

Rivista Scientifica

Igiene e Sanità Pubblica

*fondata nel 1945 da Gaetano Del Vecchio
già diretta da Gaetano e Vittorio Del Vecchio*



*Custodit vitam qui custodit sanitatem
Sed prior est sanitas quam sit curatio morbi
(Flos Medicinae Scholae Salerni)*

ESTRATTO

in formato elettronico autorizzato dagli Autori e dall'Editore

*Domenica Donia, Maurizio Divizia, Augusto Panà,
Daniela Burrini, Emanuela Lupi, Brunella Perito*

***Applicazione dei parametri obbligatori ed accessori
nel controllo di acque di diversa origine***

Periodico bimestrale

Volume LVIII - N. 6 - Novembre / Dicembre 2002

IgSanPubbl - Issn 0019-1639

www.igiene.org

Igiene e Sanità Pubblica

Direttore Responsabile
Augusto Panà

Direttore Editoriale
Armando Muzzi

Redazione
Cattedra di Igiene e Medicina Preventiva
Università di Roma Tor Vergata

Capiredatore
Giuseppe Cananzi, Elisabetta Franco

Coordinatore
Natalia Buzzi

Comitato Scientifico
Giovanni Berlinguer, Antonio Boccia,
Vittorio Carreri, Gaetano M. Fara,
Bertram Flehmig, Giuseppe Giammanco,
Antonino Gullotti, Elio Guzzanti,
Alessandro Maida, Marck McCarthy,
Cesare Meloni, Bruno Paccagnella,
Walter Ricciardi, Gianfranco Tarsitani,
Giancarlo Vanini

Segreteria di Redazione
Iolanda Mozzetta, Vito Cerullo

Redazione Sito Internet
Giulia Zamponi

Traduzioni a cura di
Henrike Berg, Steffen P. Berg, Ilaria Restifo

Impaginazione e Grafica
Ornella Fassio

Norme editoriali in 3^a di copertina.

Hanno collaborato a questo numero
C. Bertoncello, D. Bova, A. Burgio,
D. Burrini, L. Dalla Torre,
A. D'Errico, M. Divizia, D. Donia,
L. Emberti Gialloreti, G. Guidotti,
E. Guzzanti, G. Liotta, E. Lupi,
M.C. Marazzi, V. Marin,
I. Mastrobuono, A. Muzzi, P. Narciso,
L. Palombi, A. Panà, B. Perito,
F. Perno, M.T. Tamburrano,
S. Vella, C. Zocchetti

IGIENE E SANITÀ PUBBLICA È INDICIZZATA SU MEDLINE E INDEX MEDICUS.

Garanzia di riservatezza

Il trattamento dei dati personali che riguardano Autori e Abbonati viene svolto nel rispetto di quanto stabilito dalla Legge n. 675 del 1996 sulla Tutela dei dati personali. I dati non saranno comunicati o diffusi a terzi e per essi l'Autore o l'Abbonato potrà richiedere, in qualsiasi momento, la modifica o la cancellazione, scrivendo all'Editore.

Igiene e Sanità Pubblica - Periodico bimestrale a carattere scientifico
Reg. Trib. di Roma n. 4198 del 19.10.1954

Proprietà artistica e letteraria riservata

Realizzato con il contributo dell'Università degli Studi di Roma Tor Vergata
Accreditato SItI - Società Italiana di Igiene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica

Applicazione dei parametri obbligatori ed accessori nel controllo di acque di diversa origine

Domenica Donia ⁽¹⁾, Maurizio Divizia ⁽¹⁾, Augusto Panà ⁽¹⁾, Daniela Burrini ⁽²⁾,
Emanuela Lupi ⁽²⁾, Brunella Perito ⁽²⁾

⁽¹⁾ Cattedra di Igiene, Università di Tor Vergata, Roma

⁽²⁾ Servizio Controllo Ricerca e Sviluppo, Acquedotto di Firenze

Parole chiave *Enterovirus; Fagi; Controllo di potabilità.*

Riassunto Nella città di Firenze sono stati analizzati 22 campioni di acqua del fiume Arno sia grezza che potabilizzata e 11 campioni di acque reflue urbane depurate. L'acqua grezza presentava caratteristiche chimiche e microbiologiche corrispondenti alla categoria A3 da potabilizzare (d.lgs 152/99); l'acqua potabilizzata risultava conforme ad un'acqua destinata al consumo umano (Dpr 236/1988 e d.lgs 31/2001). Le acque reflue presentavano valori chimici conformi alla legge (d.lgs 152/1999), mentre per quelli batteriologici i limiti vengono superati, per mancata clorazione dell'effluente, in accordo con l'Autorità Sanitaria. La ricerca degli enterovirus è risultata positiva per 5 campioni con test RT-PCR; tra questi un Coxsackievirus tipo B2 ed un Poliovirus. Non è stato evidenziato alcun rapporto tra i parametri batteriofagi e virus.

Compulsory and additional parameters in water control

Key Words *Enterovirus; Phages; Water quality control.*

Summary The authors have analyzed 22 water samples from the Arno River (both river and drinking samples), as well as 11 effluent samples from an urban plant. Chemical and microbiological features of river samples were in line with the A3 class, needing treatment for drinking use (Executive Order n. 152/99); drinkable water met requirements (President's Decree n° 236/1988 and Executive Order n° 31/2001). As regards chemical parameters, effluents complied with the law (Executive Order n. 152/1999) but their bacteriological figures exceeded the standards set by the Authorities due to a lack in chlorination. Enteric viruses reacted to the RT-PCR test in 5 of the samples, including a Coxsackievirus Type B2 and a Poliovirus. No association was shown between bacteriophage parameters and virus.

