



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biologia applicata alla Biomedicina

Tesi Di Laurea

Human Adenovirus come indicatore di contaminazione biologica
in matrici idriche

Relatore:

Dott. Marco Verani

Candidata:

Valentina Roggerone

Anno accademico: 2014-2015

Indice:

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Legislazione.....	5
1.2 Caratteristiche degli indicatori biologici.....	7
1.3 <i>Human Adenovirus</i> come indicatore.....	8
1.4 Caratteristiche di <i>Human Adenovirus</i>	8
1.5 Matrici idriche.....	13
1.6 Fattori che influiscono sulla sopravvivenza di <i>Human Adenovirus</i> nelle matrici idriche.....	19
1.7 Altre matrici.....	25
1.8 Metodi per l'identificazione e quantificazione di <i>Human Adenovirus</i>	26
2. SCOPO.....	28
3. MATERIALE E METODI.....	31
3.1 Campionamento.....	31
3.2 Ricerca di <i>Human Adenovirus</i>	33
3.3 Ricerca di <i>E. Coli</i> , Enterococchi I. e Colifagi Somatici.....	40
3.4 Elaborazione dati.....	42
4. RISULTATI.....	43
4.1 Monitoraggio delle matrici idriche per <i>Human Adenovirus</i>	43

4.2 Monitoraggio delle matrici idriche per E. Coli, Enterococchi I. e <i>Human Adenovirus</i>	47
4.3 Concentrazioni medie e regressione multipla.....	52
4.4 Positività per <i>Human Adenovirus</i> nei campioni “a norma”	53
5. DISCUSSIONE.....	56
6. CONCLUSIONI.....	59
8. BIBLIOGRAFIA.....	60

Riassunto

In Italia la normativa vigente non prevede virus come indicatori di contaminazione biologica. Nello specifico per le acque reflue, in uscita dall'impianto di recupero, gli unici indicatori presi in considerazione sono *E. Coli* e Salmonella (Allegato D.M. 185/03). Mentre per le acque di balneazione sono *E. Coli* ed Enterococchi (2006/7/CE), così come per le acque destinate al consumo umano (D.lgs. n. 31/2001). Per aerosol e superfici non vi sono normative a riguardo. Numerosi studi hanno però fatto emergere che la presenza di questi indicatori non è esaustiva per predire la contaminazione biologica delle matrici idriche in esame. Se da un lato sono in grado di rivelare una contaminazione e quindi un rischio per la salute, dall'altro non sono parametri correlabili con la presenza di virus e protozoi. Infatti, laddove *E. Coli* ed Enterococchi sono assenti, possono essere presenti virus umani come *Human Adenovirus*, *Rotavirus*, *Epatite A (HAV)*, *Enterovirus*, *Norovirus GII*. Tra questi *Human Adenovirus* risulta essere ritrovato con maggior frequenza nelle matrici. In studi effettuati sui liquami, in entrata e uscita dal depuratore, tale virus risulta presente nel 100% dei campioni, nell'acqua di fiume nel 90% dei campioni e nell'acqua di mare nel 36%. Questo lavoro si è concentrato appunto su *Human Adenovirus*, un virus della famiglia di *Adenoviridae*, genere *Mastadenovirus*, che conta 51 diversi sierotipi in grado di infettare l'uomo, divisi in 6 sottogeneri (indicati con le lettere da A a F) e 51 sierotipi (indicati con i numeri). E' un virus a doppio filamento di DNA, formato da un capsido icosaedrico privo di envelope e con un diametro di circa 35-40 nm. La trasmissione del virus avviene per via oro-fecale e respiratoria, mediante secrezioni respiratorie e oculari. Si localizza a livello di del tratto respiratorio, intestinale e della congiuntiva provocando molte patologie come: gastroenteriti, congiuntiviti, patologie respiratorie e infezioni del tratto urinario. E' eliminato all'esterno mediante feci, urina, secrezioni oro-faringee e liquido congiuntivale. Lo scopo di questo lavoro è proporre *Human Adenovirus* come patogeno indice di contaminazione biologica in differenti matrici idriche da affiancare agli indicatori tradizionali. Tale scelta deriva dal fatto che *Human Adenovirus* è ubiquitario, ha elevata resistenza ambientale e ai trattamenti di disinfezione chimico-fisici. Inoltre ha elevata specificità per l'ospite umano il quale rilascia nell'ambiente un'alta concentrazione di particelle virali anche dopo molto tempo dall'infezione. Sono stati analizzati campioni di liquame in entrata e uscita dal depuratore, acqua sperimentalmente trattata, acqua di mare e acqua di fiume. I campioni successivamente sono stati esaminati con procedure standardizzate in house per passare poi all'analisi molecolare mediante la qPCR (Real Time PCR) con protocollo specifico per *Human Adenovirus*. I risultati ottenuti sono stati elaborati per poi effettuare il calcolo della regressione multipla al fine di cercare un'eventuale correlazione tra la presenza/assenza di *E. Coli* – Enterococchi I. e *Human Adenovirus*. Il 76% dei campioni analizzati è risultato essere positivo a *Human Adenovirus*, nello specifico: il 100% dei campioni di liquame in entrata e uscita dal depuratore, l'82% dei campioni di acqua di fiume, il 60% dei campioni di acqua di mare e il 42% dei campioni di acqua trattata. Il genoma di *Human Adenovirus* è risultato avere concentrazioni differenti in base alla matrice trattata: liquame in entrata $1,7 \times 10^{10} \pm 7,9$ CG/l e uscita dal depuratore $4,7 \times 10^8 \pm 11$ CG/l, acqua sperimentalmente trattata $1,6 \times 10^2 \pm 31$ CG/l, acqua di mare $9,3 \times 10^3 \pm 2,4$ CG/l e acqua di fiume $8,5 \times 10^2 \pm 27$ CG/l. La regressione multipla fornisce valori di non correlazione tra la presenza dei classici indicatori di contaminazione (*E. Coli* – Enterococchi I.) e la presenza di *Human Adenovirus* per tutte le matrici in esame ad eccezione dell'acqua di fiume. Quest'ultima infatti riceve direttamente il liquame in uscita dal depuratore, non subisce trattamenti né diluizione. I dati così ottenuti

suggeriscono che *Human Adenovirus* potrebbe essere un ottimo candidato come indicatore di contaminazione biologica da affiancare a quelli tradizionali, per diverse matrici idriche, grazie anche alla facilità con cui, tramite qPCR, si può rilevare e quantificare la sua presenza. Studi ulteriori potrebbero essere utili per escludere eventuali fattori confondenti.

Abstract

In Italy the current legislation doesn't expect virus as indicator of biological contamination. In the specific for the wastewater, in exit of recovery plant, the only indicator considered are *E. Coli* and Salmonella (attached D.M. 185/03). While for the seawater are *E. Coli* and Enterococcus I. (2006/7/CE), as like for human use destination water (D.lgs. n. 31/2001). For the aerosol and fomites are not legislation about. A lot of studios suggest that the presence of this indicator are not exhaustive to predict the biological contamination from the hydric matrices in exam. From a side are able to notice a contamination so it's health risk, to the other side are not related parameters with the presence of virus and protozoa. In fact where there aren't *E. Coli* and Enterococcus could be present human virus as *Human Adenovirus*, Rotavirus, Hepatitis A (HAV), Enterovirus, Norovirus GII. Between this virus *Human Adenovirus* has be found more often in the matrices. Study about sewage, in enter and exit of treatment plant, this virus is present in the 100% of samples, in the river water in the 90% of samples and in the seawater in the 36% of samples. This job has been concentrated on Human Adenovirus, a family virus of Adenoviridae, genus Mastadenovirus, that counts 51 different serotypes (indicated with numbers) that ae able to infect human, divided in 6 subgenus (indicated with A and F letters). It's a double strand DNA virus, formed by an icosahedral capsid without envelope and with a diameter of 35-40 nm. The virus transmission happens by oro-fecal route and breathing route, through respiratory and ocular secretions. It's located in the respiratory and intestinal tract, ocular tract and it's responsible of many diseases as: conjunctivitis, breathing pathology and urinary infections. It's secreted whit human faces, urine, oro-faringus and conjunctival secretions. The propose of this job is the utility to use *Human Adenovirus* as pathogen indicator of biological contamination. This choice is suggested that the *Human Adenovirus* is ubiquity, has a very high survival in environmental and against disinfections treatments. Also has a very high human host specificity that could release in the environmental a high concentration of particles of virus even after a lot of time from the infection. Has been analysed sample of sewage, in entry and in exit of treatment plant, experimentally treated water, sea and river water. Then the samples has been examined with standard procedures in house, to pass then to molecular analysis with qPCR (Real Time PCR) with specific protocol for *Human Adenovirus*. The results obtained has been elaborated to do a multiple regression to find an eventual correlation between the presence/absence of *E. Coli*-Enterococcus and Human Adenovirus. In the 76% of analysed samples is been resulted positive to *Human Adenovirus*, in the specific: in 100% of sewage's samples, in entry and in exit of treatment plant, the 82% of river water's sample, the 60% seawater's samples and 42% of the treated water's samples. The genome of *Human Adenovirus* has been result having a different concentration in different matrices: sewage in entry $1,7 \times 10^{10} \pm 7,9$ GC/l and sewage in exit $4,7 \times 10^8 \pm 11$ GC/l, treated water $1,6 \times 10^2 \pm 31$ GC/l, seawater $9,3 \times 10^3 \pm 2,4$ GC/l and river water $8,5 \times 10^2 \pm 27$ GC/l. The multiple regression provides no correlation value between the presence of classical indicator of biological contamination (*E. Coli* and Enterococcus) and the presence of *Human Adenovirus* for all the matrices in exam, excepted river water. In fact river water directly received a sewage in exit of treatment plant, it doesn't suffers chemical and physical treatments and dilutions too. The data obtained suggested that *Human Adenovirus* could be an excellent candidate as indicator of biological contamination to help to classical indicator, for different hydric matrices, tanks even the

facility with that, through qPCR, it's possible to detect and quantify his presence. Other study could be useful to exclude other confounding factors.

1. INTRODUZIONE

Gli indicatori di contaminazione biologica giocano un ruolo sostanziale per la comprensione dello stato igienico-sanitario delle acque, le quali, eventualmente contaminate, potrebbero rappresentare un potenziale rischio per la salute pubblica (Nusca et al., 2008). La valutazione dei rischi ambientali connessi alla presenza di virus è un problema emergente e merita particolare attenzione per le peculiari caratteristiche che differenziano i virus dagli altri microrganismi (Carducci et al., 2006).

1.1 LEGISLAZIONE

In Italia, come negli altri paesi sviluppati, le attuali norme vigenti non prevedono virus come indicatori di contaminazione biologica. I patogeni indice riferiti dalle leggi sono esclusivamente batteri, nello specifico per le acque reflue, in uscita dall'impianto di recupero, gli indicatori presi in considerazione sono *E. Coli* e *Salmonella* (Allegato D.M. 185/03 e D.lgs. 152/2006). Mentre per le acque di balneazione sono *E. Coli* ed *Enterococchi* (2006/7/CE), così come per le acque destinate al consumo umano (D.lgs. n. 31/2001).

Indicatori microbiologici riportati nella normativa :

Riferimento normativo	Tipologie di acque	Parametro/requisito richiesto				
		Enterococchi intestinali	<i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliformi fecali	Salmonella
Direttiva del Parlamento europeo 2006/7/CE (17)	Balneazione (Acque costiere)	100 ufc/100ml ^(a)	250 ufc/100ml ^(a)			
		200 ufc/100ml ^(b)	500 ufc/100ml ^(b)			
		185 ufc/100m ^(c)	500 ufc/100ml ^(c)			
DLgs n. 31/2001 (14)	Acque destinate al consumo umano	0 ufc/100ml	0 ufc/100ml	(d)		
DLgs 152/2006 (13)	Acque destinate alla vita dei molluschi				≤ 3 0 0 ufc/100ml nella polpa dei molluschi e nel liquido intervalvare	
DM n.185/2003 (15)	Acque ad uso irriguo		100 ufc/100ml (80% dei campioni) con un valore massimo 1000 ufc/100m			assente
Decreto legislativo n.152/2006 (13)	Acque di scarico limiti emissione in acque superficiali		≤5000 ufc/100ml			

(a) qualità eccellente (basata sulla valutazione del 95° percentile).

(b) qualità buona (basata sulla valutazione del 95° percentile).

(c) qualità sufficiente (basata sulla valutazione del 90° percentile).

(d) *Clostridium perfringens* (spore comprese) necessario solo se le acque provengono o sono influenzate da acque superficiali.

(Nusca et al., 2008)

In più, per altre matrici come aria e superfici, non esistono norme che fissano parametri per stabilirne la qualità, sebbene possano contenere microrganismi, anche patogeni.

In particolare per l'aerosol in Italia e all'estero non vi sono norme su cui basarsi per il controllo della contaminazione biologica, fanno eccezione alcuni ambienti confinati destinati ad un uso particolare, come: sale operatorie, ambiente di produzione dei farmaci ecc. . Va in oltre sottolineato che l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienist) non propone neppure TLV (Threshold Limit Value) per agenti biologici aerodispersi. Tale ente ha però pubblicato linee guida per il riconoscimento, la valutazione e il controllo dei contaminanti di origine biologica in ambienti "indoor" ove sono riportate indicazioni sulle sorgenti di bioaerosol, effetti sulla salute, metodi di raccolta, analisi e interpretazione dei dati (EcoBioqual s.r.l., Ricerca n°B/97-2/DIPIA/03 e INAIL 2010) .

1.2 CARATTERISTICHE DEGLI INDICATORI BIOLOGICI

I batteri indicatori non sono patogeni ma se rilevati a concentrazioni sufficientemente elevate (specificati nelle normative) la loro presenza diventa strettamente correlata con la probabilità che vi siano altri agenti infettivi responsabili di malattie idrotrasmesse. Un microrganismo per poter essere un BUON INDICATORE di contaminazione biologica deve possedere caratteristiche peculiari, ovvero:

- L'indicatore dovrebbe essere assente in ambienti incontaminati e presente quando vi è una sorgente di microrganismi patogeni (ad esempio, il materiale fecale).
- L'indicatore deve essere incapace di riprodursi e/o moltiplicarsi nell'ambiente.
- L'indicatore deve essere presente in maggior numero rispetto ai microrganismi patogeni.
- L'indicatore dovrebbe rispondere alle condizioni ambientali naturali e ai processi di trattamento delle acque in modo analogo agli agenti patogeni di interesse.
- L'indicatore dovrebbe essere facile da isolare, identificare e contare.
- Gli indicatori dovrebbero essere rilevabili con test poco costosi e permettere numerosi campioni (WHO,2006) .

La ricerca, l'identificazione e la determinazione della concentrazione di un microrganismo patogeno in una data matrice non è un'operazione di semplice realizzazione poiché la sua presenza può essere variabile e occasionale. Per tale motivo sono stati definiti alcuni microrganismi indicatori la cui presenza è correlabile con quella di microrganismi patogeni. Persistono comunque numerosi ostacoli nella ricerca di tali microrganismi derivanti da: limitato tempo di sopravvivenza nell'ambiente, varia provenienza, bassa resistenza ai metodi di disinfezione, capacità di riprodursi nella colonna d'acqua, difficoltà nell'identificare la fonte di contaminazione e bassa sensibilità degli strumenti e metodologie di rilevamento (Nusca et al., 2008).

Numerosi studi hanno però fatto emergere che la presenza di questi indicatori non è esaustiva per predire la contaminazione biologica delle matrici idriche in esame. Se da un lato sono in grado di rivelare una contaminazione e quindi un rischio per la salute, dall'altro non sono parametri correlabili con la presenza di virus e protozoi. Infatti, laddove E. Coli ed Enterococchi sono assenti, possono

essere presenti virus umani come Human Adenovirus, Rotavirus, Epatite A (HAV), Enterovirus, Norovirus GII.

1.3 HUMAN ADENOVIRUS COME INDICATORE

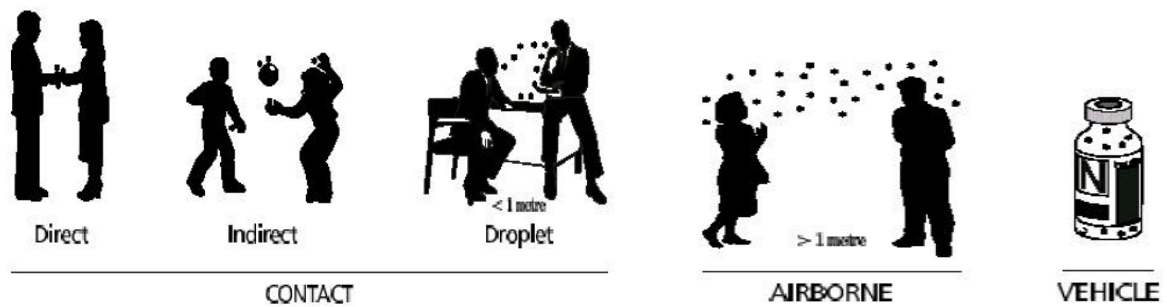
Negli ultimi anni Human adenovirus è stato proposto come indicatore di contaminazione da affiancare a quelli tradizionali per la sua alta frequenza con cui viene ritrovato nelle varie matrici ambientali. In particolare nelle acque di balneazione dove *Human Adenovirus* è stato rilevato nel 53.3% dei campioni, contro il 3.3% *Enterovirus* e il 10% di *Rotavirus* (Mark Wong et al 2009), così come nei campioni di acque superficiali (43.33 %) rispetto ad altri virus enterici, NoroVirus GII (40 %), NoroVirus GI (10 %), Virus dell'epatite E (3.33 %) e virus dell'epatite A (assente)(Lazicet al., 2015), risultato che ne sottolinea la sua prevalenza nell'ambiente rispetto agli altri virus.

1.4 CARATTERISTICHE DI HUMAN ADENOVIRUS

Human Adenovirus, un virus della famiglia di Adenoviridae, genere Mastadenovirus (Sinclair et al.. 2009) che conta 51 diversi sierotipi in grado di infettare l'uomo (indicati con i numeri), divisi in 6 sottogeneri (indicati con le lettere da A a F) (Wyer et al., 2012).

E' un virus a doppio filamento di DNA, formato da un capsido icosaedrico privo di envelope e con un diametro di circa 80-90nm. (Sinclair et al., 2009; Jiang at al.,2006).

Le vie di trasmissione sono diverse e includono il contatto diretto con persone infette, il contatto indiretto con superfici contaminate, trasmissione oro-fecale (mediante cibo e acqua contaminati), droplet (goccioline) e trasmissione aerea.



