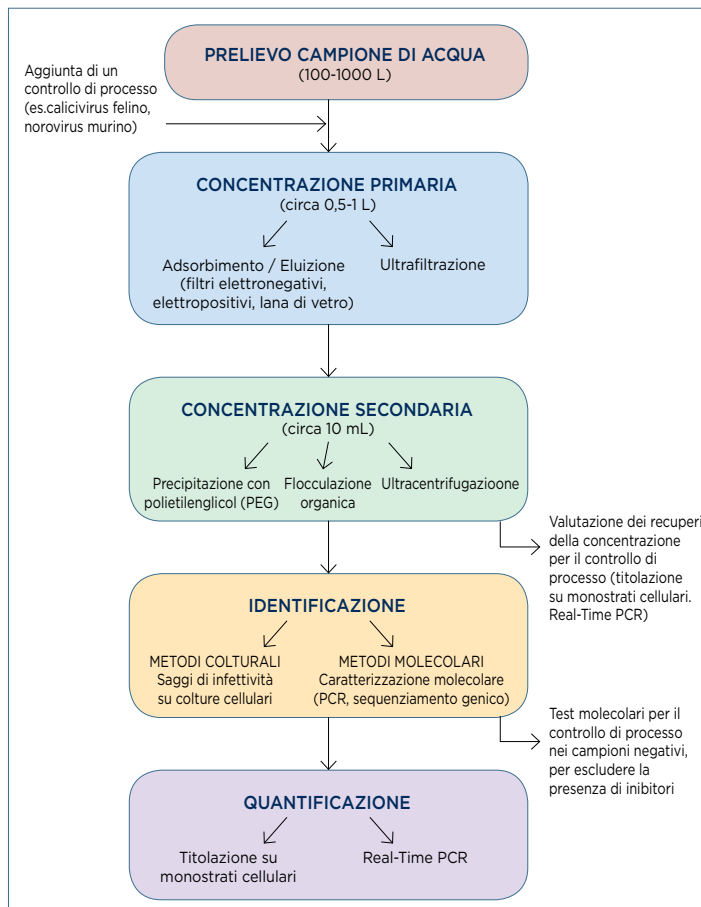


FIG. 1
ACQUE POTABILI,
RICERCA DEI VIRUS

Processo multistep per la ricerca dei virus nelle acque potabili.

resistenza e persistenza ambientale; di conseguenza non c'è consenso sull'utilizzo di un indicatore di contaminazione virale da utilizzare in alternativa alla ricerca diretta dei diversi patogeni. Recentemente, gli adenovirus sono stati proposti quali indicatori di contaminazione virale dei corpi idrici, per le loro caratteristiche di elevata resistenza ambientale e diffusione in matrici idriche.

su colture cellulari rappresenta la tecnica prevalentemente utilizzata in passato a tale scopo. Presenta numerose problematiche tra cui lunghi tempi di attesa (fino a 4-6 settimane) e necessità di utilizzare più linee cellulari per rilevare diversi virus enterici. Inoltre alcuni virus sono capaci di indurre infezioni senza produrre un evidente effetto citopatico (es. virus dell'epatite A), alcuni virus non sono a oggi coltivabili (es. norovirus).

Le tecniche molecolari quali/quantitative (PCR/Real-Time PCR), basate sulla individuazione di specifiche sequenze del genoma virale, sono oggi utilizzate con successo per l'identificazione di virus in ambienti idrici. La diagnostica molecolare si rivela, in genere, più sensibile e/o più specifica dei metodi colturali tradizionali e richiede tempi più brevi per l'identificazione. Il sequenziamento genico dei frammenti amplificati consente inoltre di identificare i tipi virali presenti e di effettuare studi di epidemiologia molecolare e analisi filogenetiche. Tuttavia la determinazione con metodi molecolari non fornisce indicazioni sulla vitalità e infettività dei virus.

Un protocollo per la ricerca di enterovirus e norovirus nelle acque potabili è stato pubblicato dall'Agenzia americana per la protezione dell'ambiente (UsEpa), basato sull'assorbimento-eluzione dei virus su membrane elettropositive e sulla successiva identificazione con metodi cellulari e molecolari [8].

Si sottolinea la necessità di studi e ricerche sulla presenza dei virus negli ambienti idrici, sulla loro resistenza ambientale e ai trattamenti di potabilizzazione, sulla loro responsabilità nelle malattie di origine idrica.

Un sistema coordinato per la sorveglianza delle patologie a trasmissione idrica, sul modello di quello statunitense, potrebbe contribuire a stabilire le priorità di ricerca e ad aggiornare e migliorare le normative per la definizione della qualità dell'acqua potabile.

Giuseppina la Rosa, Marcello Iaconelli, Simonetta Della Libera, Sabrina Petricca

Istituto superiore di sanità

La ricerca dei virus nelle matrici idriche, un processo complesso

La ricerca dei virus nelle matrici idriche è un complesso processo *multistep* in cui ciascuna fase può essere eseguita con diverse metodologie, come illustrato in figura 1. L'aggiunta di opportuni controlli di processo al campione (in genere virus animali) prima della concentrazione, consente di monitorare ogni passaggio. Vista l'estrema diluizione che i virus subiscono negli ambienti idrici, è necessario campionare volumi elevati (100-1000 litri per le acque potabili) dai quali si concentrano i virus con sistemi diversi (assorbimento/eluzione, ultrafiltrazione, ultracentrifugazione) [7]. Dopo la concentrazione si procede con l'identificazione dei virus mediante test in vivo e in vitro. L'isolamento

BIBLIOGRAFIA

- [1] La Rosa G, Fratini M, Della LS, Iaconelli M, Muscillo M. *Emerging and potentially emerging viruses in water environments*. Ann Ist Super Sanita 2012;48 (4):397-406.
- [2] Maunula L. *Waterborne norovirus outbreak*. Future Virol. 2(1), 101-112. 2007.
- [3] La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. *Recreational and drinking waters as a source of norovirus gastroenteritis outbreaks: a review and update*. Environmental Biotechnology 2008;4 (1):15-24.
- [4] Mena KD, Gerba CP. *Waterborne adenovirus*. Rev Environ Contam Toxicol 2009;198:133-67:133-67.
- [5] Pinto RM, Bosch A. *Advances in understanding of hepatitis A virus as a food and waterborne pathogen and progress with vaccine development*. In: Nigel Cook, editor. Viruses in food and water: Risks, surveillance and control. FERA, UK: 2013. p. 349-57.
- [6] La Rosa G, Muscillo M. *Molecular detection of viruses in water and sewage*. In: Nigel Cook, editor. Viruses in food and water: risks, surveillance and control. Woodhead Publishing; 2013. p. 97-125.
- [7] Ikner LA, Gerba CP, Bright KR. *Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review*. Food Environ Virol 2012 Jun;4 (2):41-67.
- [8] Fout GS, Brinkman NE, Cashdollar JL, Griffin SM, McMinn BR, Rhoads RE, et al. *Method 1615: measurement of enterovirus and norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR*, publication no EPA/600/R-10/181. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2012.