Paramètres obligatoires et accessoires du contrôle des eaux

Mots-Clé *Virus entérique; Bactériophages; Contrôle des eaux.*

Résumé Les auteurs ont analysé 22 échantillons d'eau de l'Arno (tant de rivière que potable) et 11 échantillons d'eaux usées dans une implantation urbaine. Les caractéristiques chimiques et microbiologiques des eaux de rivière correspondaient à la catégorie A3, qui nécessite un traitement de potabilité (Acte Législatif n. 152/99); l'eau potable était conforme à la loi (Arrêté Présidentiel n° 236/1988 et Acte Législatif n. 31/2001). Les eaux usées étaient conformes à la loi en ce qui concerne les paramètres chimiques (Acte Législatif n. 152/1999), tandis que les paramètres bactériologiques excédaient les limites à cause d'un manque de chloration. Dans cinq échantillons, les virus entériques ont réagi au test RT-PCR, dont un Coxsackievirus du type B2 et un Poliovirus. Aucun rapport a été mis en évidence entre les paramètres des bactériophages et le virus même.

Anwendung der vorgeschriebenen Parameter und Zusatzuntersuchungen bei der Kontrolle von Gewässern verschiedener Herkunft

Schlüsselwörter Enterovirus; Phagen; Trinkwasserkontrolle

Zusammenfassung Es wurden 22 unbehandelte wie auch zu Trinkwasser verarbeitete Wasserproben vom Fluß Arno in der Stadt Florenz, und 11 gereinigte Abwasser-Proben analysiert. Das unbehandelte Flußwasser wies chemische und mikrobiologische Charaktere entsprechend der Kategorie A3 zur Trinkwasservorbereitung auf (d.lgs 152/99); Das aufbereitete Trinkwasser erwies sich als übereinstimmend mit dem für den menschlichen Gebrauch vorgesehenem Wasser (Dpr 236/1988 und d.lgs 31/2001). Das gereinigte Abwasser wies dem Gesetz entsprechende chemische Werte auf (d.lgs 152/1999), während die bakteriologischen Werte durch die fehlende Chlorbehandlung des austretenden Wassers überschritten wurden, in Übereinstimmung mit den Gesundheitsbehörden. Die Untersuchung auf Enteroviren mit dem RT-PCR-Test war in 5 Fällen positiv; unter anderem wurden ein Cocksackie-Virus Typ B2 und ein Poliovirus gefunden. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen Bakteriophagen und Virus-Parametern.

Introduzione

Le acque rappresentano uno dei principali veicoli di trasmissione di numerosi patogeni all'uomo ed è quindi fondamentale eseguire un controllo sia qualitativo che quantitativo dei patogeni.⁽¹⁰⁾ Le caratteristiche di qualità per le acque destinate al consumo umano sono attualmente regolamentate dal d.lgs 31/2001⁽⁶⁾ ma per i valori di parametro resta ancora in vigore il Dpr 236/1988⁽³⁾ che dispone, oltre al controllo, normale e periodico, di parametri fisici, chimici e microbiologici, anche un controllo occasionale, a completamento della valutazione di qualità delle acque distribuite. Quest'ultimo prevede la determinazione di parametri accessori (definiti nel gruppo C4) tra i quali sono compresi i batteriofagi anti-*E.coli* e gli enterovirus.

Con l'approvazione dei metodi analitici per le acque destinate al consumo umano^(2,9) è possibile disporre, per l'indagine virologica, di diverse metodiche che consentono l'analisi di grossi volumi di campione e la scelta di controlli alternativi a supporto di un più efficace monitoraggio della qualità delle acque potabili.

La normativa italiana non prevede la ricerca del B 40-8, fago del *Bacteroides fragilis*, ritenuto da alcuni autori un possibile indicatore della presenza di virus nell'ambiente, ritrovato in diverse matrici ambientali con accertato grado di contaminazione di origine fecale e dimostrando, come risulta da studi sperimentali, una sopravvivenza nell'ambiente ed una resistenza ai comuni disinfettanti simili a quelle dei poliovirus. La possibilità di utilizzare tale indicatore presenta un notevole vantaggio in quanto negli ultimi anni la poliomielite si è ripresentata in forma epidemica in alcuni paesi con condizioni igienico-sanitarie ed economiche carenti, come è accaduto in Albania tra il 1996 ed il 1997 o, con casi sporadici, in Turchia nel 1998⁽¹⁾, confermando l'alta

diffusibilità nell'ambiente dei poliovirus. Anche recentemente sono stati segnalati in Bulgaria 2 casi di poliomielite causata da virus selvaggio, mentre la genotipizzazione dei virus isolati dimostrava, in entrambi i casi, un'origine pakistana del ceppo coinvolto.

Nell'ambito di un progetto di collaborazione scientifica con l'Acquedotto di Firenze al fine di valutare la qualità delle acque, oltre ai controlli routinari, che comprendono anche il batteriofago anti-*E.coli* ⁽¹³⁾, è stata effettuata la ricerca degli enterovirus e del fago B 40-8 del *B. fragilis* più volte proposto quale indicatore di contaminazione fecale.