La trasmissione mediante droplet (goccioline), avviene quando il virus viaggia in goccioline respiratorie abbastanza grandi ($>10 \mu\text{m}$) che vengono escrete da persone infette mediante starnuto, tosse, o durante la conversazione o la respirazione (aerosolizzazione primaria). Un singolo colpo di tosse può rilasciare centinaia droplets, un solo starnuto migliaia (fino a 40 000) ad una velocità fino a 50-200 chilometri orari, ogni goccia che contiene milioni di particelle virali (il numero varia notevolmente durante il corso dell'infezione). I droplets possono viaggiare ad una distanza di 1-2 metri per poi depositarsi sulle superfici circostanti e rimanere infettivi per ore o perfino giorni. Può poi generarsi un'aerosolizzazione secondaria mediante il flusso d'aria sulle superfici contaminate che porta ad una nuova dispersione del virus in aria.

I fattori che influenzano l'infettività dei patogeni contenuti nei droplets:

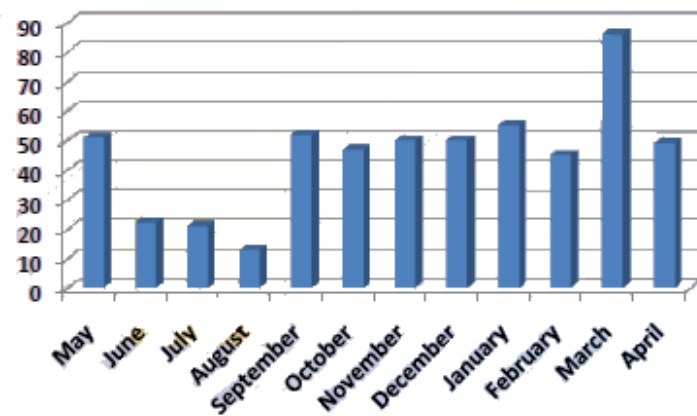
- velocità ed meccanismo mediante cui le goccioline vengono espulse dal soggetto infetto
- densità delle secrezioni respiratorie
- fattori ambientali (temperatura e umidità)
- capacità del patogeno di mantenere l'infettività a determinate distanze (Delfino, 2010)

Tale via di trasmissione non dev'essere confusa con quella aerea in quanto i droplets non rimangono sospesi in aria ma si depositano sulle superfici .

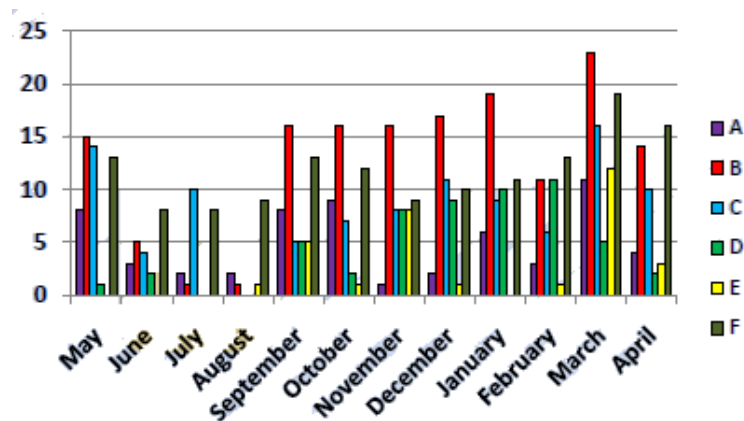
Nella trasmissione aerea invece il virus contenuto nelle goccioline ($\leq 5 \mu\text{m}$) può rimanere sospeso nell'aria per lunghi periodi e essere trasportato a distanze considerevoli. Successivamente può essere inalato e penetrare all'interno delle vie respiratorie, grazie alle dimensioni ridotte.

Human Adenovirus si localizza a livello di del tratto respiratorio, intestinale e della congiuntiva provocando molte patologie come: gastroenteriti, congiuntiviti, patologie respiratorie e infezioni del tratto urinario, epatiti, miocarditi ed encefaliti. Queste patologie sono più gravi in bambini, anziani e immunocompromessi. Alcuni tipi di questo virus spesso danno origine a infezioni asintomatiche e persistenti in tonsille, adenoidi e intestino di persone infette, che possono rilasciare il virus nell'ambiente per mesi o anni. Le infezioni da *Human Adenovirus* possono verificarsi durante tutto l'anno, in particolare durante la fine dell'inverno, primavera e inizio estate (La Rosa et al., 2013).

Variatione mensile dei casi di *Human Adenovirus*:



Variatione mensile dei casi dovuti a singola specie di *Human Adenovirus*:



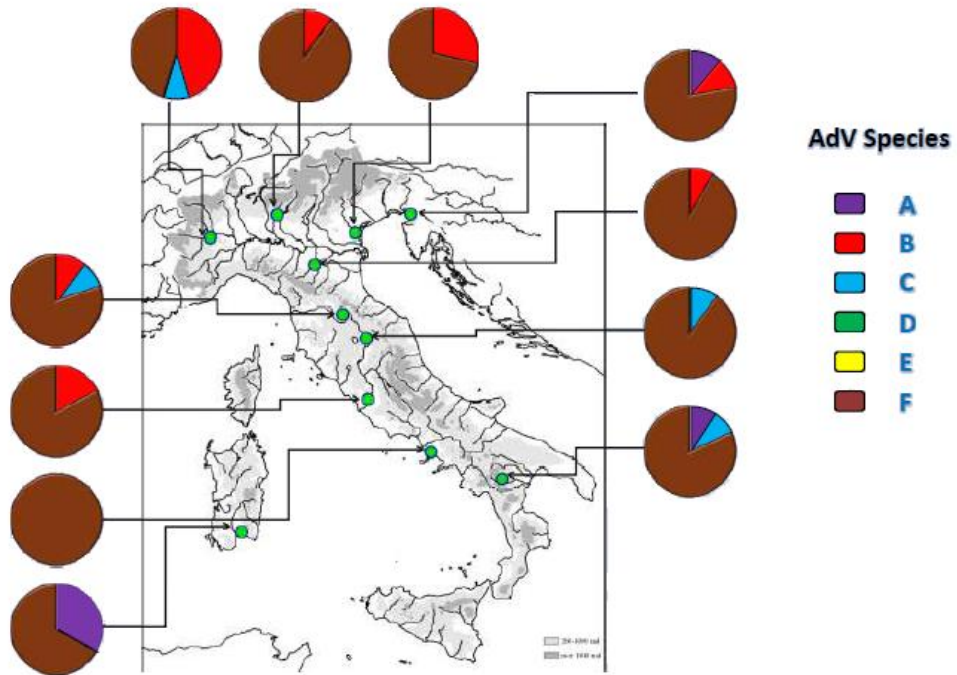
Classificazione di Sierotipi umani di adenovirus:

SOTTOGRUPPO	SIEROTIPO	SITO DI INFEZIONE
A	12, 18, 31	Tratto gastrointestinale
B	3, 7, 16, 21, 50 (B1), 11, 14, 34, 35, (B2)	Polmone, vie urinarie
C	1, 2, 5, 6	Alte vie respiratorie
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51	Occhi, Tratto gastrointestinale
E	4	Vie respiratorie
F	40, 41	Tratto gastrointestinale

(Jiang et al., 2006)

In particolare *Human Adenovirus* 40 e 41 del sottogruppo F si replicano nell'intestino e sono rilasciati con le feci. Questi due sierotipi sono responsabili di molti casi di gastroenterite nei bambini (Xagorarakis et al., 2007) con un tasso di ospedalizzazione per diarrea acuta intorno al 5-20% (Abad et al., 2001). I sierotipi 1, 2 e 5 sono responsabili del 5-10% delle patologie respiratorie nei bambini, mentre possono causare congiuntiviti negli adulti, altri sierotipi possono provocare invece cheratite. *Human Adenovirus* 11 può provocare cistite emorragica in persone sane e in soggetti immunocompromessi può provocare danni più seri. (Jiang et al., 2006; J. van Heerden et al., 2005; Wyer et al., 2012)

Distribuzione delle specie di Human Adenovirus in Italia :



(Iaconelli et al., 2009)

Human Adenovirus può essere isolato dalle feci, dalle secrezioni delle mucose nasali, congiuntivali e della faringe (Muscillo et al.). E' stato calcolato che un soggetto infetto può rilasciare nell'ambiente fino a 10^{11} - 10^{13} particelle virali/g di feci (Hewitt et al., 2013; Dalla Vecchia et al., 2015; A. Bosch et al. 2008).

Uno studio americano ha calcolato la TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) dose alla quale si ottiene infezione del 50% delle cellule in coltura.

TABLE 2 HAdV types with corresponding LoD, T_m range, and mutations in probe region

HAdV type ^b	LoD for representative type of whole virus (TCID ₅₀ /ml) ^b	T_m range	Fluorescein probe area ^a	LC Red 640 probe area ^a
8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 25-30, 32, 33, 36-39, 42-47, 49, 51, 53, 56	10^{-1} (type 19), 10^0 (type 9)	61.1–62.0	CCG TCA GTG AAA ACG TGC	GCT CTC ACA GAT CAC GGG
24	Not performed	58.2	CGG TCA GTG AAA ACG TGC	GCT CTC ACA GAT CAC GGG
31	Not performed	56.4	CCG GCA GTG AAA ACG TTC	GCT CTC ACA GAT CAC GGG
1, 2, 3, 4-7, 11, 14, 21, 34, 35, 50, 55, 57	10^0 (type 4), 10^1 (types 1, 3)	55.3–56.7	CCG TCA GTG AAA ACG TTC	GCT CTC ACA GAT CAC GGG
18, 40, 41, 52	10^{-1}	55.9–56.6	CCG TCA GTG AAA ACG TTC	GCC CTC ACA GAT CAC GGA
48, 54	Not performed	52.0	CCG TTA GTG AAA ACG TGC	GCT CTC ACA GAT CAC GGG
16	10^{-1}	50.9	CCA TCA GTG AAA ACG TTC	GCT CTC ACA GAT CAC GGG
12	10^3	49.9	CCG TCA GTG AAA ACG TTC	GCC CTT ACA GAT CAC GGG

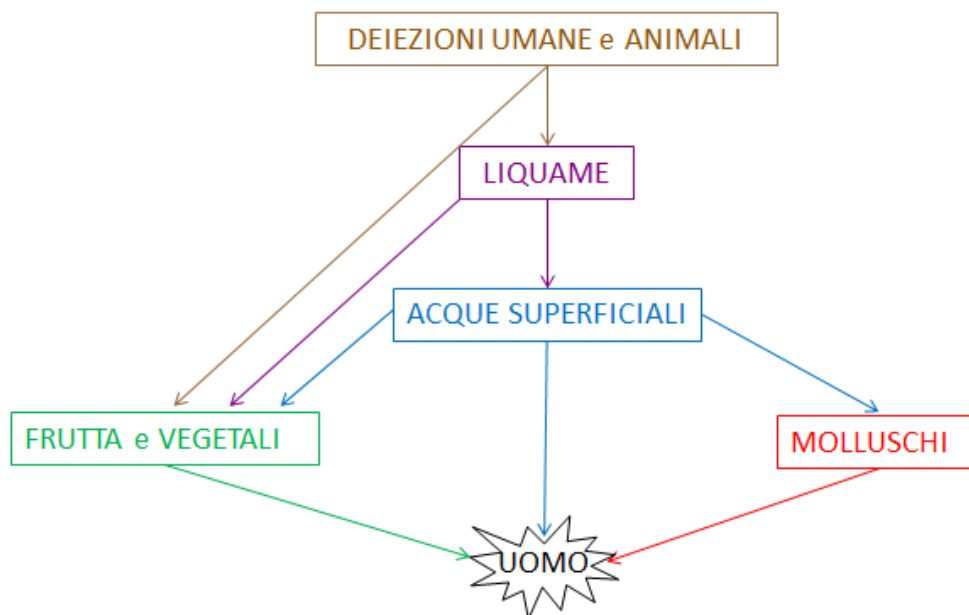
^a Mutations in the region targeted by the probes are in bold. There are 2 intervening nucleotides between the donor (fluorescein) probe and acceptor (LC Red 640) probe across which energy transfer occurs.

^b Bolded HAdV types were used to determine the limit of detection for each T_m -based grouping shown above (see Table S3 in the supplemental material for virus strains used). Whole-virus strains were quantitated using the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀).

Come si può osservare la dose infettante varia da 10^{-1} a 10^3 TCID₅₀/ml in base al tipo di Human Adenovirus preso in esame. Nella terza colonna è riportato il range di temperatura alla quale è stata calcolata la TCID₅₀ (Buckwalter et al., 2011)

1.5 MATRICI IDRICHE

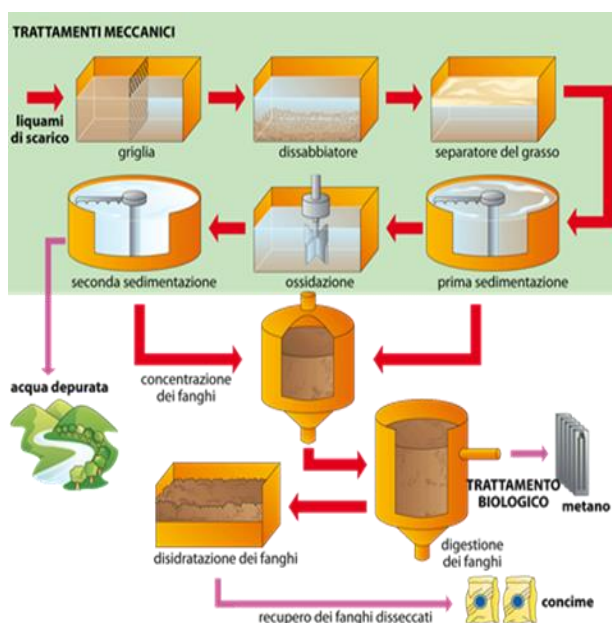
ACQUA E LIQUAMI:



Le acque di superficie sono le prime e quelle più facilmente a rischio di contaminazione virale. La normativa attuale prevede la ricerca solo di *E. Coli* come indicatore di contaminazione fecale (D.lgs. 152/2006) al fine di preservare le acque ambientali da eventuale contaminazione derivante dal riuso delle acque trattate. Oltre a indicatori di contaminazione biologica sono valutati parametri chimico-fisici (domanda di ossigeno, solidi sospesi, fosforo e azoto). Dalla normativa non emergono indicazioni per la ricerca di virus come indice di contaminazione biologica. Sarebbe però auspicabile inserirli come patogeno indice poiché rappresentano un potenziale pericolo per la salute. Essi sono molto stabili nell'ambiente e resistenti ai trattamenti di disinfezione praticati all'interno dell'impianto di trattamento dei reflui (Rodriguez-Lazaro et al., 2013).

I liquami urbani sono un particolare tipo di acque reflue. Sono costituiti da sostanze di rifiuto organiche, inorganiche, residui del ciclo biologico umano e animale, contengono in oltre numerosi microrganismi patogeni e non (batteri, virus, protozoi ed elminti).

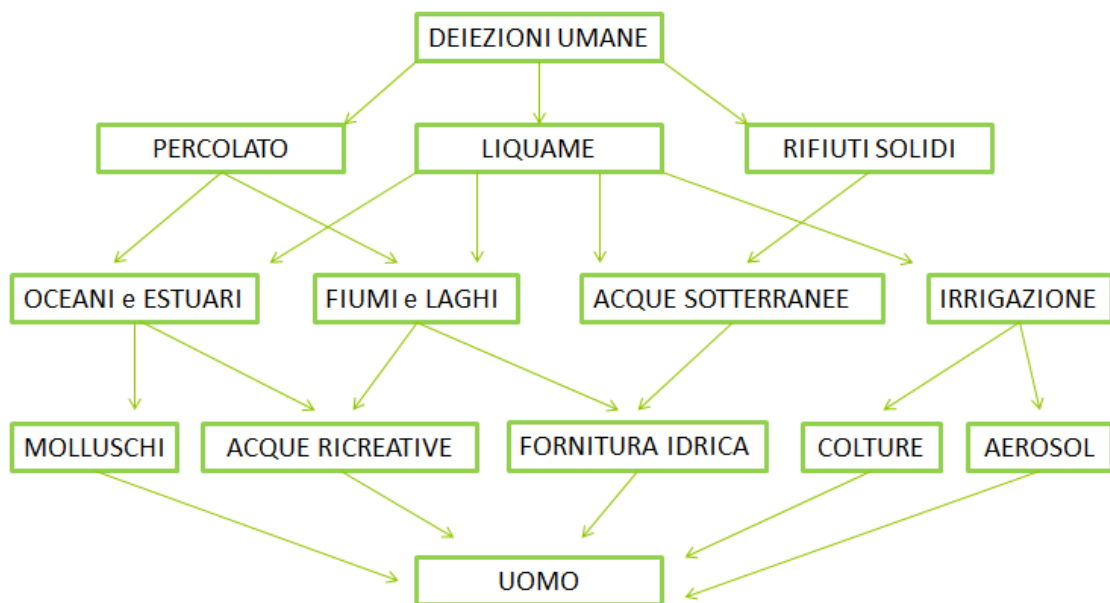
Gli scarichi civili, contenenti sia sostanze organiche provenienti dal metabolismo dell'uomo (urina e feci) che sostanze chimiche (detersivi, sapone e materiale grasso), insieme alle acque pluviali e agli scarichi industriali, vengono convogliate nella rete fognaria e da qui trasportata al depuratore per subire opportuni trattamenti. Le prime fasi (grigliatura, dissabbiatura, separatore grasso, prima sedimentazione) consistono in trattamenti di tipo meccanico volti ad eliminare il materiale più grossolano e la parte grassa.



Dopodiché il materiale da trattare passa alla vasca di ossidazione ove avviene la decomposizione della sostanza organica ad opera di microrganismi. Terminati questi trattamenti, si prosegue con un'ulteriore sedimentazione da cui è ottenuta acqua pura, che può essere re-immessa nei corsi d'acqua dopo essere stata opportunamente trattata (disinfezione con cloro o altri composti chimici), e fanghi. I fanghi subiscono successivi trattamenti di tipo biologico per destinarli alla formazione di

biogas oppure trattamenti alternativi per ottenere concime o prodotti indirizzati alla discarica. (<http://educazionetecnica.dantect.it>).

I virus sono presenti in grande quantità nei liquami non trattati (Ikelsn et al., 1984) e i processi di disinfezione spesso non sono sufficienti a garantirne la completa eliminazione. Tra tutti i virus *Human Adenovirus* è il più resistente a questi trattamenti (Kundu et al., 2013) così da essere ritrovato con maggiore frequenza nei liquami (Irving et al., 1981, Bibbya et al., 2013) e in matrici contaminate da essi (Carducci et al., 2006.) e di conseguenza fonte di inquinamento ambientale. (Bosch, 1998).