L'indagine è stata estesa alle acque di fiume Arno prima del processo di potabilizzazione e alle acque in uscita da un impianto di depurazione di acque reflue urbane, al fine di valutare l'entità della diffusione dei microrganismi oggetto dello studio ⁽⁸⁾.

L'acqua prelevata dal fiume Arno viene sottoposta a trattamento di potabilizzazione in un impianto molto complesso, della capacità di 3 m³/sec, con un processo in grado di garantire costantemente la qualità dell'acqua prodotta. L'uso del carbone attivo e di ozono per l'eliminazione dei microinquinanti e la sequenza di più fasi di disinfezione consentono in ogni condizione il raggiungimento ed il mantenimento della qualità dell'acqua potabile a norma di legge. La sequenza delle fasi di trattamento è la seguente: preossidazione con biossido di cloro, addizione di carbone attivo in polvere, flocculazione e decantazione, filtrazione rapida su sabbia, ozonizzazione, post-clorazione per la protezione della qualità nella rete di distribuzione.

La depurazione delle acque reflue urbane di Firenze avviene in un impianto a fanghi attivi classico che serve circa 120.000 abitanti equivalenti. L'alternanza delle fasi aerobica e anossica consente di effettuare anche il processo di denitrificazione. Per accordo con l'Autorità Sanitaria, nell'impianto oggetto dello studio, non viene effettuata la disinfezione finale dell'effluente.

Il campionamento è stato effettuato tra il mese di febbraio 1998 e gennaio del 1999. In tale periodo il laboratorio dell'Acquedotto di Firenze ha prelevando 22 campioni di acqua di fiume (20 litri per campione) e 22 campioni di acqua potabilizzata (500 litri per campione). Inoltre sono stati effettuati 11 ulteriori campionamenti di acqua in uscita dall'impianto di depurazione di acque reflue urbane (20 litri per campione).

Tutte le determinazioni dei parametri chimici e microbiologici sono state eseguite nel laboratorio dell'Acquedotto di Firenze secondo i protocolli analitici di legge ^(4,6), ad eccezione del maggior volume di acqua potabilizzata prelevato per l'analisi dei

parametri microbiologici indicatori, pari a 500 mL per la ricerca di Coliformi totali e fecali e Streptococchi, e a 1000 mL per la ricerca di Clostridi sulfitoriduttori.

La concentrazione dei campioni da sottoporre alle indagini virologiche è stata effettuata mediante il sistema di filtrazione tangenziale Sartocoon (Sartorius). I campioni concentrati sono stati quindi congelati e trasferiti, conservando la catena del freddo, presso il laboratorio di Virologia Ambientale dell'Università di Tor Vergata, dove sono stati seminati su linee cellulari del tipo BGM (Buffalo Green Monkey cells) secondo un protocollo precedentemente descritto.^(2,13) La ricerca dei virus, anch'essi inseriti nel controllo di tipo C4, è stata eseguita secondo protocolli descritti già ampiamente^(2,13).

La presenza di virus, evidenziata per effetto citopatico, era confermata mediante test RT-seminested PCR. La regione amplificata era compresa nel tratto 5' non codificante che risulta comune a tutti gli enterovirus (Zoll)⁽¹⁵⁾

Una aliquota di tutti i campioni, con o senza effetto citopatico, è stata utilizzata per il test bio-molecolare RT-seminested-PCR. Il genoma virale è stato estratto utilizzando un kit commerciale (Trizol-Gibco BRL) a base di guanidina tiocianato e mantenuto in alcool a -20°C sino al momento della reazione di amplificazione.

I prodotti di amplificazione, visualizzati su gel di agarosio in presenza di bromuro di etidio sono stati purificati con il kit della Qiagen e successivamente sequenziati mediante il sistema Dye Terminator Cycle utilizzando un apparecchio Perkin Elmer (ABI Prisma DNA Sequencer).

La ricerca dei batteriofagi è stata effettuata su 100 ml di campione di acqua di fiume grezza e depurata procedendo con una analisi quantitativa dei batteriofagi anti *E.coli* K12Hfr e B con il metodo di Nupen⁽¹⁴⁾ che prevede l'aggiunta al campione di 1 ml di CaCl₂ e 5 ml di coltura del ceppo ospite di *E.coli* considerato. A questa miscela incubata a 48°C per 5 min venivano aggiunti 100 ml di terreno PAC (*Phage assay count*) mantenuto a 48 gradi. Il tutto era distribuito in piastra, incubato a 37°C e le UFP erano lette a 18 ore. Su 3 litri di campione di acqua potabilizzata è stata effettuata l'analisi qualitativa per rilevare l'eventuale presenza di batteriofago anti *E.coli* K12: a 2700 ml di campione sono stati aggiunti 300ml di Nutrient broth X10, messo ad incubare a 37°C. Dopo 4 ore una aliquota di 30 ml è stata pastorizzata a 56°C per 30 min e gettata goccia a goccia su piastra di Plate Count Agar sulla quale preventivamente era stato effettuato per spatolamento uno strato di ceppo ospite. La lettura delle UFP è stata eseguita dopo incubazione a 37°C per 24 ore.

Per la ricerca del fago B40-8 del *B. fragilis*, una aliquota dei campioni (1 litro per l'acqua in uscita dal depuratore, 2 litri per l'acqua da potabilizzare e 20 litri per l'acqua potabilizzata) è stata concentrata con membrane piane del tipo ANODISC™ (Whatmann) e i fagi eventualmente adesi sono stati eluiti con 5 ml di estratto di carne 3% pH 9.5. L'eluato, dopo neutralizzazione con HCl è stato analizzato con i due metodi: quantitativo e qualitativo^(9,12).

Risultati e discussione

La ricerca ha riguardato l'intero ciclo idrico (acque superficiali, acque potabili e acque reflue depurate) ed ha coperto l'arco di un anno, dal febbraio 1998 al gennaio 1999. È stato così possibile effettuare valutazioni sia sulla qualità delle varie tipologie di acqua, che sull'incidenza stagionale nell'ambiente dei microrganismi indicatori, dei batteriofagi e degli enterovirus. I risultati sono riportati nelle tavole 1-4. La *tavola 1* espone i valori dei parametri chimici e batteriologici dell'acqua grezza prima del trattamento di potabilizzazione. In base ai dati complessivi l'acqua deve essere classificata nella categoria A3 e come tale essere sottoposta a trattamento fisico e chimico spinto, affinazione e disinfezione finale (d.lgs 152/1999 relativamente alle acque superficiali destinate alla produzione di acque potabili).

L'ammonio ha mostrato in media il valore di 0,17 mg/l \pm 0,21 mg/l (min/max pari a 0,01 mg/l-0,8 mg/l); per la torbidità e per il TOC i valori medi riscontrati sono stati rispettivamente di 39,3 \pm 67,0 NTU, (min/max pari a 2,6-276,0) e di 3,38 \pm 1,94 mg/l (min/max pari a 0,96-7,22). Va rilevato come sia per la torbidità che per il TOC non vengono indicati nella Legge limiti di riferimento.

Dal punto di vista batteriologico, i tre parametri indicatori risultano talora superiori ai valori guida indicati per la categoria A3; sono stati infatti riscontrati valori di 10.858 UFC/100 ml \pm 33.813 (min/max pari a 290-160.900) per Coliformi Totali (CT); di 1.508 UFC/100 ml \pm 2.852 (min/max pari a 20-13.000) per Coliformi Fecali (CF); di 348 UFC/100 ml \pm 512 per Streptococchi Fecali (SF); di 25 \pm 59 UFC/ml (min/max pari a 0-290) per Clostridi Solfito Riduttori (CSR). La Conta Batterica Totale (CBT), non prevista in normativa, presenta valori medi di 5.587 UFC/ml \pm 7.723 (min/max pari a 131-28.000), la Salmonella è risultata presente solo in due campioni dei 22 analizzati.

Il trattamento chimico-fisico e di disinfezione a cui sono sottoposte le acque grezze produce acqua che rientra ampiamente nei limiti di legge previsti dal

Dpr 236/1988 (tavola 3). In particolare, la torbidità subisce una riduzione di 2,14 log e il TOC di 1,9 volte il valore in entrata. Il cloro residuo, aggiunto prima della immissione dell'acqua in rete, presenta un valore particolarmente costante a dimostrazione della stabilità delle caratteristiche dell'acqua prodotta: 0,58 mg/l \pm 0,07 (min/max pari a 0,48-0,76).

Il processo di disinfezione secondo il modello delle barriere multiple ha operato una drastica riduzione degli indicatori batteriologici, quali i CF, CT, SF e i CSR. che

Tavola 1
Valori dei parametri chimici e batteriologici dell'acqua grezza prima del trattamento di potabilizzazione

Data prelievo	Torbidità NTU	NH4+ mg/l	TOC mg/l	CBT UFC/ml	CT UFC/100ml	CF UFC/100ml	SF UFC/100ml	CSR UFC/1 ml	Salmonelle PA/1000 ml
3-02-1998	2,6	0,2	2,8	928,0	16.090,0	5.420	278	10	P
27-02-1998	102,0	0,4	5,3	380,0	1.700,0	200	330	10	A
3-03-1998	12,0	0,1	2,8	131,0	500,0	200	330	12	A
17-03-1998	10,5	0,2	6,2	n.e.	2.300,0	800	80	23	A
31-03-1998	10,8	0,1	3,1	850,0	1.700,0	800	50	9	A
28-04-1998	10,0	0,1	2,6	3.200,0	4.900,0	1.700	220	10	A
14-05-1998	11,0	0,1	2,8	1.200,0	500,0	200	20	6	A
9-06-1998	14,0	-	3,6	n.e.	490,0	50	240	12	A
26-06-1998	6,5	-	4,6	n.e.	490,0	50	240	12	A
8-07-1998	12,4	0,2	4,7	12.800,0	3.480,0	2.400	n.e.	20	A
22-07-1998	14,0	0,1	6,1	19.600,0	16.090,0	2.400	46	10	A
5-08-1998	4,2	0,1	5,5	4.900,0	440,0	20	4	16	A
17-09-1998	9,9	0,0	7,2	>8000	1.410,0	230	20	30	A
1-10-1998	97,8	0,2	4,4	9.050,0	2.000,0	2.000	<200	15	A
22-10-1998	276,0	0,1	1,7	2.250,0	9.400,0	800	1.300	>13	A
29-10-1998	62,1	-	1,4	13.600,0	3.300,0	500	170	10	A
11-11-1998	45,6	-	0,98	28.000,0	160.900,0	13.000	2.210	30	A
25-11-1998	10,7	0,2	1,47	740,0	4.600,0	400	80	15	A
2-12-1998	10,3	0,1	1,47	2.200,0	2.300,0	500	490	10	A
16-12-1998	11,2	0,5	1,19	2.200,0	2.300,0	500	490	10	A
13-01-1999	46,2	0,8	0,96	777,0	4.900,0	1.100	490	>200	A
27-01-1999	4,4	0,7		500,0	200,0	200	80	-	P
min	2,6	-	1,4	131,0	200,0	20	4	-	
max	276,0	0,8	7,2	28.000,0	160.900,0	13.000	2.210	30	
media	35,6	0,2	4,0	5.739,2	10.908,6	1.521	358	14	
mediana	11,1	0,1	4,0	2.200,0	2.300,0	500	230	11	
ev.stan.	60,9	0,2	1,7	7.894,7	33.804,8	2.846	525	7	