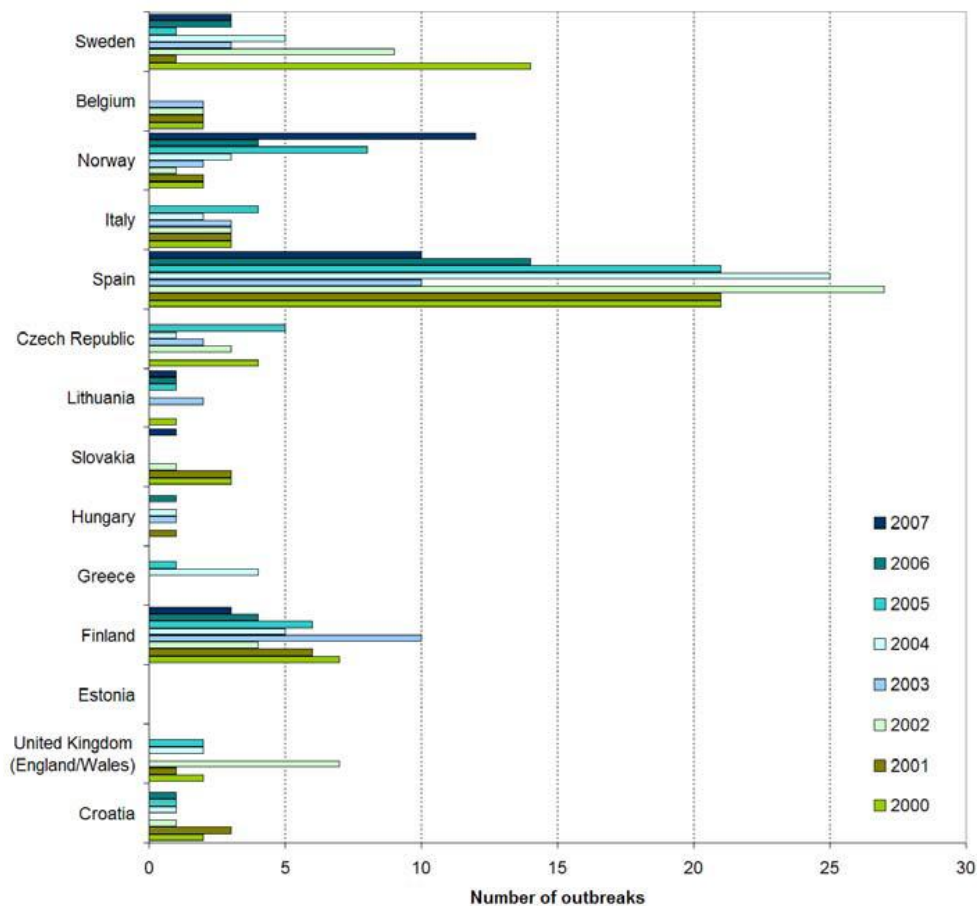


(Bosch, 1998)

Quindi ogni fase del trattamento liquami deve essere realizzata in modo completo e corretto per evitare di re-immettere nell'ambiente materiale contaminato. Lo scarico di liquami non adeguatamente trattati in acque di superficie ad uso ricreativo, acque potabili, acque destinate

all'agricoltura e alla coltivazione di molluschi rappresenta un rischio per la salute pubblica dovuto alla presenza di virus patogeni provenienti dal tratto gastrointestinale umano. (J. Hewitt et al. 2013).
 Risulta infatti che *Human Adenovirus* è responsabile del 24% dei casi di gastroenterite a livello mondiale connessa all'uso di acqua contaminata (Kundu et al., 2013).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha condotto un'indagine tra i paesi europei per comprendere l'importanza delle patologie legate al consumo di acqua contaminata e il necessario monitoraggio al fine di prevenire l'insorgenza di nuovi casi. Il grafico sottostante riporta i casi di malattia derivanti dal consumo di acqua contaminata in diversi paesi europei dal 2000–2007. Nei 14 paesi partecipanti, vi sono stati 354 focolai d'infezione dal 2000 al 2007, con il risultato di 47 617 episodi di malattia. I virus sono responsabili 136 focolai di infezione (37.5%) e del 49.4% di casi di malattia.



(WHO 2009)

Il virus contenuto nelle matrici idriche può facilmente essere aerosolizzato e in seguito andare a depositarsi sulle superfici aumentando così il rischio di possibile contaminazione.

CONTAMINAZIONE DELLE ACQUE NATURALI

Gli scarichi fognari che vengono rilasciati in acque superficiali e sotterranee sono la maggior sorgente di virus umani presente nell'ambiente. La concentrazione dei virus nei liquami dipende da numerosi fattori. L'incidenza delle infezioni nella popolazione (Hejkal et al., 1984), ma non necessariamente la malattia, è il fattore più importante seguito poi dal tipo di trattamento e disinfezione a cui è sottoposto il liquame. La presenza di virus e la concentrazione nelle acque di superficie è generalmente elevata in Europa e al di fuori degli Stati Uniti poiché i liquami non sono trattati prima di essere immessi nell'ambiente. La disinfezione è divenuta una pratica comune negli Stati Uniti così che la concentrazione dei virus nelle acque superficiali è minore; anche la quantità pro-capite di acqua utilizzata può influenzare la concentrazione del virus nei liquami.

La pioggia influenza la presenza dei virus nelle acque di superficie e sotterranee. Durante i principali eventi di piogge torrenziali gli impianti di trattamento dei liquami non riescono a effettuare un corretto trattamento, poiché raccolgono anche le abbondanti acque piovane. I liquami così non trattati vengono riversati nelle acque superficiali. La pioggia aumenta anche la percolazione di acqua nel terreno, con un aumento delle acque sotterranee e della dissoluzione delle sostanze presenti nel terreno.

La percolazione attraverso il terreno di discariche non foderate può provocare un aumento della migrazione del virus nel sottosuolo. Ciò spiega l'aumento di focolai di malattie, connesse ad uso di acqua contaminata, nei periodi successivi a piogge. (Curriero et al., 2001). Altra sorgente di contaminazione virale nelle acque di superficie è la risospensione dei sedimenti. I soggetti che entrano in contatto con l'acqua dei laghi o corsi d'acqua possono rilasciare un numero significativo di virus enterici nei corpi idrici. (Rose et al., 1987; Gerba, 2000)

FATTORE	OSSERVAZIONE
TRATTAMENTO DEI LIQUAMI	Un numero minore di virus sono stati ritrovati nelle acque di superficie degli stati uniti rispetto all'Europa poiché è richiesto il trattamento liquami
TIPO DI DISINFETTANTE	<i>Adenovirus</i> risulta maggiormente concentrato in liquami trattati con UV rispetto a quelli trattati con cloro, per una maggiore resistenza del virus ai raggi UV
PERIODO DELL'ANNO	I virus enterici risultano essere maggiormente concentrati durante tutto l'anno e hanno una lunga sopravvivenza nelle acque invernali
INCIDENZA DELLE INFEZIONI	Alte concentrazioni virali nei gruppi socio-economici più bassi
PIOGGE	Durante i periodi di elevata piovosità la depurazione può essere bypassata o i tempi di trattamento ridotti

La tabella sottostante mette in evidenza i casi di *Human Adenovirus* legati ad acqua contaminata:

Occurrence of adenoviruses in surface waters

Adenovirus type(s)	Water source	Concentration/frequency	Location	Reference
Ad2, Ad3, Ad5, Ad6	River	0–25 PFU/l	Japan	Tani et al. (1995)
Ad40, Ad41	Surface	49–88%	South Africa	Genthe et al. (1995)
Ad _{NS}	River	100%		
Ad _{NS}	River	74%	Spain	Pina et al. (1998)
Ad _{NS}	River	100%	Spain	Girones et al. (1995)
Ad 40	Surface water	48%	United States	Chapron et al. (2000)
		0–2.11 MPN		
Ad	Surface water	880–7500 genomes/l	California	Jiang et al. (2001)
Ad	River	50%	California	Jiang and Chu (2004)
Ad	Surface water	66.7%	South Korea	Lee et al. (2005)
Ad	Surface water	12.7%	South Africa	Van Heerden et al. (2003)
Ad 2,40,41	Surface water	22.2%	South Africa	Van Heerden et al. (2005)
Ad	River receiving sewage discharge	20%	Germany	Pusch et al. (2005)
Ad	Seawater		France	Hugues et al. (1980)

Ad_{NS}, Adenovirus, exact type not specified; IU, infectious unit; PFU, plaque forming unit; INS, Not Specified.

L'acqua di mare è la matrice idrica che richiama maggiormente attenzione poiché implicata nel rischio di contaminazione dei molluschi, poiché essi vengono in molti casi consumati crudi o poco cotti, e dei bagnanti. (Bosch et al., 2006).

Dal momento che le acque dolci superficiali sono di solito trattate e disinfettate prima dell'utilizzo come acqua potabile, è di minor interesse la ricerca di virus in queste acque.

Solo negli ultimi anni le acque sotterranee ricevono maggior attenzione. Recenti indagini negli Stati Uniti suggeriscono che la presenza di virus non è raro, probabilmente provenienti in gran parte dalle fosse settiche e dalle perdite delle linee fognarie.

Tra tutti i virus *Human Adenovirus* è quello che di recente è stato preso maggiormente in considerazione poiché risulta il più comune nei liquami ed è il più resistente alla disinfezione con UV, trattamento comune per i liquami e l'acqua potabile.

1.6 FATTORI CHE INFLUISCONO SULLA SOPRAVVIVENZA DI *HUMAN ADENOVIRUS* NELLE MATRICI IDRICHE

I virus trasmessi per via oro-fecale, essendo privi di envelope, sono molto resistenti all'ambiente e sono riconosciuti come patogeni emergenti responsabili di numerosi casi di malattia. Questi virus non possono essere totalmente eliminati mediante gli attuali metodi di disinfezione applicati ai liquami. Il risultato di ciò è la contaminazione virale di svariate matrici ambientali (acque di mare, di fiume, superficiali, sotterranee ed ad uso irriguo) con il conseguente rischio di reimmettere il virus patogeno nella popolazione umana causando focolai di infezione. (Rodriguez-Lazaro et al., 2013; A. Bosch et al 2008).

Rispetto a tutti gli altri virus enterici *Human Adenovirus* è quello che viene ritrovato con maggior frequenza nell'ambiente, ciò è dovuto alla sua elevata resistenza ai trattamenti inattivanti con luce UV. L'efficacia di inattivazione ottenuta con un flusso di raggi UV di 600J/m^2 è di solo 96% contro il 99.99% richiesto per il trattamento delle acque superficiali. *Human Adenovirus* è anche resistente a trattamento con monocloramina, uno studio è riportata che sono necessari circa $3200\text{ mg Cl}_2\text{min/L}$ per inattivare il 99.99% del virus di tipo 2, ad un pH 8 ed una temperatura di $5\text{ }^\circ\text{C}$ (Sirikanchana et al., 2008). Il Cloro libero è stato dimostrato invece essere efficace contro altri tipi di *Human Adenovirus*.

Studi dimostrano che il Cloro libero può essere effettivamente utilizzato contro il sierotipo 3 , 5 (Baxter et al., 2007), 40 (Thurston-Enriquez et al., 2003) e 41 (Baxter et al., 2007) di *Human Adenovirus*. (Martin et al 2009).

In particolare, la tabella sottostante riporta i valori Ct (concentrazione di ClO₂ moltiplicata per il tempo di contatto con il virus) emersi da uno studio condotto in America, per inattivare al 99.99% *Human Adenovirus* tipo 40. I valori di Ct_{99.99%} (mg/litro x minuto) variano in base alla temperatura e al pH.

Ct _{99.99%} (mg/litro x minuto)		
parametri acqua		RANGE DI INATTIVAZIONE DI HUMAN ADENOVIRUS 40
C°	pH	
5	6	0.77 - 1.53
5	8	0.80 - 1.59
15	6	0.49 - 0.74
15	8	< 0.12

Gli autori hanno osservato che i virus patogeni possono bypassare il processo di filtrazione per le loro piccole dimensioni e il trattamento di disinfezione chimico risulta così molto importante. Il Cloro è il prodotto maggiormente utilizzato ma spesso si è rivelato inefficace verso alcuni patogeni similmente al trattamento con luce UV, tanto da non garantire la completa eliminazione di *Human Adenovirus*. Per tale motivo, in questo lavoro, gli autori hanno preso in esame ClO₂ come disinfettante primario o secondario a seguito del trattamento con luce UV (Thurston-Enriquez et al., 2005)

La grande resistenza ai raggi UV è dovuta sia al fatto che *Human Adenovirus* utilizza gli enzimi dell'ospite durante la fase di replicazione per riparare il DNA danneggiato sia al suo alto peso molecolare. (Silva et al., 2011). In oltre entrambi i doppi filamenti di DNA servono come template per la replicazione, nel che caso un filamento sia danneggiato da raggi UV o altri fattori ambientali la

replicazione non viene così compromessa aumentando la sopravvivenza del virus. (Van Heerden et al., 2003).

L'umidità relativa influisce sulla vitalità virale e sulla sua dispersione in aerosol. *Human Adenovirus* sopravvive meglio con un alto tasso di umidità relativa, circa 70%-80%. (La Rosa et al., 2013)

A causa dell'alta concentrazione di sale, *Human Adenovirus* risulta essere meno stabile in acqua salata, rispetto a quella dolce, soprattutto ad alte temperature. In oltre in mare risulta essere meno concentrato per l'elevato potere diluente di questa matrice (Wyn-Jones et al., 2011) .

FATTORE	EFFETTO
TEMPERATURA	fattore più importante, lunga sopravvivenza a basse temperature
LUCE	i raggi UV possono danneggiare gli acidi nucleici e causarne la dimerizzazione
pH	molti virus sono stabili ai valori di ph a cui si trovano le acque naturali
SALI	alcuni virus sono protetti contro l'inattivazione da calore per la presenza di cationi
SOSTANZA ORGANICA	la presenza di liquami aumenta la sopravvivenza
SOLIDI E SEDIMENTI SOSPOESI	la presenza di solidi aumenta la sopravvivenza
INTERFACCIA ARIA-ACQUA	i virus hanno una grande idrofobicità e sono maggiormente attratti all'interfaccia aria-acqua ove avviene la denaturazione delle proteine del capsido
FATTORI BIOLOGICI	la microflora acquatica è antagonista

TEMPERATURA:

La temperatura è il fattore che maggiormente agisce sulla sopravvivenza dei virus nelle matrici idriche (Yates et al., 1985). In base alla temperatura è possibile predire la sopravvivenza del virus: più la temperatura è bassa più a lungo il virus rimarrà vitale. La temperatura influenza la soglia alla quale avviene la denaturazione proteica e degli acidi nucleici così come le reazioni chimiche che possono degradare il capsido virale. Alla temperatura di congelamento o vicino ad essa i virus possono sopravvivere mesi (Goyal et al., 1984).

(Kutz et al., 1988) hanno analizzato i dati sulla sopravvivenza dei virus in acque superficiali e hanno osservato che i virus vivono più a lungo nelle acque profonde rispetto a quelle superficiali. L'inattivazione virale è di circa $0.01 \log_{10}$ al giorno per i virus ritrovati in acque profonde a 8°C e in acque superficiali a 4°C.

In particolare è emerso che *Human Adenovirus* è il più resistente, tra i virus enterici, all'inattivazione dovuta alla temperatura (Crance et al., 1998; Bruniger et al., 2000). Anche la composizione stessa delle acque può influire sull'effetto che la temperatura ha sulla vitalità del virus. Fattori come il pH, sali, materia organica o la presenza di altre sostanze influiscono sulla stabilità termica del virus. (Pohjanpelto et al., 1961; Wallis et al., 1965; Salo and Cliver, 1976). Alcuni cationi potenziano l'effetto della temperatura, così come altri possono avere un effetto opposto.

L'inattivazione virale causata da una elevata temperatura è dovuta alla denaturazione delle proteine, mentre alle basse temperature l'inattivazione virale è legata al danneggiamento dell'RNA.

pH:

La maggior parte delle acque naturali si trovano ad un pH che varia da 5 a 9, range in cui i virus mantengono perfettamente la loro stabilità. Molti virus enterici risultano ancora più stabili a range di pH che vanno da 3 a 5 rispetto a pH da 9 a 12. In particolare *Human Adenovirus* è sensibile all'inattivazione che avviene a $pH \geq 10$ (Gerba and Goyal, 1982). La differente suscettibilità dei virus enterici al pH dipende dal ceppo di cui fanno parte.

LUCE:

I raggi UV della luce solare, possono inattivare i virus causando cross-linking tra i nucleotidi. (Fujioka and Yoneyama, 2002) hanno riscontrato che gli enterovirus sono maggiormente inattivati alla presenza di luce solare rispetto a condizioni di buio. Il tasso di inattivazione è minore in inverno rispetto all'estate (Fattal et al., 1983). *Human Adenovirus* è risultato essere, grazie al doppio filamento di DNA, molto più resistente all'inattivazione da UV rispetto ad altri enterovirus. Tale resistenza è conferita dalla capacità del virus di utilizzare gli enzimi della cellula ospite per poter riparare il DNA danneggiato dai raggi UV. (Gerba et al., 2002).

La luce visibile può agire sulla sopravvivenza virale con un meccanismo detto “*inattivazione fotodinamica*”. In questo processo il virus è “sensibilizzato” alla fotossidazione per l’interazione del genoma virale con certe sostanze (Wallis and Melnick, 1965). Tali sostanze possono essere di origine naturale o sintetica (acido fulvico, acido umico, e vitamine) esse possono agire come fotosensibilizzanti in quanto assorbono le radiazioni e trasferiscono selettivamente l’energia sulle molecole di ossigeno. L’ossigeno passa così ad uno stato eccitato e successivamente raggiunge lo stato di ossidazione.

La durata dell’esposizione alla luce solare e la sua intensità influenzano il tasso di inattivazione virale e è dimostrato che le sostanze fotodinamiche sono in grado di agire come antivirali. (Melnick and Gerba, 1980).

SALI E METALLI

I virus possono sopravvivere più a lungo in acqua dolce rispetto che in acqua salata. Ciò è dovuto principalmente alla presenza di microrganismi antagonisti e non alla concentrazione salina. (Kapuscinski and Mitchell, 1980). E’ noto inoltre che alcuni metalli pesanti, come rame e argento, hanno proprietà antivirali, ma la loro concentrazione nelle acque naturali è talmente bassa da non avere effetto sui virus. (Thurman and Gerba, 1988).

INTERFACCIA ARIA-ACQUA-SOLIDO

E’ stato dimostrato che l’interfaccia dinamica aria-acqua-solido può inattivare certi colifagi (Thompson and Yates, 1999) mediante distruzione delle proteine virali del capsido. Tale effetto sembra aumentare tanto in relazione la forza ionica in soluzione. Più il capsido virale è idrofobico, maggiore è l’inattivazione.

L’assorbimento dei virus sul materiale solido ha un ruolo importantissimo per la loro sopravvivenza nelle matrici idriche. I virus enterici presenti nelle acque sono spesso associati a particolato e sedimenti. Questi virus vengono facilmente ritrovati in grande numero nei sedimenti rispetto all’acqua. (Goyal et al., 1978). L’assorbimento porta ad un prolungamento della sopravvivenza del virus, con eccezione di alcune casi che, al contrario, ne aumentano l’inattivazione. (Murray and Laband, 1979). Studi hanno dimostrato che i virus vengono realmente assorbiti da sabbia, argilla

pura, cellule batteriche, sostanza organica, fango, etc. . Nel caso di *Enterovirus* tale assorbimento ne prolunga la sopravvivenza (Smith et al., 1978). L'effetto protettivo delle argille sulla sopravvivenza dei virus, sembra essere dovuto ad diversi fattori, tra cui la capacità delle argille di sequestrare enzimi e altre sostanze virucide, impedendone di fatto l'interazione con il virus con un incremento della stabilità del capsido virale. E' stato dimostrato che l'argilla bentonite è in grado di proteggere i virus dall'inattivazione da parte di ribonucleasi, che sono assorbite anch'esse dall'argilla (Singer and Fraenkel-Conrat, 1961). I sedimenti marini e l'argilla possono proteggere i virus contro l'inattivazione termica in mare (Liew and Gerba, 1980).

MICROFLORA

L'azione dei batteri e delle forme di vita superiori sulla sopravvivenza dei virus nelle matrici idriche, varia nel tempo e nello spazio e dal tipo e quantità di microflora presente. Il fallimento delle prove fatte per dimostrare ciò è dovuto al fatto che non è possibile riuscire a campionare i microrganismi che influiscono sulla vitalità virale. Le evidenze sul coinvolgimento della microflora nella sopravvivenza virale derivano da studi condotti su acque superficiali, profonde e di mare. Questi studi pur suggerendo che i batteri presenti nelle acque naturali giocano un ruolo significativo sulla sopravvivenza dei virus, non riescono a chiarire del tutto tali meccanismi (Gerba, 2006).

Il trattamento delle acque naturali per eliminare o uccidere batteri o funghi mediante autoclave, filtrazione, aggiunta di antibiotici, o trattamenti con luce UV incrementano la sopravvivenza virale. (Melnick and Gerba, 1980; Gerba, 2006). La grande attività antivirale delle acque di mare comparata con quelle dolci è correlata con la presenza di batteri tipici dell'acqua salata (Fujioka et al., 1980). Studi sulle acque dolci suggeriscono che la microflora presente è in grado di inattivare gli enterovirus (Cliver and Hermann, 1972). La grande sopravvivenza dei virus enterici in acqua è dovuta alla loro grande resistenza agli enzimi proteolitici (Chang, 1971).

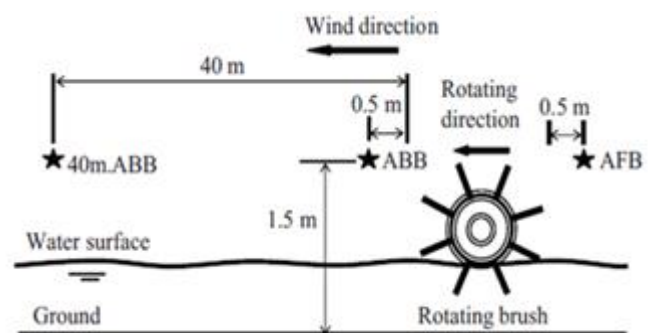
1.7 ALTRE MATRICI

ARIA E SUPERFICI: il meccanismo di diffusione virale per via aerea non è ancora ben definito. La trasmissione aerea del virus dipende dalla natura della matrice contenente il virus che sarà aerosolizzato e dalla sopravvivenza del virus nell'aria. I virus enterici possono essere, per esempio, aerosolizzati per vomito, flusso della toilette, irrigazione spray e vari processi all'interno degli impianti di trattamento delle acque reflue. Le particelle virali aerosolizzate possono andare a depositarsi sulle superfici circostanti, così come sul cibo, piante e vestiti. Tramite tale meccanismo vengono ad essere contaminate anche tutte quelle superfici come le maniglie delle porte, ringhiere per scale, asciugamani, giocattoli, telefoni, tazze e tessuti che pur non entrando a contatto diretto con la matrice contaminata sono implicati nella trasmissione di virus enterici. Materiale fecale o vomito possono contaminare le superfici e da qui i virus possono poi essere ingeriti per contatto diretto con esse o trasferiti con le mani (Rodriguez-Lazaro et al., 2013).

Il flusso della toilette, per esempio, può aerosolizzare una quantità significativa di virus. Una volta rilasciato nell'ambiente, il movimento e il destino del virus dipende da molteplici fattori come la concentrazione del virus e fattori ambientali (temperatura, umidità, ventilazione) (Rosa et al., 2013).

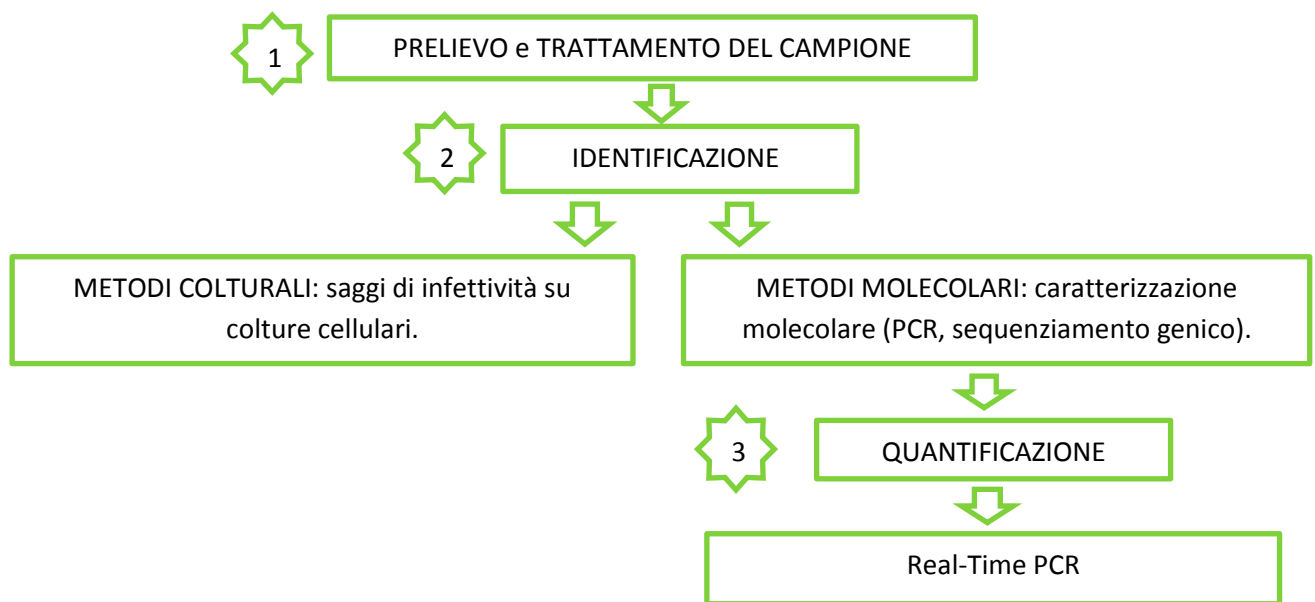
AEROSOL: il Bioaerosol viene definito come aerosol o particolato di origine microbica, vegetale o animale, i termini sono spesso utilizzati come sinonimo di polveri organiche. Il Bioaerosol consiste in batteri patogeni e non, vivi o morti, funghi, virus, allergeni, endotossine batteriche, micotossine, peptidoglicani, fibre vegetali e polline sospese in aria. Solo nell'ultimo decennio è aumentato l'interesse per questa matrice che si ritiene responsabile di numerosi casi di malattia. L'esposizione ad agenti biologici aerosolizzati provoca effetti sulla salute sia in ambiente lavorativo che di vita, con un enorme peso sulla sanità pubblica. (Douwes et al., 2003).

Negli impianti di trattamento delle acque reflue ogni fase che comporti un movimento meccanico o un meccanismo con aria forzata è in grado di generare bioaerosol, il quale può così contenere i microrganismi patogeni che erano presenti nelle acque reflue, diventando un



potenziale rischio per la salute dei lavoratori e di coloro che abitano nelle vicinanze degli impianti di depurazione. (Han et al., 2013; Carducci et al. 2000; Divizia et al. 2008).

1.8 METODI PER L'IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI HUMAN ADENOVIRUS



(Staggemeier et al., 2015; La Rosa et al., 2014)

- Metodi colturali: saggi per testare la vitalità e l'infettività di *Human Adenovirus* che è fatto crescere su differenti linee cellulari. In seguito viene valutato il suo eventuale effetto citopatico diretto. Non tutti i ceppi di *Human Adenovirus* riescono però ad essere coltivati, ad esempio *Human Adenovirus* tipo 40 e 41 non crescono su colture cellulari (Peter Wyn-Jones et al., 2011).
- Metodi molecolari: real-time PCR (qPCR) per quantificare la presenza di *Human Adenovirus*.

I metodi molecolari si rivelano più sensibili, rapidi e specifici, rispetto a quelli colturali, nell'identificare e quantificare i virus nelle matrici ambientali. Il sequenziamento genico dei frammenti amplificati permette inoltre di identificare i tipi virali presenti e di effettuare studi di epidemiologia molecolare e analisi filogenetiche. Di contro tali metodiche non forniscono dati sulla vitalità e infettività del virus (La Rosa et al., 2014).

2. SCOPO

Gli indicatori convenzionali, riportati nelle leggi attualmente in vigore (*E. Coli*, *Enterococchi Intestinali* e *Coliformi fecali*) presentano molte limitazioni, che dovrebbero essere colmate per rendere i risultati sullo stato di contaminazione delle matrici idriche più affidabili. Tali indicatori hanno: un limitato tempo di sopravvivenza, una possibile provenienza non fecale, capacità di riprodursi nella colonna d'acqua, bassa resistenza ai processi di disinfezione, incapacità di identificare sorgenti di contaminazione fecale e bassa sensibilità ai mezzi di rilevamento (Nusca et al., 2008). In molti casi la presenza/assenza di tali indicatori nella matrice idrica presa in esame non è correlabile con la presenza di *Enterovirus* in particolare *Human Adenovirus*.

Data l'elevata incidenza dei casi di gastroenterite legati al consumo di acqua contaminata da liquami risulta molto importante la ricerca di virus enterici responsabili di questi disturbi. Raramente tali virus vengono ricercati e associati ai casi di malattia occorsi tra coloro che sono entrati in contatto con matrice idrica contaminata. Risulta quindi utile e opportuno andare a individuare un virus come patogeno indice per predire una contaminazione biologica. Nessuna norma però prevede la ricerca di virus enterici nelle matrici idriche e nello specifico *Human Adenovirus* come indicatore di contaminazione biologica.

Infatti tra tutti i virus enterici quello che maggiormente si presta, per le sue caratteristiche, ad essere un ottimo indicatore di contaminazione biologica in differenti matrici idriche è *Human Adenovirus*.



Molti studi, su matrici idriche e non (acque reflue trattate e non, acque ad uso ricreativo, acque superficiali, liquami, superfici e aerosol) hanno rilevato *Human Adenovirus* come patogeno prevalente, ad esempio su 54 campioni di acque trattate il 12.9% era positivo per Human Adenovirus contro il 2.1% positivo per Rotavirus. Mentre su 54 campioni di acqua di fiume il 77.6% era positivo per Human Adenovirus contro il 55.2% Enterovirus, 20.7% per Reovirus, 6.9% per virus dell'Epatite A, 6.9% per Rotavirus e Sapovirus . (Silva et al., 2011)

In oltre la disinfezione con Cloro o con raggi UV non assicura la completa eliminazione di *Human Adenovirus* che una volta rilasciato nell'ambiente risulta essere molto più resistente rispetto a batteri e altri virus, è così necessario considerare *Human Adenovirus* un indicatore molto più attendibile rispetto ai classici indicatori, tutt'oggi in uso, che non sono più strettamente correlabili con la presenza di virus patogeni.

Negli anni passati la rilevazione dei virus nelle matrici idriche risultava lunga, difficoltosa e costosa, mentre oggi grazie alla disponibilità di tecniche molecolari, come la PCR-RT, si può eseguire una facile e rapida rilevazione (Wyer et al., 2012).

Partendo da tali presupposti questo lavoro ha lo scopo di ricercare *Human Adenovirus* in differenti matrici idriche per evidenziare il suo possibile ruolo di indicatore confrontandolo con parametri tradizionali.

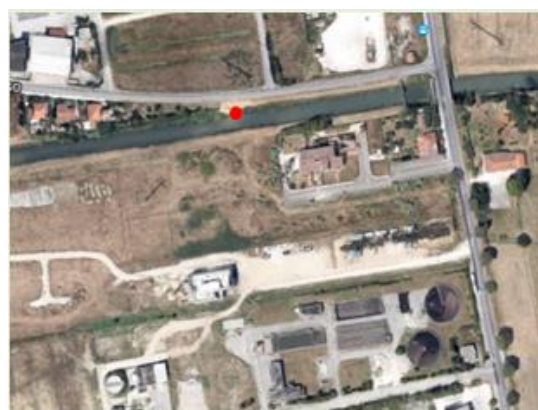
3. MATERIALE E METODI

Questo lavoro si è articolato in tre fasi:

1. Raccolta dei campioni: acqua di mare, acqua di fiume, acqua trattata destinata al consumo umano e liquame in entrata e uscita del depuratore,
2. Trattamento dei campioni con metodi colturali e molecolari per l'identificazione e quantificazione di *Human Adenovirus* e dei classici indicatori di contaminazione: *E. Coli*, *Enterococchi intestinali*, *Colifagi Somatici*.
3. Elaborazione e confronto dei dati ottenuti.



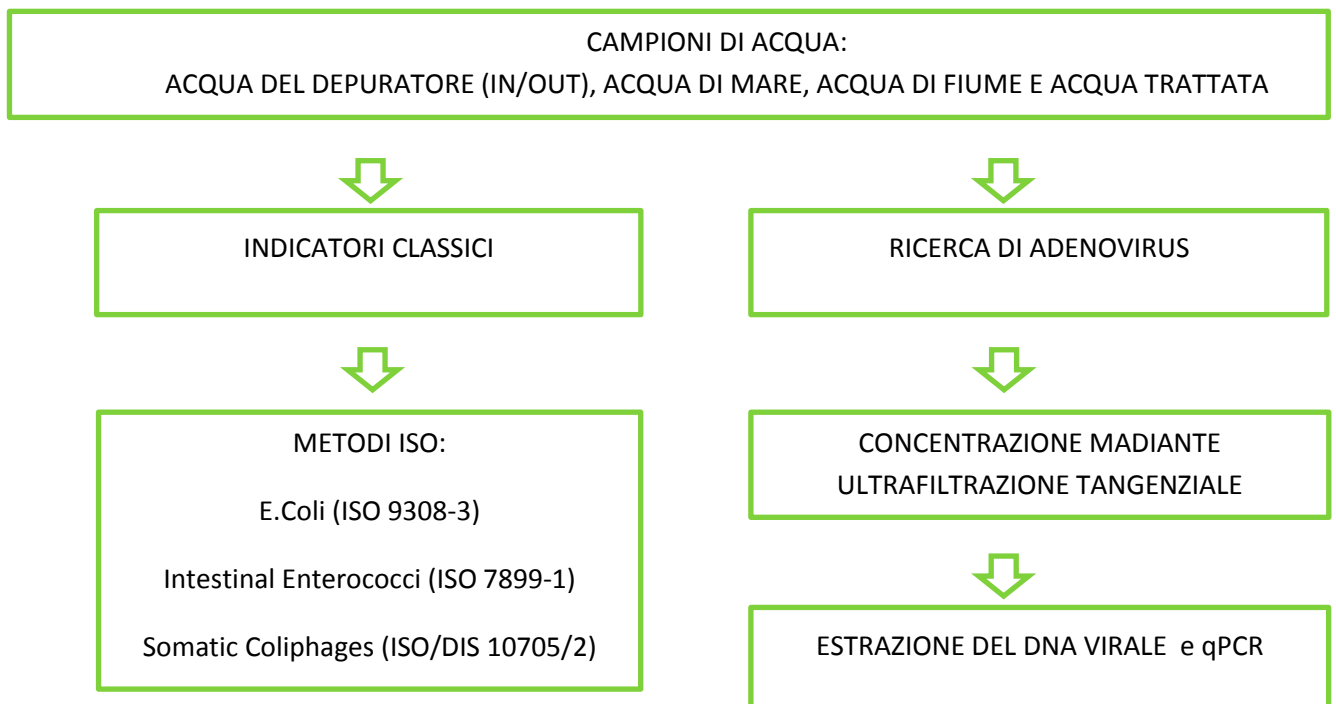
3.1 CAMPIONAMENTO



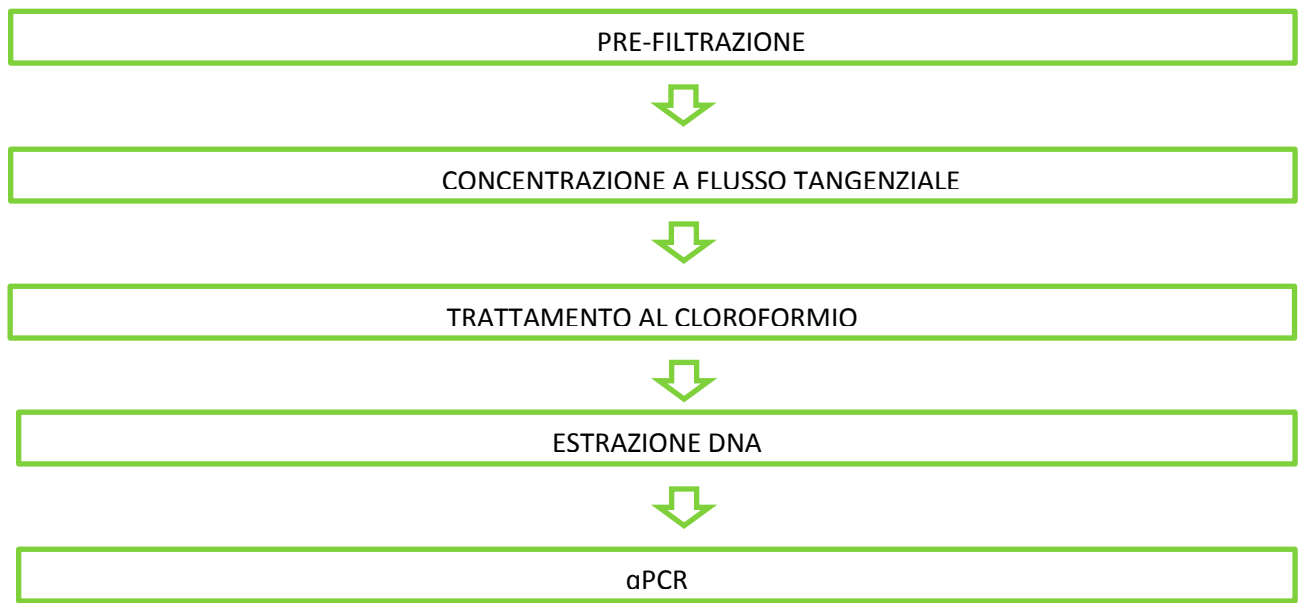
I campioni utilizzati per questo lavoro di tesi sono matrici idriche provenienti da diversi lavori di monitoraggio ambientale effettuate nel laboratorio di Igiene.