NTU=Nephelometric turbidity unit; CBT=Conta batterica totale a 37°C; CT=Coliformi totali; CF=Coliformi fecali; SF=Streptococchi fecali; CSR=Clostridi sulfito riduttori. UFC=Unità formanti colonie; PA=Presenza-Assenza

sono risultati assenti nei 22 campioni analizzati. Tale riduzione risulta particolarmente evidente se si considera che, rispetto a quanto riportato dalla normativa per i protocolli analitici, sono stati analizzati campioni di volumi d'acqua 5 volte superiori, per i primi tre parametri, e 10 volte per l'ultimo parametro. La CBT presenta una positività in 7 campioni su 22 analizzati, anche se inferiore ai limiti ammessi per legge, con un solo campione eccedente.

La ricerca dei fagi anti-*coli* B e anti-*coli* K12 Hfr è stata effettuata presso il laboratorio dell'Acquedotto di Firenze (la ricerca dei fagi viene eseguita in maniera routinaria ormai da più di 20 anni per il controllo della produzione), mentre la ricerca del fago B40-8 del *Bacteroides fragilis* è stata eseguita, in occasione del presente studio, presso i laboratori dell'Università di Tor Vergata.

Nelle acque grezze (*tavola 2*) i batteriofagi anti-*coli* sono risultati sempre presenti, con una media di 216 UFP/100 ml ± 399 (min/max pari a 1-1.860); diversamente, i fagi anti-*coli* K12 Hfr hanno dato un valore medio di 180 UFP/100 ml ± 294 (min/max pari a 3-1.184). La ricerca di quest'ultimo parametro è stata eseguita anche nel campione dopo concentrazione con ultrafiltrazione, utilizzando un volume del campione prelevato pari a 100 ml. I valori ottenuti sono stati, con esclusione di un campione, nettamente inferiori a quelli ottenuti nel campione non concentrato con una perdita in media di 1,1 log.

Nell'acqua potabilizzata (*tavola 3*) è stata condotta solo la ricerca dei fagi anti-*coli* K12Hfr ed il parametro è risultato costantemente assente in un volume di 3 litri acqua.

I fagi B40-8 sono stati ricercati su tutti i campioni concentrati (acqua grezza e potabilizzata) con Sartocon mini e, dopo ulteriore concentrazione, con membrane Whatmann. Tutti i campioni sono risultati costantemente negativi sia alla semina diretta (analisi quantitativa) che dopo arricchimento in terreno specifico (analisi qualitativa-spot test)⁽⁹⁾.

Sono risultati positivi per enterovirus 5 campioni, di cui 4 prelevati dalle acque superficiali prima della potabilizzazione ed 1 in uscita dal depuratore. Nessuno di questi campioni ha presentato valori degli indici batteriologici e dei batteriofagi particolarmente elevati, confermando un dato largamente presente in letteratura: la mancanza cioè di correlazione tra presenza di enterovirus e parametri microbiologici.

Solo per due virus isolati è stato possibile procedere all'identificazione mediante RT-PCR e sequenziamento; per gli altri 3 campioni positivi l'analisi di sequenza non ha portato ad un risultato utile.

L'omologia di sequenza per i due virus sequenziati ha confermato un Coxsackievirus tipo B2 (campione di acqua grezza del 16 dicembre 1998) ed un poliovirus vaccinale tipo 3 (effluente depuratore del 21 maggio 1998).

La qualità chimica e microbiologica delle acque sottoposte a controllo, descritta dai parametri indicatori, evidenzia l'inquinamento dell'acqua superficiale e, per effetto dei trattamenti subiti, il raggiungimento e mantenimento della conformità dell'acqua potabilizzata alle norme per l'acqua destinata al consumo umano.