Nello specifico si sono trattati:

- 12 campioni di acqua di mare, provenienti dalla costa adiacente al Parco di San Rossore, prelevati mensilmente per dodici mesi.
- 11 campioni di acqua del fiume Morto, interno alla tenuta di San Rossore, prelevati mensilmente per undici mesi.
- 15 campioni di acqua di fiume trattata mediante ultrafiltrazione (impianto pilota), prelevati mensilmente per quindici mesi.
- 12 campioni di liquame in entrata nel depuratore di San Jacopo, prelevati mensilmente per dodici mesi.
- 12 campioni di liquame in uscita dal depuratore di San Jacopo, prelevati mensilmente per dodici mesi.



3.2 Ricerca di *Human Adenovirus*:



L'analisi virologica dei campioni è stata eseguita attraverso due fasi, la prima comprende una pre-filtrazione, necessaria per eliminare i residui più grossolani, la seconda si basa sulla filtrazione a flusso tangenziale a due stadi (Carducci et al. 1994).

PRE-FILTRAZIONE

Il campione viene filtrato, con l'utilizzo di una pompa a vuoto, attraverso una membrana in polipropilene con porosità pari a 10 µm, in modo tale da eliminare la parte più grossolana.

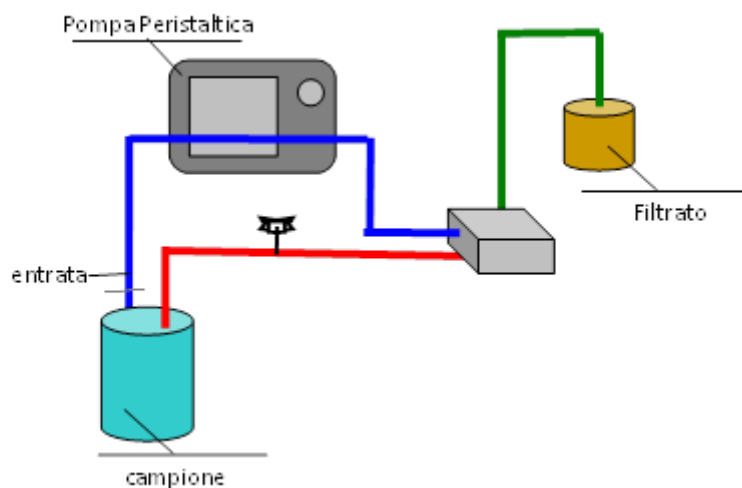
La membrana, in seguito alla filtrazione, viene eluita con 20 ml di estratto di carne al 3% a pH 9; agitata a mano per 10 minuti e centrifugata a 3500 rpm per 15 minuti, per poter recuperare le particelle virali che possono rimanere adese al prefiltro.

Il surnatante viene recuperato e cumulado al campione prefiltrato che viene così sottoposto alla filtrazione a flusso tangenziale.

CONCENTRAZIONE A FLUSSO TANGENZIALE

La tecnica dell'ultra-filtrazione o filtrazione a flusso tangenziale, prevede l'utilizzo di una pompa peristaltica (apparato Mini-ultrasette -Omega OC- Pall) dotata di una membrana in polisulfone con taglio molecolare di 10 KD .

Figura: Schema dell' apparato di ultrafiltrazione a flusso tangenziale



L'impiego di queste membrane è dovuto alla loro elevata capacità di recuperare virus, soprattutto enterovirus (Carducci et al., 1994), e i batteriofagi (Donia et al., 1998, Grabow., 2001).

La tecnica dell'ultrafiltrazione avviene attraverso due stadi successivi che differiscono per il volume iniziale di campione, che deve essere concentrato e per la quantità dei soluti, che nella seconda fase sono la metà dei volumi della prima.

Inizialmente si effettua il condizionamento della membrana facendo passare 2 litri di acqua deionizzata a perdere (1 litro nella seconda fase), per eliminare la soluzione di mantenimento della membrana stessa, la quale viene caricata con 300 ml di estratto di carne al 3% a pH 7 (100 ml per la riconcentrazione) a ricircolo per 10 minuti, per saturare i siti attivi ed evitare l'adsorbimento dei virus.

Si procede, quindi, con la concentrazione del campione (10 litri) a ricircolo, ad una pressione costante di circa 1 bar, in maniera da ottenere un volume di concentrato pari a 500 ml nella prima fase e 50 ml nella seconda fase.

Al termine della concentrazione la membrana, sulla quale possono essersi adsorbite particelle virali, viene eluita con 200 ml (20 ml per il secondo stadio) di estratto di carne al 3% a pH 9 per 10 minuti a ricircolo e successivo cumulo dell'eluato al concentrato.

Il campione concentrato viene neutralizzato con HCl 1 N e conservato a - 80° C (Mendez et al., 2002) fino alla sua analisi.

La membrana viene a questo punto sanitizzata facendo passare 1 litro di soluzione di ipoclorito di sodio all'1 ‰ a perdere (500 ml per la seconda fase); la stessa soluzione viene poi fatta passare per altre due volte a ricircolo per 15 minuti. Per eliminare l'ipoclorito si passano a perdere 2 litri di acqua deionizzata (1 litro per la fase di riconcentrazione), la membrana viene, poi, mantenuta con una soluzione di NaOH 0.05 N in 500 ml (250 ml) che viene fatta passare per 4 minuti.

TRATTAMENTO AL CLOROFORMIO

Prima di procedere alla determinazione dei *Human Adenovirus* i campioni concentrati devono essere sottoposti a trattamento al cloroformio per abbattere la componente batterica. La quantità di

cloroformio che viene aggiunta è in rapporto 1:10, si agita manualmente per 15 minuti e si centrifuga a 3500 rpm per 15 minuti, al termine dei quali viene recuperato il surnatante e conservato a -20° C.

ESTRAZIONE DNA

Protocollo di estrazione QIAamp DNA mini kit, QIAGEN

Questa procedura si basa su un filtro in grado di trattenere gli acidi nucleici. Il protocollo prevede una fase di lisi, effettuata mediante l'aggiunta al campione della proteinasi K e di una apposita soluzione di lisi (AL). Dopo la fase iniziale di lisi si procede con la fase di legame in cui, attraverso l'aggiunta di etanolo, si favorisce l'adsorbimento specifico del DNA alla membrana di gel di silice posta all'interno delle micro-colonnine fornite col kit. Dopo una serie di lavaggi della membrana si effettua l'eluizione della stessa per recuperare il materiale genetico che è stato trattenuto dal filtro.

Il protocollo schematico è il seguente:

- Aggiungere a 200 μ l di campione 20 μ l di proteinasi K e 200 μ l di buffer AL;
- Dopo un passaggio sul vortex, incubare a 56° C per 10 minuti;
- Aggiungere 200 μ l di etanolo e trasferire il tutto in una apposita micro-colonnina;
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;
- Scartare il tubo del filtrato e sostituirlo con un nuovo tubo;
- Aggiungere 500 μ l di wash buffer 1;
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;
- Scartare il tubo del filtrato e sostituirlo con un nuovo tubo;
- Aggiungere 500 μ l di wash buffer 2;

- Centrifugare a 14000 rpm per 3 minuti;
- Piazzare il filtro all'interno di una eppendorf sterile;
- Aggiungere 100 µl di elution buffer;
- Centrifugare a 8000 rpm per 2 minuti;
- Rimuovere i filtri e conservare le eppendorf a -80°C.

PCR REAL TIME QUANTITATIVA PER *HUMAN ADENOVIRUS* (qPCR)

In questa metodica ci si avvale di un controllo ottico passivo costituito da un terzo colorante non coniugato (rodamina, ROX) presente in concentrazione costante nella miscela di reazione.

Questo fluorocromo non è sottoposto all'azione nucleasica della polimerasi e rappresenta, quindi, un riferimento interno con cui può essere normalizzato il segnale emesso dal reporter.

Per la quantificazione della carica virale è necessario avere a disposizione una serie di standards a titolo noto tramite i quali il software traccia una curva di taratura, dalla quale viene dedotta la concentrazione dei campioni presi in esame. A tale scopo sono stati utilizzati standard già in uso in laboratorio di cui si conosce con precisione il titolo.

I campioni presi in esame sono stati analizzati in piastre ottiche a 96 pozzetti. Il protocollo, descritto da Henroth et al. (Henroth BE 2002), prevede l'utilizzo dei seguenti primers e della probe:

TIPO DI VIRUS	REGIONE	SEQUENZA primers	RIF. BIBLIOGRAFICO
<i>Human Adenovirus</i>	HEXON	AdF (100 µM): 5'-CWTACATGC ACATCKCSGG-3' AdR(100µM): 5'RCGGGCRAAYTGCACCAG-3' AdP1(100 µM): 5'-FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA-3'	Hernroth et al., 2002

Il protocollo utilizzato, descritto da Henroth e colleghi (2002), è stato adottato a seguito della partecipazione del laboratorio al progetto europeo Virobathe inerente la ricerca di adenovirus in acque ricreative. Il protocollo è risultato estremamente efficiente nella sua applicazione per il monitoraggio dell'efficienza di rimozione virale nei depuratori. I primer e la probe utilizzati hanno le seguenti sequenze:

AdF: 5'-CWT ACA TGC ACA TCK CSG G-3'

AdR: 5'-RCGGGCRAAYTGCACCAG-3'

AdP1: 5'-FAM CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA-3'

I primers e la probe sono specifici per la regione conservata della prima parte del gene dell'esone che codifica per proteine strutturali virali (Hernroth BE 2002).

Inizialmente è stata preparata la miscela di reazione contenente oltre ai primers e alla probe, anche la TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem) alla concentrazione finale 2X. Quest'ultima contiene la polimerasi AmpliTaq Gold, l'enzima AmpErase uracil-N-glycosilase (UNG) e i nucleotidi in cui dTTP è sostituito da dUTP, incorporato nella sintesi TaqMan al posto di dTTP. L'enzima UNG agisce sul DNA a doppio filamento tagliando la base uracilica e creando un sito apirimidinico che blocca la sintesi da parte della DNA polimerasi e rende la doppia elica molto sensibile all'idrolisi acido basica. In questo modo viene impedita l'ulteriore amplificazione dei prodotti delle precedenti reazioni di PCR, attraverso la degradazione di quei siti genomici che contengono dUTP.

1. Reagenti:

	CONCENTRAZIONE DELLA SOLUZIONE STOCK	CONCENTRAZIONE FINALE	VOLUME A REAZIONE (ML)
Master Mix 2 x	2x	1x	12.50
Primer 1 AdR	22,5 uM	0,9 uM	1
Primer 2 AdF	22,5 uM	0,9 uM	1
Sonda AdPU	11,25 uM	0,225 uM	0.5
Estratto DNA			10
Volume totale (µl)			25

2. Protocollo termico

FASI	TEMPERATURA	TEMPI	
Step 1	50°C	2 minuti	Attivazione Uracil-NGlycosylase
Step 2	95°C	10 minuti	Attivazione Taq
Step 3	95°C 60°C	15 secondi 1 minuto	Amplificazione e rilevazione dati

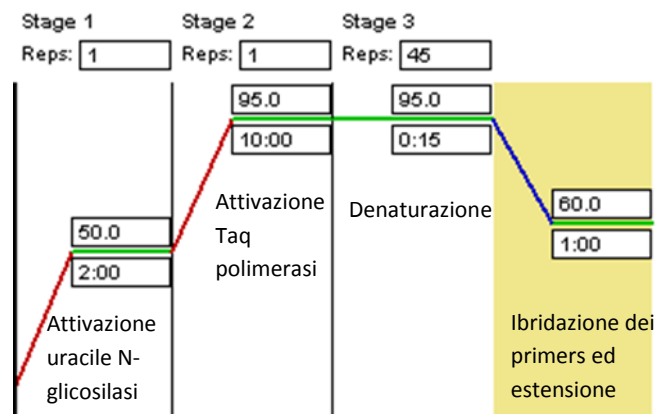
L'enzima UNG è attivo alla temperatura di 50°C e viene poi inibito alla temperatura di denaturazione, prima della caratteristica reazione di PCR.

Preparata la miscela, è stata caricata una aliquota di 15 µl in tutti i pozzetti; successivamente, in alcuni pozzetti sono stati aggiunti 10 µl di campione, in altri 10 µl dello standard opportunamente diluito (da 10⁸ a 10² copie/ml). Inoltre, per verificare che la miscela preparata non abbia subito contaminazioni, sono stati inseriti nella reazione dei controlli negativi che contengono, oltre alla mix, 10 µl di acqua al posto dell'estratto del campione di interesse.

Il campione, gli standards e il controllo negativo sono stati ripetuti in triplo.

La micropietra è stata poi coperta da un adesivo di qualità ottica prima del suo inserimento nello strumento.

L'amplificazione avviene secondo le seguenti fasi schematizzate in figura:



3.3 RICERCA DI *E. Coli*, Enterococchi intestinali e *Colifagi somatici*

RICERCA INDICATORI BATTERICI

La ricerca di *E. Coli* ed *Enterococchi intestinali* è stata effettuata su tutti i campioni attraverso i metodi ISO 9308-3(per *E. coli*) e ISO 7899-1 (per Enterococchi).

Il campo di applicazione di questi metodi comprende le acque di balneazione, superficiali e reflue. Questi metodi prevedono l'inoculo del campione, previa diluizione, in una serie di pozzetti su micropiastre (metodo miniaturizzato) contenenti il terreno di coltura disidratato.

Le micropiastre sono analizzate sotto lampada di Wood (UV a 366 nm), al buio dopo un periodo di incubazione da 36 a 42 ore a 44°C.

La presenza di *E.coli* è indicata dalla fluorescenza blu risultante dall'idrolisi del 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG), mentre la presenza di *Enterococchi intestinali* è indicata sempre da fluorescenza risultante dall'idrolisi del 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside (MUD); i risultati sono elaborati, in seguito alla conta del numero di pozzetti positivi delle differenti diluizioni, attraverso la metodica dell'MPN.

RICERCA DEI COLIFAGI SOMATICI

La ricerca e la quantificazione dei *Colifagi somatici* è stata effettuata secondo la norma ISO/DIS 10705-2 .

Sono state preparate aliquote da 2,5 ml di ssMSA (semisolid Modified Scholtens' Agar) con CaCl₂, per favorire l'attacco dei fagi sui batteri, e mantenute in stato liquido a bagnomaria alla temperatura di circa 45°C.

A ciascuna aliquota sono stati aggiunti:

- 1 ml della coltura di *E. coli* C (ATCC 13706) in fase esponenziale di crescita, preparata facendo crescere i batteri per circa 3 h a 37°C in MSB (Modified Scholtens'Broth) (Assorbanza = 0,35 a 640 nm misurato con spettro-fotometro come in figura 3.6a).



Ad assorbanza pari a circa 10^8 CFU/100ml ($A=0,35$ a 640nm o 520nm) viene prelevato l'inoculo dal termostato e raffreddata velocemente la coltura ponendola in ghiaccio.

fig. Misurazione dell'assorbanza

- 1 ml del campione idrico ed una serie di diluizioni in duplicato (in base al tipo di campione: 1:10 per l'acqua di mare, 1:10²-1:10³ per l'acqua del fiume e per il liquame in uscita dal depuratore ed infine 1:10²-1:10³-1:10⁴ per il liquame non trattato).

Per ogni serie di campioni sono stati eseguiti anche:

- ✓ due negativi procedurali, utilizzando al posto dei campioni l'MSB ed il terreno usato per le diluizioni;
- ✓ un controllo positivo di riferimento utilizzando una diluizione decimale del batteriofago Φ X174 (ATCC B1-13706).

La miscela così ottenuta è stata poi mescolata e versata su 2 piastre Petri, da 9 cm di diametro, precedentemente preparate con uno strato di 20 ml di MSA (Modified Scholtens' Agar). Le piastre sono state fatte asciugare e poi incubate a 37°C per 18±2 h.

La lettura è stata eseguita contando il numero delle placche di lisi visibili sulle piastre tenendo conto del fattore di diluizione e della concentrazione. I risultati sono stati espressi in UFP/100ml.

3.4 ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI

I dati ottenuti sono stati elaborati per ottenere la media e la deviazione standard, delle concentrazioni, e normalizzati mediante l'uso di funzioni logaritmiche con il programma Microsoft Excel 2010.

Successivamente si è effettuato il calcolo della regressione multipla con il programma MedCalc, l'analisi statistica è stata fatta sui valori logaritmici anche se nella tabella (paragrafo 4.3) sono riportati i valori in base al metodo di ricerca utilizzato.

Per tale analisi i campioni risultati negativi per i parametri in studio sono stati enumerati come il valore minimo della sensibilità della tecnica utilizzata, ovvero:

- 5 CG/ml per *Human Adenovirus*
- 15 ufc/ml per *E. Coli*, Enterococchi e Colifagi .