La totale assenza nelle acque superficiali del fago B40-8 è indicativa probabil-

Tavola 2**Parametri occasionali in acque prima della potabilizzazione**

Data prelievo	Batteriofago UFP/100 ml		Analisi sul concentrato B.anti E.coli K12 Hfr UFP/1 ml (calc./100ml)
	E.Coli B	E.Coli K12 Hfr	
3-02-1998	375	200	NE
27-02-1998	89	82	125
3-03-1998	25	103	55
17-03-1998	120	95	12
31-03-1998	80	31	2
28-04-1998	11	76	10
14-05-1998	7	3	1
9-06-1998	10	12	2
26-06-1998	10	12	1
8-07-1998	2	n.e.	0
22-07-1998	4	3	0
5-08-1998	1	n.e.	0
17-09-1998	20	3	0
1-10-1998	1860	798	4
22-10-1998	138	12	5
29-10-1998	91	95	0
11-11-1998	499	1184	ne
25-11-1998	286	62	5
2-12-1998	381	235	4
16-12-1998	381	235	ne
3-01-1999	323	206	4
27-01-1999	138	149	ne
min	1	3	
max	1.860	1.184	
media	221	180	
mediana	90	89	
dev.stan.	398	295	

UFP= Unità formanti placche

mente di un mancato recupero di esso con la tecnica di concentrazione mediante ultrafiltrazione tangenziale, trattamento indispensabile per saggi su grossi volumi di acqua. In effetti, il metodo di concentrazione dei fagi non è ancora ben definito ma indispensabile per acque con un basso livello di contaminazione ⁽⁷⁾.

La ricerca dei poliovirus in diverse matrici ambientali è di fondamentale importanza per l'inserimento dell'Italia tra i paesi "polio-free". In questa indagine l'isolamento di un solo poliovirus, identificato come Polio 3 tipo Sabin, è indicativo di una sua scarsa circolazione nell'ambiente. Nel complesso, esiste una limitata circolazione di virus enterici come si evince dalla presenza di soli altri 4 campioni positivi identificati

mediante test RT-PCR. Il virus identificato, dall'analisi di sequenza, come Coxsackievirus tipo B2 è responsabile di affezioni cardiocircolatorie nell'uomo. Il test RT-PCR è stato esteso a tutti i campioni per la ricerca di enterovirus non citopatogeni. Solo in 3 casi si è avuta una lieve banda specifica di amplificazione su gel di agarosio. La ridotta amplificazione si può spiegare con una limitata replicazione del virus sul sistema cellulare da noi utilizzato nel presente studio oppure con una mutazione nel tratto genomico da noi amplificato.

Per le acque in uscita dall'impianto di depurazione e da immettere in un corpo idrico recettore (tavola 4) i valori chimici risultano conformi a quanto stabilito dal d.lgs 152/99⁽⁴⁾.

In particolare, l'azoto ammoniacale presenta una concentrazione media di $1,1 \pm 1,0$ mg/l (media \pm deviazione standard), con valori compresi tra 0,5 e 4,2 mg/l e comunque inferiori al valore limite (pari a 15 mg/l di N totale). Le stesse conclusioni possono essere

tratte per i parametri COD e BOD che presentano valori medi rispettivamente di $26 \text{ mg/l} \pm 7,4 \text{ mg/l}$ (min/max pari a 10-37 mg/l) e $8 \text{ mg/l} \pm 7 \text{ mg/l}$ (min/max pari a 1-23). La torbidità ha mostrato un valore di $3 \pm 1,4$ NTU (min/max pari a 1,1-5,1). I valori risultano relativamente costanti dimostrando una buona efficienza di depurazione.

Tavola 3
Acqua Potabilizzata^(*)

Data prelievo	Torbidità NTU	Cl2 residuo mg/l	TOC mg/l	CBT 37°C UFC/ml
10-02-1998	0,08	0,60	1,97	-
24-02-1998	0,11	0,58	1,44	-
3-03-1998	0,23	0,51	1,72	-
17-03-1998	0,08	0,50	2,03	-
31-03-1998	0,17	0,54	1,57	1
28-04-1998	0,11	0,50	0,99	-
14-05-1998	0,12	0,59	1,61	-
09/06/1998	0,24	0,50	1,65	-
23-06-1998	0,21	0,52	1,88	-
7-07-1998	0,27	0,54	2,12	-
21-07-1998	0,26	0,56	2,57	2
4-08-1998	0,31	0,60	3,00	3
16-09-1998	0,30	0,73	3,18	-
29-09-1998	0,22	0,70	2,12	1
20-10-1998	0,43	0,59	1,79	19
27-10-1998	0,38	0,76	1,53	1
10-11-1998	0,28	0,56	1,11	-
24-11-1998	0,61	0,60	0,95	2
1-12-1998	0,29	0,56	1,47	-
15-12-1998	0,26	0,60	1,52	-
12-01-1999	0,15	0,48	1,39	-
27-01-1999	0,18	0,58	1,53	-
min	0,08	0,48	0,95	-
max	0,61	0,76	3,18	19,0
media	0,24	0,58	1,79	1,4
mediana	0,24	0,56	1,65	-
dev.stan.	0,13	0,08	0,58	4,1

TOC= Total Organic Compounds

CBT= Carica batterica totale

Nota:

^(*) Coliformi totali e fecali, Streptococchi fecali, clostridi sulfitoriduttori e fagi anti-E.Coli sono risultati costantemente negativi.

Per i parametri microbiologici, legge 319/74 ed ancora in vigore nel 1999, a parte la costante assenza delle Salmonelle, i parametri indicatori superano sempre i valori limite. I CT superano di 13,7 volte il valore massimo espresso dalla legge; i CF di 4,2 volte e gli SF di 3,4 volte.

Come si evince dai dati medi e di deviazione standard, si ha una fluttuazione dei valori estremamente ampia, legata presumibilmente alle variazioni climatiche stagionali ed alla casualità del campionamento che può risentire della presenza di fiocchi di fango.