4. RISULTATI

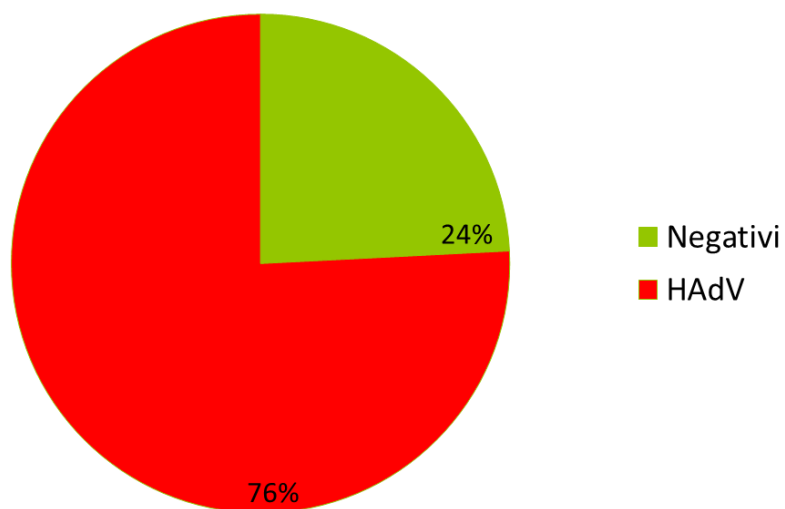
In totale si sono elaborati i dati di 62 campioni derivanti da differenti matrici idriche:

- 12 campioni di acqua di mare
- 11 campioni di acqua di fiume
- 15 campioni di acqua destinata alla potabilizzazione
- 12 campioni di liquame in entrata nel depuratore
- 12 campioni di liquame in uscita dal depuratore

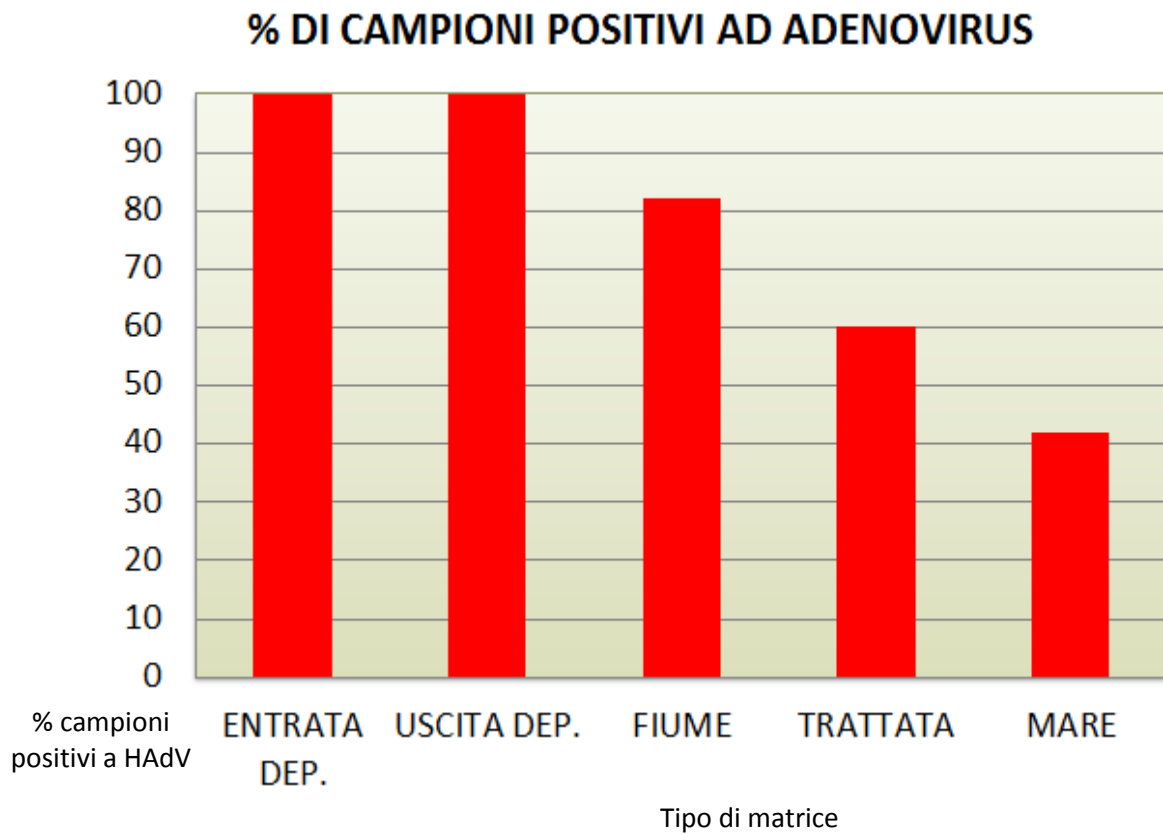
4.1 MONITORAGGIO DELLE MATRICI IDRICHE PER *HUMAN ADENOVIRUS*

Il 76% di essi è risultato positivo alla presenza di *Human Adenovirus*:

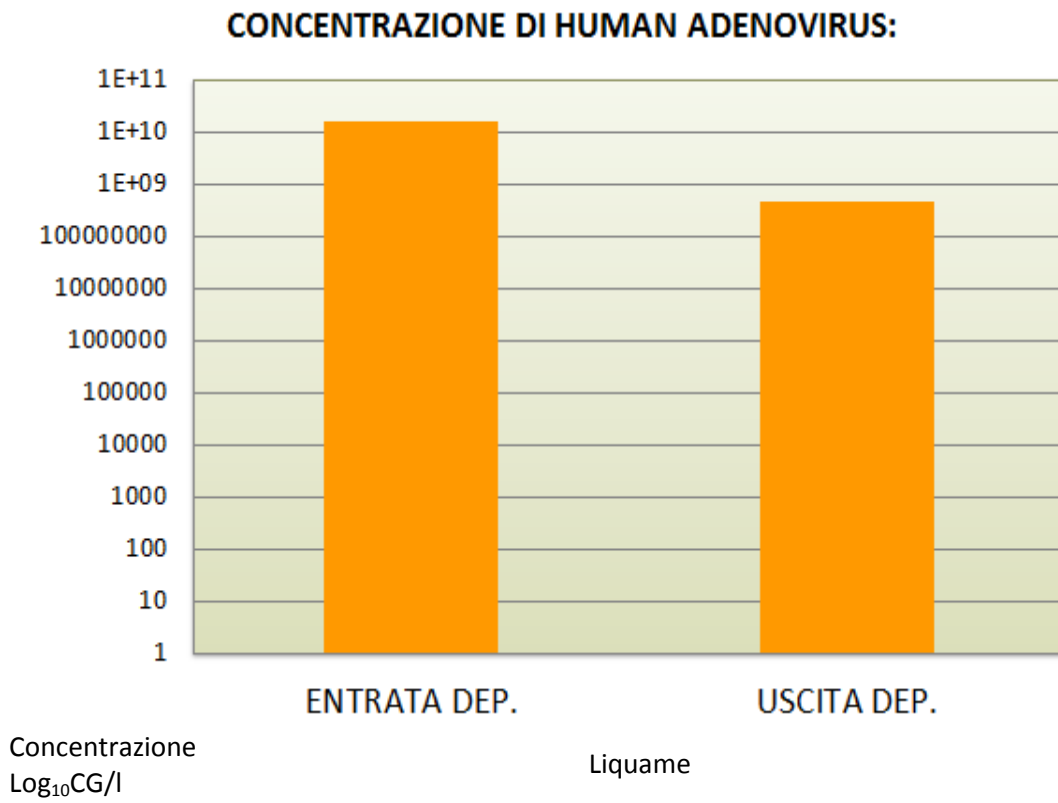
CAMPIONI RISULTATI POSITIVI PER HAdV:



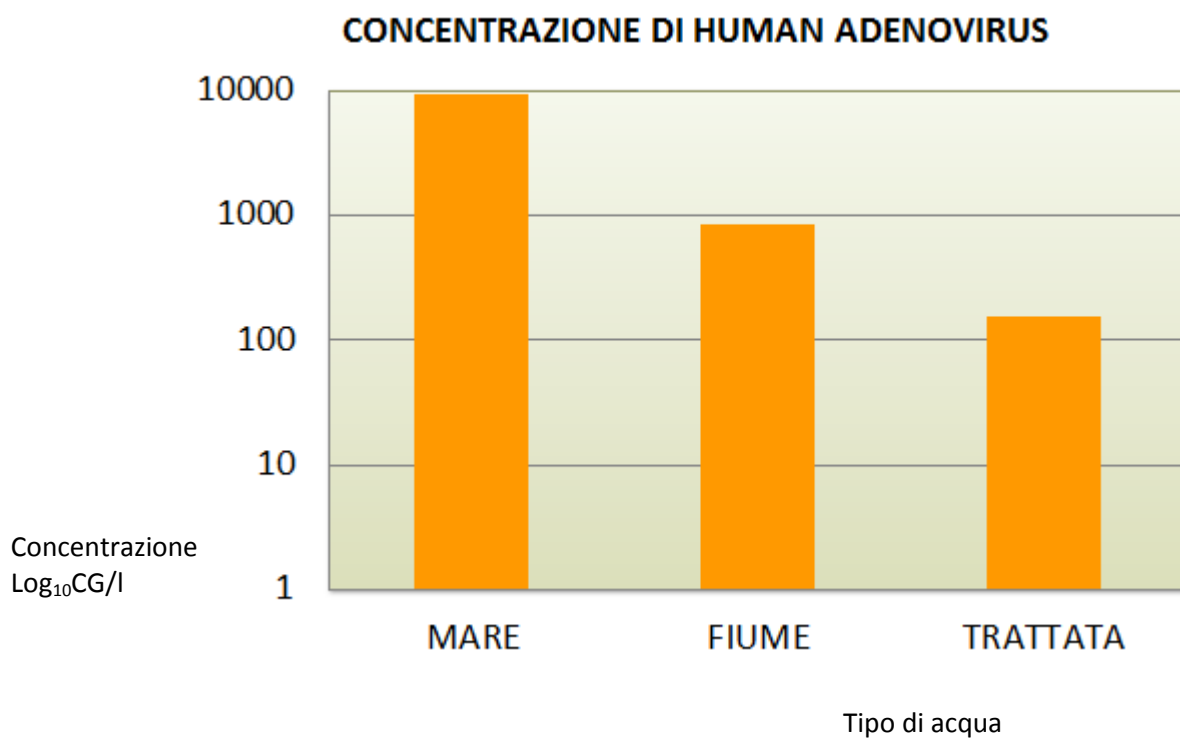
In particolare i campioni di liquame in entrata e uscita dal depuratore risultano contaminati da *Human Adenovirus* nella loro totalità, mentre i campioni di acqua di fiume sono contaminati per l' 82%, seguiti dai campioni di acqua trattata (60%) e di acqua di mare (42%) .



Le concentrazioni di *Human Adenovirus* ($\text{Log}_{10}\text{CG/l}$) sono elevatissime nei liquami sia trattati che non:



Mentre seppur minori, rispetto ai liquami, le concentrazioni di Human Adenovirus risultano abbastanza elevate anche nelle altre tre matrici idriche:

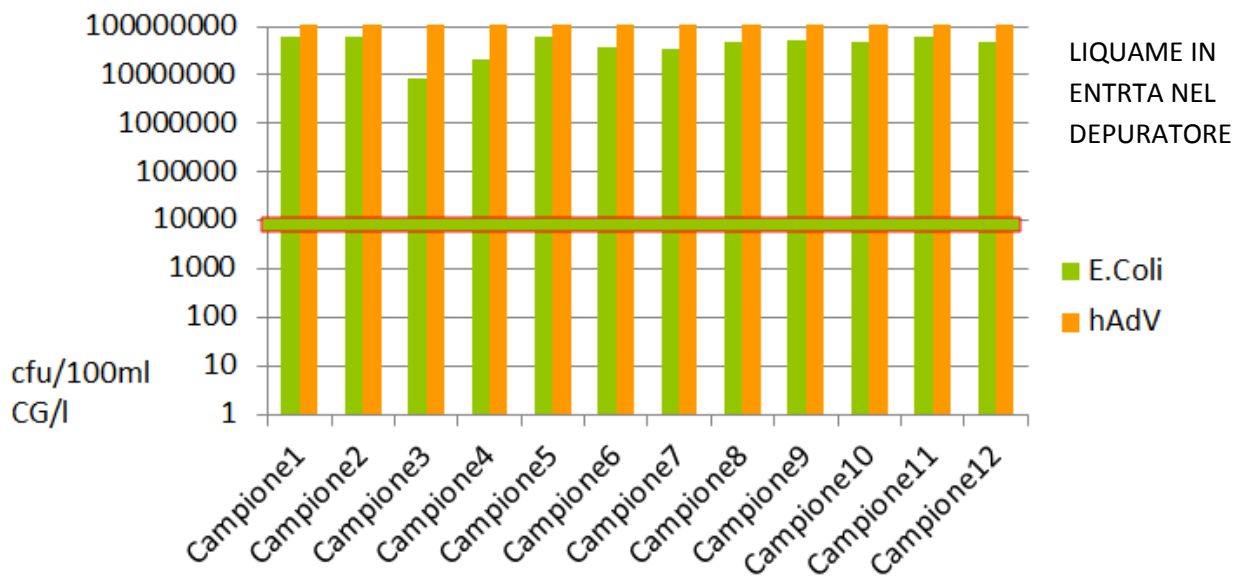


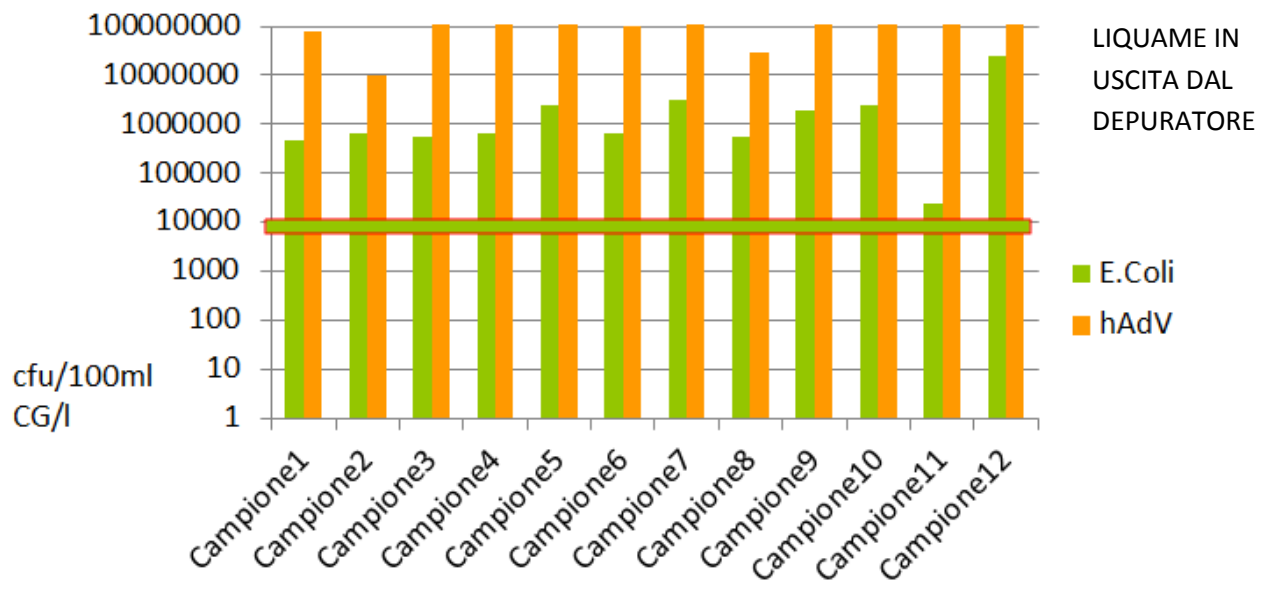
4.2 MONITORAGGIO DELLE MATRICI IDRICHE PER *E. COLI* e ENTEROCOCCHI INTESTINALI

Negli stessi campioni sono state misurate le concentrazioni degli indicatori previsti dalla legge (*E. Coli* e *Enterococchi Intestinali*), riportate poi in un istogramma per confrontare tali valori con le concentrazioni limite previste dalla legge stessa, la concentrazione degli indicatori è espressa in cfu/100ml mediante scala logaritmica (\log_{10}).

Liquame:

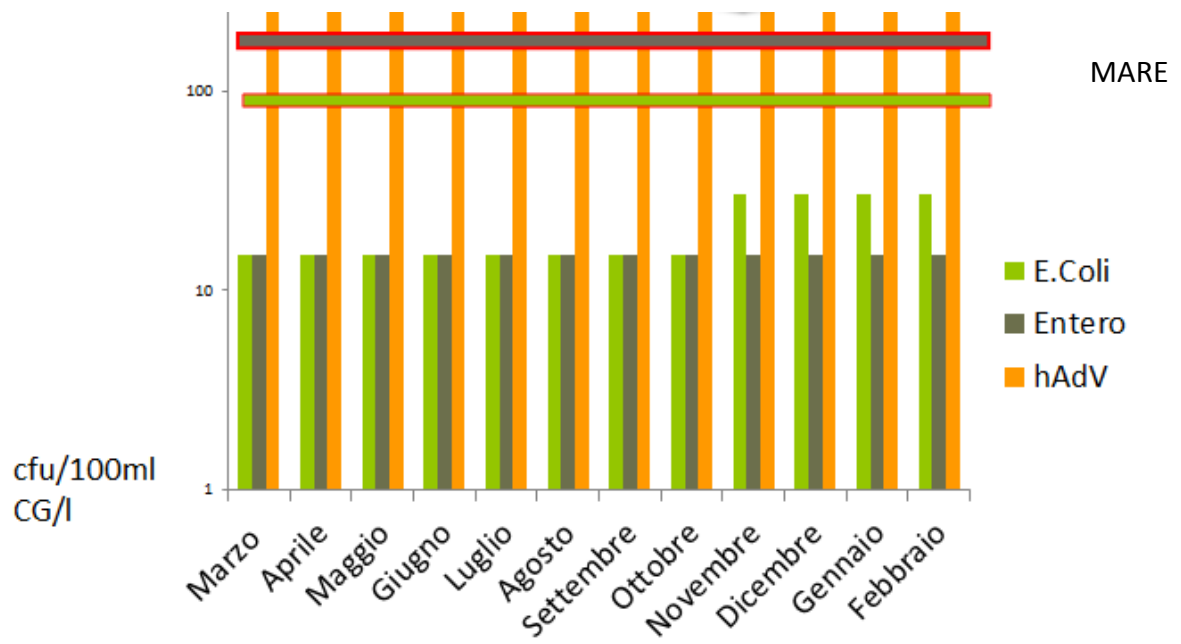
Il D.Lgs. 152/2006 pone come limite massimo 5000 ufc/100ml (evidenziato in rosso) per *E. Coli* mentre gli *Enterococchi I.* non sono contemplati.