Sulle acque in uscita dal depuratore è stata ricercata la presenza dei soli fagi anti-*coli* K12 Hfr (*tavola 4*) nei campioni concentrati utilizzando un volume pari a 100 ml del campione originale: 2 campioni su 7 sono risultati negativi; gli altri presentano un valore compreso tra 4 e 22 UFP/100ml.

La ricerca dei batteriofagi, anti-*coli* B, anti-*coli* K12 Hfr e B40-8, si inquadra nella necessità di disporre di un parametro di facile esecuzione, rapido, poco costoso e rappresentativo della situazione del campione in esame, in grado di costituire un possibile indicatore per la eventuale presenza di enterovirus. I colifagi presentano la caratteristica di moltiplicarsi a temperatura ambiente nei diversi corpi idrici, a

Tavola 4
Acqua uscita depuratore

Data prelievo	Torbidità NTU	NH4+ (mg/l)	TOC (mg/l)	COD (mg/l)	BOD (mg/l)	CT/100 ml UFC	CF/100 ml UFC	SF/100ml UFC	Analisi sul concentrato anti E.coli K12 Hfr	
									Salmonelle PA./1000 ml	UFP/1ml (calc./100ml)
26-02-1998	1,2	0,5	ne	28,0	18,0	45.000	25.000	ne	A	22
26-03-1998	2,1	4,2	7,8	25,0	23,0	1.100.000	150.000	ne	A	4
23-04-1998	5,1	0,7	8,2	23,0	4,0	150.000	7.000	ne	A	0
21-05-1998	1,5	1,6	8,6	18,8	12,0	200.000	150.000	ne	ne	5
19-06-1998	2,1	0,8	10,0	22,0	1,0	110.000	45.000	ne	A	0
30-07-1998	2,9	0,9	ne	37,0	5,0	9.500	2.500	ne	A	12
24-09-1998	2,2	0,8	ne	27,0	6,0	95.000	45.000	ne	A	5
31-10-1998	1,7	0,6	6,7	24,0	3,0	15.000	15.000	200	A	ne
17-11-1998	1,1	0,6	6,8	10,0	7,0	110.000	25.000	2.500	A	ne
17-12-1998	4,7	0,7	7,2	35,0	4,0	1.100.000	75.000	15.000	A	ne
29-01-1999	4,4	0,7	8,7	26,0	3,0	100.000	25.000	9.500	A	ne
min	1,1	0,5	6,7	10,0	1,0	9.500	2.500	200		
max	5,1	4,2	10,0	37,0	23,0	1.100.000	150.000	15.000		
media	2,6	1,1	8,0	25,1	7,8	275.864	51.318	6.800		
mediana	2,1	0,7	8,0	25,0	5,0	110.000	25.000	6.000		
dev.stan.	1,4	1,1	1,1	7,3	7,0	411.212	52.784	6.747		

NTU=nephelometric turbidity unit; TOC=Total organic compounds; COD=Chemical oxygen demand;
BOD=Biological oxygen demand; CT=Coliformi totali; CF=Coliformi fecali; SF=Streptococche fecali

differenza dei fagi K12 Hfr ⁽¹¹⁾ che riescono a moltiplicarsi solo in condizioni particolari di temperatura e in presenza dell'ospite specifico; il fago del *Bacteroides fragilis* (B40-8) (reperibile solo nelle feci dell'uomo) è in grado di sopravvivere e di moltiplicarsi solo in condizioni di stretta anaerobiosi, condizione peraltro che si verifica assai difficilmente nell'ambiente. La ricerca dei batteriofagi è comunque richiesta solo per le acque potabili e limitatamente ai batteriofagi anti-*coli*. Tale parametro, che rientra nel gruppo del controllo di tipo C4, deve essere costantemente assente.

Conclusione

Le acque rappresentano sicuramente il primo veicolo di trasmissione di agenti patogeni all'uomo, ragion per cui la loro qualità, sia per le acque superficiali che potabili, deve essere sempre attentamente valutata e monitorata. Il monitoraggio della qualità microbiologica dovrebbe comprendere sia la ricerca di parametri indicatori che di patogeni, inclusi i virus. Anche il nuovo D.lgs 31/2001 ⁽⁶⁾, inserisce i parametri "batteriofagi" e "enterovirus" tra i parametri accessori.

Il controllo routinario del parametro "enterovirus" appare ancora oggi limitato a laboratori qualificati e specializzati in questo campo; inoltre i costi delle analisi rimangono elevati e i tempi di esecuzione troppo lunghi. La ricerca dei batteriofagi in campioni d'acqua è un procedimento di facile esecuzione, rapido e poco costoso, sebbene il loro ritrovamento abbia un significato diverso per i tre tipi menzionati. I colifagi presentano la caratteristica di moltiplicarsi a temperatura ambiente nei diversi corpi idrici a differenza dei fagi F-plus che riescono a moltiplicarsi solo in condizioni particolari di temperatura e in presenza dell'ospite specifico; il fago del *Bacteroides fragilis* (B40-8), in grado di sopravvivere e di moltiplicarsi solo in condizioni di stretta anaerobiosi, condizione estremamente difficile da verificarsi nell'ambiente, è reperibile solo nelle feci dell'uomo.

La ricerca dei poliovirus in diverse matrici ambientali è di fondamentale importanza per la classificazione dell'Italia come paese "polio-free". In questa indagine l'isolamento di un solo poliovirus, identificato come Polio 3 tipo Sabin, è indicativa di una sua bassa circolazione nell'ambiente. Nel complesso, esiste una bassa circolazione di virus enterici come si evince dalla presenza di soli 4 altri campioni positivi.

Le metodiche biomolecolari, quali l'ibridazione, e il più recente test di reazione a catena della polimerasi (PCR), anche se hanno fornito un valido aiuto nello sviluppo analitico di questo parametro, risultano ancora più complesse e sofisticate.

Bibliografia

- (1) Divizia M, Palombi L, Buonomo E et al. *Genomic characterization of human and environmental polioviruses isolated in Albania*. Appl Env Microbiol 1999; 65:3534-39.
- (2) Divizia M, Panà A. *Determinazione degli enterovirus*. Rapporti ISTISAN vol. 2, pt. 2, 2000/14.
- (3) Decreto Presidente della Repubblica 24 maggio 1988, n. 236. *Attuazione della direttiva CEE n.80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano*, ai sensi dell'art. 15 della legge 16 aprile 1987, n. 183. Gazzetta Ufficiale del 30 giugno 1988 n. 60.
- (4) Decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152. *Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole*. Gazzetta Ufficiale del 29 maggio 1999 n. 101/L.
- (5) Decreto legislativo 10 maggio 1976, n. 319. *Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento*. Gazzetta ufficiale del 29 maggio 1976 n. 141.
- (6) Decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. *Attuazione sulla Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano*. Gazzetta Ufficiale del 3 marzo 2001 n. 41/L.
- (7) Donia D, Divizia M, Panà A. *Analysis of concentration methods for bacteriophages*. Ig Mod 1998; 109:475-82.
- (8) Donia D, Divizia M, Panà A et al. *Presence of bacteriophages in different stages of wastewater treatment*. Ig Mod 1999; 111:1-13.
- (9) Donia D, Divizia M, Panà A. *Determinazione del B 40-8, fago del Bacteroides fragilis*. Rapporti ISTISAN vol. 2, pt. 2, 2000/14.
- (10) Guidelines for drinking water quality, *Health criteria and other supporting information*. 2nd ed. vol. 2, Geneva, WHO, 1998.
- (11) Havelaar AH, Hogeboom WM, Pot R. *F specific RNA bacteriophages in sewage: smethodology and occurrence*. Wat Sci Tech 1984; 17:645-55.
- (12) Jofre J, Bosch A, Lucena F, Girones R, Tartera C. *Evaluation of Bacteroides fragilis bacteriophages as indicator of virological quality of water*. Wat Sci Tech 1986;18:167-73.
- (13) Fini L, Burrini D, Corte P. *Presenza e significato di colifagi in acque di varia origine: acqua di fiume, acqua di scarico e di effluente di impianto a fanghi attivi*. Ig Mod 1988; 89:45-52.
- (14) Nupen EM, Basson NC, Grabow WOK. *Efficiency of ultrafiltration for the isolation of enteric viruses and coliphages from large volumes of water in studies on wastewater reclamation*. Prog Wat Tech 1980; 12:851-63.
- (15) Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM. *General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections*. J Clin Microbiol 1992; 30 (1):160-65.

Referente: *Domenica Donia*

Università di Tor Vergata, Dipartimento Sanità Pubblica

Via Montpellier 1, - 00133 Roma RM

Tel 06-72596119 – fax 06-2025285 – e-mail: divizia@uniroma2.it

Editoriale**A. Panà, A. Muzzi**

- Le linee guida per la prevenzione sanitaria e per l'organizzazione del Dipartimento di prevenzione delle Asl 389

Note di Politica Sanitaria**E. Guzzanti, I. Mastrobuono, D. Bova**

- Gli anziani e la non autosufficienza: una sfida sanitaria, sociale e finanziaria 393

Parte Scientifica e Pratica**C. Zocchetti**

- Tra maschi e femmine chi consuma più risorse sanitarie? 401

A. Burgio, A. D'Errico, M.T. Tamburrano

- Il sistema ospedaliero del Servizio Sanitario Nazionale: efficienza e appropriatezza a livello regionale 413

M.C. Marazzi, L. Palombi, L. Emberti Gialloreti, G. Guidotti,**G. Liotta, F. Perno, S. Vella, P. Narciso**

- Primi risultati del Programma DREAM (Drug Resources Enhancement against AIDS in Mozambique) in Mozambico 431

Note di Approfondimento**V. Marin, L. Dalla Torre, C. Bertonecello**

- La popolazione carceraria: aspetti normativi ed epidemiologici ed analisi della letteratura 441

D. Donia, M. Divizia, A. Panà, D. Burrini, E. Lupi, B. Perito

- Applicazione dei parametri obbligatori ed accessori nel controllo di acque di diversa origine 455

Note di Documentazione**Conferenza Stato-Regioni:**

- Linee guida per la prevenzione sanitaria e per lo svolgimento delle attività del Dipartimento di prevenzione delle Aziende sanitarie locali
Repertorio Atti n. 1493 del 25 luglio 2002 (testo integrale) 467

- Indice generale per Sezioni e Rubriche - Vol. LVIII* 478