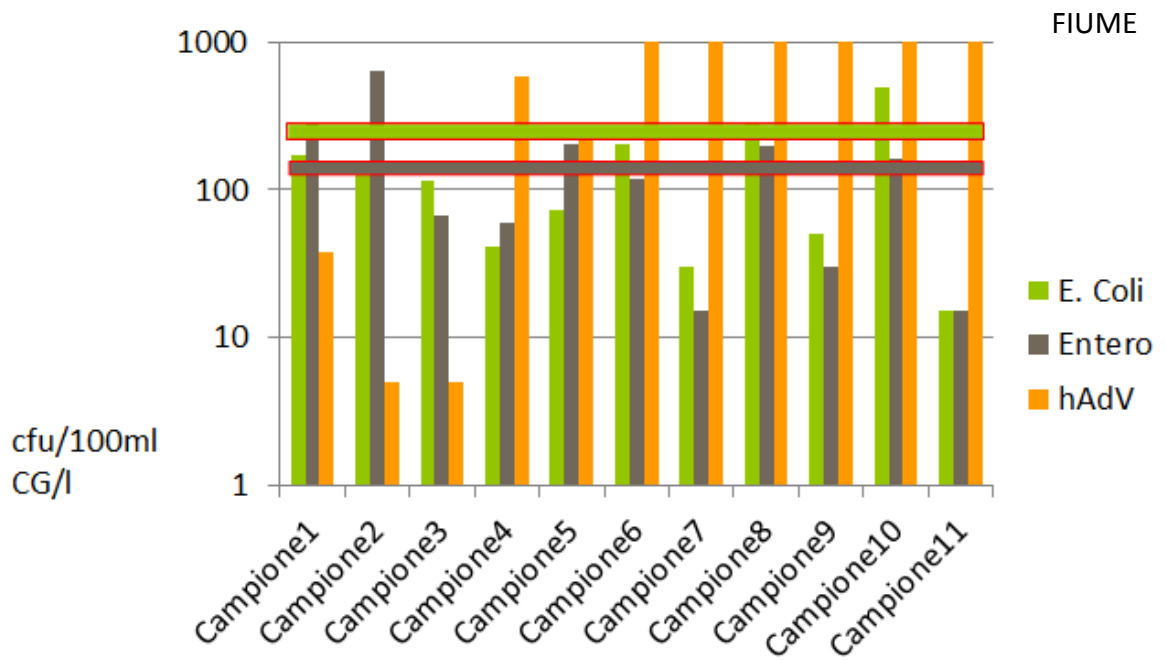
Mare:

La direttiva europea 2006/07/CE sulle acque di balneazione pone come limite massimo 250 ufc/100ml per *E. Coli* mentre 100 ufc/100ml per gli *Enterococchi I.*



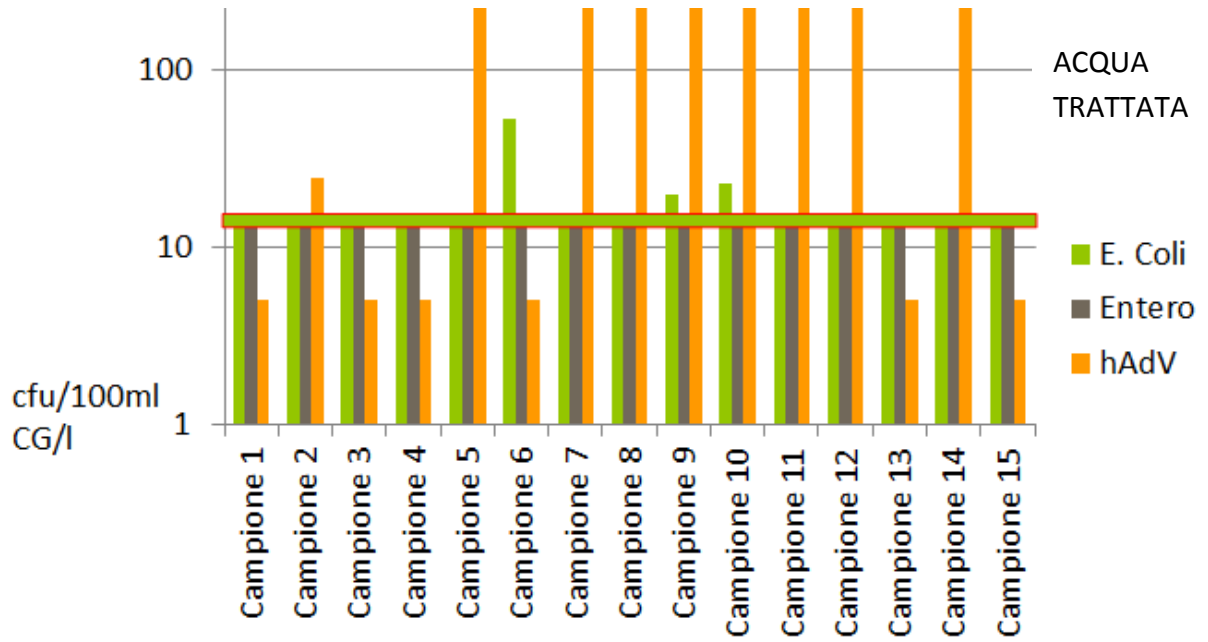
Fiume:

Anche per l'acqua di fiume bisogna far riferimento alla direttiva europea 2006/07/CE sulle acque di balneazione pone come limite massimo 250 ufc/100ml per E. Coli mentre 100 ufc/100ml per gli Enterococchi I.



Acqua trattata:

Il D.Lgs 31/2001 prevede che nelle acque trattate destinate ad alla potabilizzazione siano assenti sia *E. Coli* che gli *Enterococchi* I. .



4.3 CONCENTRAZIONI MEDIE E REGRESSIONE MULTIPLA

Nella seguente tabella sono indicate le concentrazioni medie di *Human Adenovirus* e degli indicatori classici di contaminazione (*E. Coli*, *Enterococchi I.*, *Colifagi*) rilevate nelle diverse matrici idriche. Nell'ultima colonna invece è riportato il valore P ottenuto con il calcolo della regressione multipla.

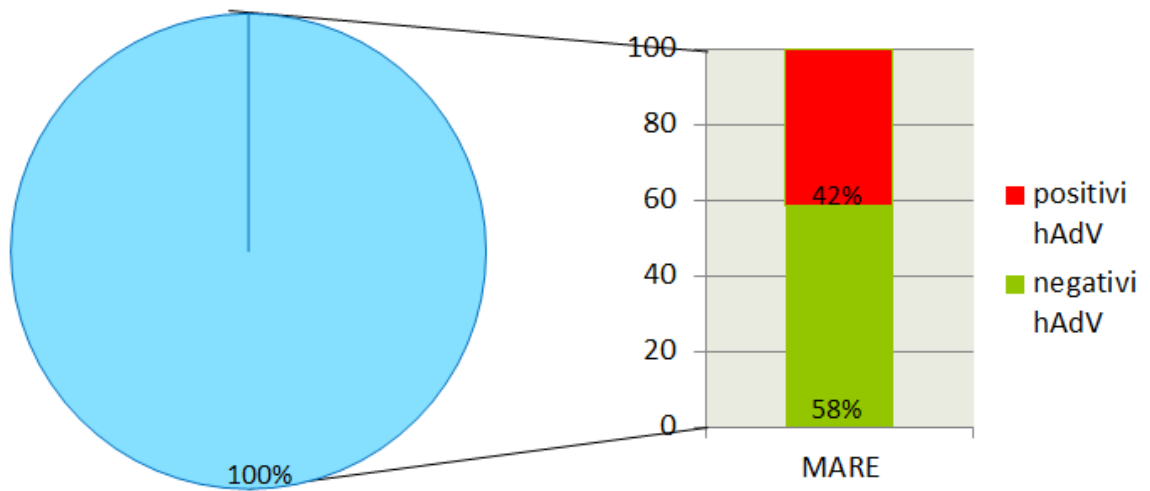
	ADENOVIRUS (CG/l)	E.COLI (UFC/100ml)	ENTEROCOCCHI (UFC/100ml)	COLIFAGI (UFC/100ml)	P (regressione multipla)
MARE	$9,3 \times 10^3 \pm 2,4$	$19 \pm 1,4$	$15 \pm 1,0$	$40 \pm 1,0$	P= 0,78
FIUME	$8,5 \times 10^2 \pm 27$	$93 \pm 2,8$	$91 \pm 3,4$	$1,7 \times 10^2 \pm 6,2$	<u>P= 0,04</u>
TRATTATA	$1,6 \times 10^2 \pm 31$	$17 \pm 1,4$	$15 \pm 1,0$	$10^6 \pm 3,9$	P= 0,91
ENTRATA DEPURATORE	$1,7 \times 10^{10} \pm 7,9$	$3,9 \times 10^7 \pm 1,8$	$1,4 \pm 2,0$	$1,6 \times 10^7 \pm 2,2$	P= 0,56
USCITA DEPURATORE	$4,7 \times 10^8 \pm 11$	$9,9 \times 10^5 \pm 5,0$	$6,3 \times 10^5 \pm 4,1$	$1,2 \times 10^5 \pm 2,3$	P= 0,85

4.4 POSITIVITÀ PER *HUMAN ADENOVIRUS* NEI CAMPIONI "A NORMA":

Tra i campioni che risultano conformi alla legge secondo i limiti stabiliti per *E. Coli* e/o *Enterococchi I.* si è ricercata la presenza di *Human Adenovirus*.

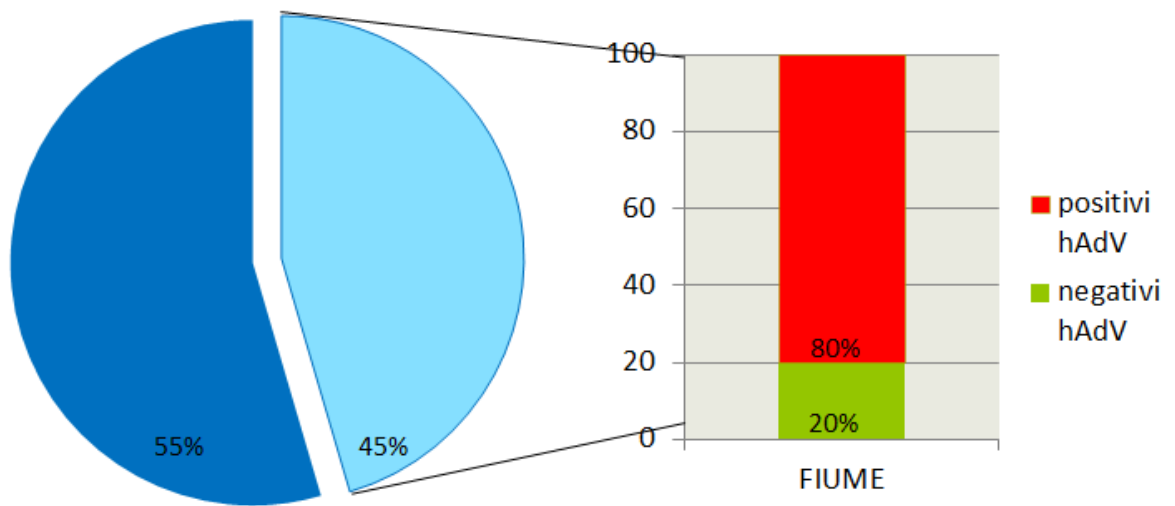
Mare:

Il 100% dei campioni è risultato a norma, ma tra essi in 42% contiene *Human Adenovirus*.



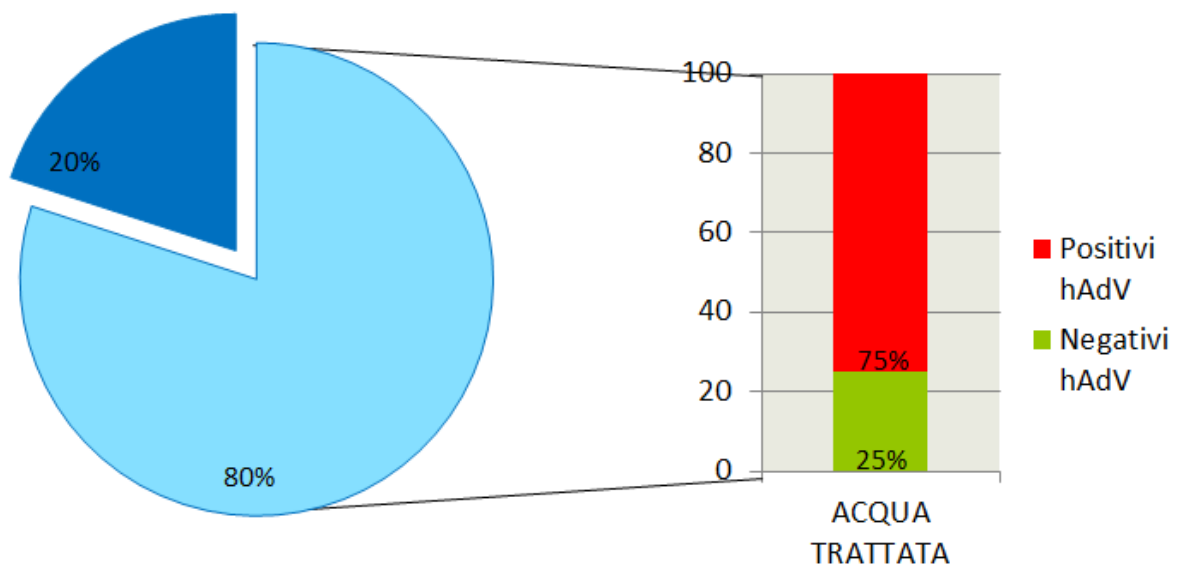
Fiume:

Il 45% dei campioni è risultato a norma ma tra essi l'80% contiene Human Adenovirus.



Acqua Trattata:

L'80% dei campioni è risultato a norma ma tra essi il 75% contiene Human Adenovirus.



5. DISCUSSIONE

La valutazione dello stato qualità delle matrici idriche è un argomento di grande interesse in tema di sanità pubblica. I microrganismi indicatori che tutt'oggi sono usati per tale valutazione sono: *E.coli* ed *Enterococchi Intestinali*, la normativa non prevede l'utilizzo di nessun indicatore virale.

Questi organismi risultano inattendibili in quanto non sono correlabili con la presenza di virus enterici.

Nello specifico, *Human Adenovirus* è un importante virus enterico ritrovato con grande frequenza nelle matrici idriche che causa di numerose patologie nell'uomo ed in particolare moltissimi casi di gastroenterite. (Dalla Vecchia et al., 2015). *Human Adenovirus* è risultato essere presente nel 76% dei campioni presi in analisi in questo lavoro di tesi. La prevalenza di questo virus nelle varie matrici idriche sottolinea ancora una volta quanto esso sia altamente resistente ai fattori ambientali e ai trattamenti fisico-chimici.

In particolare in tutti i 24 campioni di liquame in entrata (12) e in uscita (12) dal depuratore è presente *Human Adenovirus*, in accordo con quanto indicato da alcuni autori che rilevano *Human Adenovirus* nel 100% dei campioni di liquame trattato e non (Fong et al., 2010; Hundesa et al., 2006). In oltre in nessun campione il la concentrazione di *E. Coli* risulta essere entro il limite previsto dalla legge e la concentrazione di *Human Adenovirus* passa da $1,7 \times 10^{10} \pm 7,9$ CG/l per il flusso in ingresso a $4,7 \times 10^8 \pm 11$ CG/l per il flusso in uscita dal depuratore. Ciò mette ancora in evidenza il fatto che i liquami, seppur trattati, risultano un enorme fonte di contaminazione biologica per le matrici idriche ambientali. I metodi di disinfezione non sono atti a garantire la totale eliminazione dei virus dai liquami che, una volta usciti dal depuratore, vengono riversati nelle acque superficiali diventando una potenziale sorgente di contaminazione. (Hewitt et al., 2013; Bosch et al., 1998)

Gli 11 campioni di acqua di fiume che sono stati analizzati in questo lavoro di tesi contengono per l'82% *Human Adenovirus* con una concentrazione media di $8,5 \times 10^2 \pm 27$ CG/l, tale risultato è molto vicino a quello ottenuto da altri lavori su campioni di acqua di fiume, dove *Human Adenovirus* è ritrovato nel 90% (con concentrazione da 10^1 a 10^4 CG/l) (Albinana-Gimenez et al., 2009) e nel 96.3% dei campioni trattati (Jurzik et al., 2010). Tassi inferiori sono invece riportati in un lavoro di Dalla Vecchia e colleghi dove è stato ritrovato *Human Adenovirus* con una media del 54% per campioni provenienti da 8 punti differenti dello stesso fiume. In realtà per un sito in particolare la percentuale con cui è stato ritrovato *Human Adenovirus* è pressoché identica a quella rilevata in

questo lavoro di tesi, cioè 83%. Gli stessi autori sottolineano il fatto che potrebbero essere presenti fattori che interferiscono con una corretta analisi mediante qPCR, per i quali emergono percentuali più basse rispetto alla reale presenza di *Human Adenovirus*. (Dalla Vecchia et al., 2015).

Il 45% dei campioni di acqua di fiume analizzata in questo lavoro di tesi risultano di buona qualità secondo la normativa sulle acque di balneazione (2006/7/CE – D.Lgs. n. 116, 30-2008) ma il 75% di essi è positiva per *Human Adenovirus*.

Human Adenovirus è presente invece nel 60% dei campioni di acqua sperimentalmente trattata mediante ultrafiltrazione, che si sono presi in analisi con una concentrazione media di $1,6 \times 10^2 \pm 31$ CG/l. Tale risultato è di difficile comparazione con altri lavori poiché le metodiche di trattamento dell'acqua sono molto differenti. Per esempio in uno studio spagnolo *Human Adenovirus* era presente nell'11% dei campioni di acqua destinata alla potabilizzazione ma trattata col cloro (Albinana-Gimenez et al., 2009). In un altro studio simile *Human Adenovirus* è stato riscontrato nel 52,5% dei campioni di acqua trattata mediante coagulazione, flocculazione, decantazione, filtrazione, clorazione, e correzione del pH (Silva et al., 2015). Dei 15 campioni analizzati è emerso che l'80% risultano di buona qualità secondo la normativa sulle acque destinate al consumo umano (D.lgs. n. 31/2001) ma il 75% di essi è positivo per *Human Adenovirus*.

Per l'acqua di mare *Human Adenovirus* è risultato essere presente nel 42% dei campioni analizzati, con una concentrazione media di $9,3 \times 10^3 \pm 2,4$ CG/l. Tale dato risulta essere in accordo con quello ottenuto da uno studio sulle acque ricreative europee nel quale sono stati analizzati 1410 campioni di acqua marina e dolce e il 39,2% è risultato positivo alla presenza di virus e nello specifico il 36,4% a *Human Adenovirus* (Wyn-Jones et al., 2012), risultato del tutto simile a quello riportato nel lavoro di Fong et al. (36,6%) (Fong et al. 2005). I parametri previsti dalla legge per il controllo della qualità delle acque (*E.Coli* e Enterococchi) nei campioni di acqua di mare analizzati in questo lavoro di tesi risultano essere entro i limiti consentiti dalla legge, ovvero tutti i campioni (12) risultano di buona qualità secondo la normativa sulle acque di balneazione attualmente vigente (2006/7/CE – D.Lgs. n. 116, 30-2008) ma il 42% di essi è positiva per *Human Adenovirus*. L'acqua di mare può risultare così un importante sorgente di contaminazione soprattutto durante la stagione estiva.

La regressione multipla effettuata per ricercare un'eventuale correlazione tra la presenza/assenza dei classici indicatori di contaminazione previsti dalla legge (*E. Coli*, Enterococchi I.) e la presenza/assenza di *Human Adenovirus* ha fornito risultati di non correlazione tra i parametri presi in esame per tutte le matrici idriche (mare: $P = 0,78$ – acqua trattata: $P = 0,91$ – entrata depuratore: $P =$

0,56 – uscita depuratore $P = 0,85$) ad eccezione dei campioni di acqua di fiume ($P = 0,04$). Ciò evidenzia il fatto che per l'acqua di mare, l'acqua trattata, liquame in entrate e liquame in uscita dal depuratore non è possibile predire una contaminazione virale della matrice idrica in esame basandosi esclusivamente su i parametri citati dalla legge. Per l'acqua di fiume bisogna invece tenere in considerazione il fatto che essa è una matrice molto particolare in quanto riceve direttamente il liquame in uscita dal depuratore che, seppur trattato, presenta ancora un'alta concentrazione di *E. Coli*, Enterococchi e *Human Adenovirus*, in oltre non è soggetta al fenomeno della diluizione che invece avviene nel mare ne tantomeno subisce trattamenti come l'acqua sperimentalmente trattata mediante ultrafiltrazione. Tali fattori possono così aver inciso sul valore P che indica una certa correlazione tra *E. Coli* – Enterococchi I. e *Human Adenovirus*.

6. CONCLUSIONI

Quanto è emerso da questo lavoro di tesi conferma il fatto che le matrici idriche rappresentano un potenziale rischio per la salute pubblica. Diventa così utile e necessario, come suggerito anche dall'OMS e dall'EPA (EPA, 2009; WHO, 2008) , affiancare ai classici indicatori di contaminazione biologica (*E. Coli* e Enterococchi I.) , un patogeno indice, nello specifico, *Human Adenovirus*, per predire in modo completo ed esaustivo l'eventuale contaminazione biologica delle matrici idriche in esame. Tale virus è di facile e rapida quantificazione grazie alla qPCR, è molto resistente ai fattori ambientali e ai trattamenti di disinfezione, è ubiquitario e abbondante, è presente tutto l'anno, è ospite specifico e rilasciato in grande quantità dai soggetti infetti.

Accanto alla proposta di utilizzare questo nuovo patogeno indice insieme ai classici indicatori di contaminazione biologica, si potrebbe prospettare un nuovo lavoro di ricerca per escludere eventuali fattori confondenti, nello specifico per l'acqua di mare si potrebbero effettuare campionamenti lontano dalla costa e lontano dalla foce del fiume per far sì che lo stato di contaminazione della matrice idrica in esame non risenta dell'elevata concentrazione di *E. Coli*, Enterococchi I. e *Human Adenovirus* presenti nel fiume provenienti dall'impianto di depurazione e dell'eventuale presenza di bagnanti durante i campionamenti della stagione estiva. Mentre per l'acqua di fiume si potrebbero effettuare campionamenti, non solo a valle dell'impianto di depurazione ma anche a monte, per poter ricercare un'eventuale differenza di concentrazione, oltre che degli indicatori classici, di *Human Adenovirus*.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Abad F X, Villena C, Guix S, Caballero S, Pinto´ R M And Bosch A (2001) **Potential Role of Fomites in the Vehicular Transmission of Human Astroviruses** Applied And Environmental Microbiology, p. 3904–3907 Vol. 67, No. 9 American Society for Microbiology.
2. Albinana-Gimenez N, Miagostovich M P, Calguaa B, Hugueta J M, Matias L, Gironesa R (2009) **Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants** water research 43:2011 – 2019
3. Baxter CS, Hofmann R, Templeton MR, Brown M, Andrews RC, (2007). **Inactivation of adenovirus types 2, 5, and 41 in drinking water by UV light, free chlorine, and monochloramine.** ASCE: Journal of Environmental Engineering 133 (1), 95–103.
4. Bibby K and Peccia J (2013) **Prevalence of Respiratory Adenovirus Species B and C in Sewage Sludge** Environ Sci Process Impacts.; 15(2): 336–338.
5. Bosch A (1998) **Human enteric viruses in the water environment: a minireview** Internatl Microbiol 1:191–196 Springer-Verlag Ibérica
6. Bosch A, Guix S, Sano D and Pinto R M (2008) **New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water** Current Opinion in Biotechnology, 19:295–301
7. Bosch A, Pinto RM, Abad FX. (2006) **Survival and transport of enteric viruses in the environment.** In: Viruses in Foods (Goyal SM, editor). New York, NY: Springer; 2006; pp. 151–187.
8. Bruniger S, Peters J, Borchers U, Kao M. (2000) **Further studies on the thermal resistance of bovine parvovirus against moist and dry heat** Int J Hyg Environ Health.;203(1):71-5
9. Buckwalter S P, Teo R, Espy Mark J, Sloan Lynne M, Smith Thomas F, and Pritt Bobbi S (2011) **Real-Time Qualitative PCR for 57 Human Adenovirus Types from Multiple Specimen Sources** Journal of Clinical Microbiology p. 766–771
10. Carducci A., Cantiani L., Ruschi M. A., (1994) Contributo alla standardizzazione di metodiche per la concentrazione di Enterovirus da acqua di mare. Ig. Mod., 101:707-721
11. Carducci A, Tozzi E, Rubulotta E, Casini B, Cantiani L, Rovini E, Muscillo M And Pacini R (2000) **Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment** Wat. Res. Vol. 34, No. 4, pp. 1173±1178.
12. Carducci A, Verani M, Battistini R, Pizzi F, Rovini E, Andreoli E and Casini B (2006) **Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices.** Water Science & Technology Vol 54 No: 239–244
13. Chang SL. (1971) **Interactions between animal viruses and higher forms of microbes.** J Sanit. Eng Div Am Soc Civil Eng; 96: 151–161.
14. Cliver DO, Hermann JE. (1972) **Proteolytic and microbial inactivation of enteroviruses.** Water Res 1972; 6: 797–805
15. Crance JM, Gantzer C, Schwartzbrod, Deloince R. (1998) **Effect of temperature on the survival of hepatitis A virus and its capsidal antigen in synthetic seawater.** Environ Toxicol Water Qual 1998; 13: 89–92.

16. Curriero FC, Patz JA, Rose JB, Leile S. (2001) **The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948–1994.** Am J Public Health 2001; 91: 1194–1199
17. D. Silva H, Garcí'a-Zapata M T A, Anunciacao C E (2011) **Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker?** Food Environ Virol 3:138–140
18. Dalla Vecchia A, Rigotto C, Staggemeier R, Soliman M C, Gil de Souza, Henzel F A, Lemos E , do Nascimento S C A, Muller D, de Quevedo , Fleck J D, Heinzelmann L S, de Matos Almeida S E, Spilki F R (2015) **Surface water quality in the Sinos River basin, in Southern Brazil: tracking microbiological contamination and correlation with physicochemical parameters** Environ Sci Pollut Res DOI 10.1007/s11356-015-4175-6
19. Delfino A (2010) **Malattie contagiose: misure di isolamento in ambito ospedaliero** Asp Catanzaro - Direzione Medica Presidio Ospedaliero "Lamezia Terme-Soveria Mannelli" U.O. Prevenzione Infezioni Ospedaliere Responsabile: Dr. Arcangelo
20. Divizia M, Cencioni B, Palombi L, Panà A (2008) **Sewage workers: risk of acquiring enteric virus infections including Hepatitis A** New Microbiologica, 31, 337-34
21. Donia D., Divizia M., Panà A. (1998). **Analysis of concentration methods for bacteriophages.** L'Igiene Moderna, 109:475-482
22. Douwes J, Thorne P, Pearce N And Heederik D (2003) **Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects** Ann. occup. Hyg., Vol. 47, No. 3, pp. 187–200,
23. EcoBioqual s.r.l. – www.ecobioqual.it **Ricerca n°B/97-2/DIPIA/03**
24. EPA **Drinking water contaminant list 3** (2009) Final. Fed Reg, 74(194):51850–51862
25. Fattal B, Vasl RJ, Katzenelson E, Shuval HI. (1983) **Survival of bacterial indicator organisms and enteric viruses in the Mediterranean coastal waters of Tel Aviv.** Water Res; 17: 397–402
26. Fong T-T, Phanikumar M S, Xagorarakis I and Rose J B (2010) **Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River** Applied And Environmental Microbiology, p. 715–723 Vol. 76, No. 3
27. Fong TT, Griffin DW, Lipp EK (2005) **Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking** Appl. Environ. Microbiol., 71, 2070-2078
28. Fongaro G, do Nascimento M A, Rigotto C, Ritterbusch G, D' A da Silva A, Esteves P A and Barardi C R M (2013) **Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays** Fongaro et al. Virology Journal, 10:166 <http://www.virologyj.com/content/10/1/166>
29. Fujioka RS, Loh PC, Lau LS. (1980) **Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms.** Appl Environ Microbiol ; 39: 1105–1110
30. Fujioka RS, Yoneyama BS. (2002) **Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria.** Water Sci Technol; 46: 291–295.
31. Gerba CP, Goyal SM. (1982) **Methods in Environmental Virology.** New York, NY: Marcel Dekker
32. Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku. (2002) **Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV Light.** Appl Environ Microbiol; 68: 5167–5169.
33. Gerba CP. (2000) **Assessment of the enteric pathogens shedding by bathers during recreational activity and its impact on water quality.** Quant Microbiol; 2: 55–68.

34. Gerba CP. (2006) **Survival of viruses in the marine environment**. In: Ocean and Health (Belkin S, Colwell RR, editors). New York, NY: Springer; 2006; pp. 133–142.
35. Goyal SM (1984) **Viral pollution of the marine environment**. Crit Rev Environ Contr; 14: 1–32
36. Goyal SM, Gerba CP, Melnick JL. (1978) **Human enteroviruses in oysters and their overlaying waters**. Appl Environ Microbiol 1978; 37: 572–581.
37. Grabow W.O.K. (2001) **Bacteriophages: update on application as model for viruses in water**. Water SA, 27(2):251-268
38. Han Y, Li L, Liu J (2013) **Characterization of the airborne bacteria community at different distances from the rotating brushes in a wastewater treatment plant by 16S rRNA gene clone libraries** Journal of Environmental Sciences, 25(1) 5–15
39. Hewitt J, Greening G E, M Leonard, G D Lewis (2013) **Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment** water research 47 6750 e 6761
40. Hernorth, B.E., Conden-Hansson, A.C., Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., Allard, A.K. (2002). **Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, Mytilus edulis: the first Scandinavian report**. Applied and Environmental Microbiology, 68: 4523-4533
41. Iaconelli M, La Rosa G, Pourshaban M, Spuri V and Muscillo M Italian National Institute of Health - Department of Environment and Primary (2009) **Surveillance of human adenoviruses in italian sewage treatment plants by nested pcr analysis in the fiber and in the exon coding regions** Prevention - Rome, Italy International Meeting on Health & Environment: Challenges for the Future – Rome
42. Ikelis V, Pyroup'I K, Rkoulatoansd A N, Rie C (1984) **Seasonal distribution of enteroviruses and adenoviruses in domestic sewage** Can. J. Microbiol. www.nrcresearchpress.com Viruses in Foods (Goyal SM, editor). New York, NY: Springer;; pp. 151–187.
43. INAIL (2010) **Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro Campionamento e analisi LINEE GUIDA CONTARP Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione** ISBN 978-88-7484-162-2
44. Irving L G And Smith F A (1981), **One-Year Survey of Enteroviruses, Adenoviruses, and Reoviruses Isolated from Effluent at an Activated-Sludge Purification Plant** Applied And Environmental Microbiology, p. 51-59 Vol. 41, No. 1
45. J i a n g S C (2006) **Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A Critical Review** Environ. Sci. Technol., 40, 7132-7140
46. Jurzik L, Hamzaa I A, Puchertb W, Überlac K, Wilhelma M (2010) **Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water** International Journal of Hygiene and Environmental Health 213 210–216
47. Kapuscinski RB, Mitchell R.(1980) **Processes controlling virus inactivation in coastal waters**. Water Res 1980; 14: 363–371.
48. Kundu A, McBride G , Wuertz S (2 0 1 3) **Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment** water research 47609 e 6325
49. Kutz SM, Gerba CP (1988) **Comparison of virus survival in freshwater sources**. Water Sci Technol ; 20: 467–471.

50. La Rosa G, Fratini M, Della Libera S, Iaconelli M and Muscillo M (2013) **Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission** Ann Ist Super Sanità Vol. 49, No. 2:124-132 DOI: 10.4415/ANN_13_02_03
51. La Rosa G, Iaconelli M, Della Libera S, Petricca S (2014) **Virus nelle potabili, criticità e prospettive** *ecoscienza* Numero 3
52. Lazic G, Grubac S, Lupulovic D, Bugarski D, Lazic S, Knezčevic P, Petrovic T (2015) **Presence of Human and Animal Viruses in Surface Waters in Vojvodina Province of Serbia** *Food Environ Virol* DOI 10.1007/s12560-015-9187-3
53. Liew PF, Gerba CP. (1980) **Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment.** *Appl Environ Microbiol* 1980; 40: 249–305.
54. Melnick JL, Gerba CP. (1980) **The ecology of enteroviruses in natural waters.** *Crit Rev Environ Contr*; 10: 65–93.
55. Mendez J., Jofre J., Lucena F., Contreras N, Mooijman K., Araujo R. (2002) **Conservation of phage reference materials and water sample containing bacteriophages of enteric bacteria.** *J Virol. Methods.*, 106:215-224
56. Murray JP, Laband JJ. (1979) **Degradation of poliovirus adsorption on inorganic surfaces.** *Appl Environ Microbiol* 1979; 37: 480–486.
57. Muscillo M, La Rosa G, Pourshaban M e Iaconelli M **I virus nell'acqua e le malattie idrotrasmesse** *virologia ambientale*
58. Nusca A, D'Alessandro D, Funari E (2008) **Indicatori di qualità microbiologica delle acque: problemi e prospettive** *Ann Ig*; 20: 531-544
59. Pagea M A, Shisler J L, Marinas B J(2009) **Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine** *water research xxx* 1 – 11
60. Pohjanpelto P. (1961) **Response of enteroviruses to cystine.** *Virology*; 15: 225–230. *Res*; 14: 363–371.
61. Rodriguez-Lazaro D, Cook N, Ruggeri F M, Sellwood J, Nasser A, Sao Jose Nascimento M, D'Agostino M, Santos R, Saiz J C, Rzezutka A, Bosch A, Girone R, Carducci A, Muscillo M, Kovac K, Diez-Valcarce M, Vantarakis A, von Bonsdorff C-H, de Roda Husman AM, Hernandez M & van der Poel W H M (2013) **Virus hazards from food, water and other contaminated environments** Fongaro et al. *Virology Journal*, 10:166 <http://www.virologyj.com/content/10/1/166>
62. Rose JB, Mullinax RL, Singh SN, Yates MV, Gerba CP. (1987) **Occurrence of rotaviruses and enteroviruses in recreational waters of Oak Creek, Arizona.** *Water Res* 1987; 21: 1375–1381.
63. Salo RJ, Cliver DO. (1976) **Effect of acid, salts, and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses.** *Arch Virol*; 52: 269–282.
64. Silva H D, Fongaro G, Garciazapata M T A, Melo A T O, Silveira-Lacerda E P, de Faria K M S, Anunciacao C E (2015) **High Species C Human Adenovirus Genome Copy Numbers in the Treated Water Supply of a Neotropical Area of the Central-West Region of Brazil** *Food Environ Virol*
65. Sinclair RG, Jones EL and Gerba CP (2009) **Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review** *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072
66. Singer B, Fraenkel-Conrat H. (1961) **Effects of benonite and stability of TMV-RNA.** *Virology* ; 14: 59–65.
67. Sirikanchana, K, Shisler, JL, Marin~ as, BJ, (2008). **Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine.** *Water Research* 42 (6–7), 1467–1474

68. Smith EM, Gerba CP, Melnick JL. (1978) **Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment.** Appl Environ Microbiol 1978; 35: 685–689.
69. Staggemeier R, Bortoluzzi M, Moraes da T, Heck S, da Silva T, Spilki F R, Esteves de S, Almeida M (2015) **Molecular detection of human adenovirus in sediment using a direct detection method compared to the classical polyethyleneglycol precipitation** Journal of Virological Methods 21365–67
70. Thompson SS, Yates MV. (1999) **Bacteriophages inactivation at the air-water-solid interface in dynamic batch systems.** Appl Environ Microbiol 1999; 65: 1186–1190.
71. Thurman RB, Gerba CP. (1988) **Molecular mechanisms of viral inactivation by water disinfectants.** Adv Appl Microbiol; 33: 75–105.
72. Thurston-Enriquez JA, Haas C N, Jacangelo J and Gerba C P (2005), **Inactivation of Enteric Adenovirus and Feline Calicivirus by Chlorine Dioxide** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 3100–3105 Vol. 71, No. 6
73. Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP, (2003). **Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus.** Applied and Environmental Microbiology 69 (7), 3979–3985.
74. Van Heerden J, Ehlers M M and Grabow W O K (2005) **Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water** Journal of Applied Microbiology, 99, 1256–1264 doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02607.x
75. Van Heerden J, Ehlers M M, Van Zyl W B, Grabow W O K (2003) **Incidence of adenoviruses in raw and treated water** Water Research 37 3704–3708
76. Wallis C, Melnick JL, Rapp F. (1965) **Different effects of MgCl₂ and MgSO₄ on the thermostability of viruses.** Virology; 26: 694–695.
77. Wallis C, Melnick JL. (1965) **Photodynamic inactivation of animal viruses: a review.** Photochem Photobiol; 4: 159–170
78. Wan G-H, Huang C-G, Huang Y-C, Huang J-P, Yang S-L, Lin T- Y, Tsao K-C (2012) **Surveillance of Airborne Adenovirus and Mycoplasma pneumoniae in a Hospital Pediatric Department** PLoS ONE 7(3): e33974. doi:10.1371/journal.pone.0033974
79. WHO **Outbreaks of waterborne diseases** (2009) FACT SHEET 1.1 CODE: RPG1_WatSan_E1
80. WHO **Guidelines for Drinking-water Quality** (2008) Volume 1. 3rd edition. Geneva: World Health Organization.
81. Wonga M, Kumar B L, Jenkins T M, Xagorarakid I, Phanikumare M S, Rose J B (2 0 0 9) **Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker** water research No 43: 1 1 3 7 – 1 1 4 9
82. Wyer M D, Wyn-Jones A P , Kay D , Au-Yeung H-K C, Girone's R, Lopez-Pila J , de Roda Husman A M, Rutjes S , Schneider O (2012) **Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters** water research 4 6 4 1 3 0 e 4 1 4 1
83. Wyn-Jones A P, Carducci A , Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, Holler C, de Roda Husman A M , Kay D , Kozyra I , Juan López-Pila I, Muscillo M , Nascimento M S J, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk R , Wyer M (2011) **Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters** Water research 451025 e 1038

84. Xagorarakis I, W. Kuo D H, Wong K, Wong M and Rose J B , (2007) **Occurrence of Human Adenoviruses at Two Recreational Beaches of the Great Lakes** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 7874–7881 Vol. 73, No. 24, American Society for Microbiology.
85. Yates MV, Gerba CP, Kelly LM. (1985) **Virus persistence in groundwater**. Appl Environ Microbiol 49: 778–781.
86. <http://educazionetecnica.dantect.it/2013/03/24/impianto-di-scarico-e-fognario>

