

Experteam nasce nel 1996 per opera dei biologi Angelo De Bortoli e Federica Schiavon con una serie di kit innovativi in biologia molecolare per la ricerca di virus, batteri, protozoi e per la ricerca di mutazioni genetiche e tumori.

- ATTIVITÀ:**
- Diagnostica genetica (Microdel., crom. Y, X Fragile, Celiachia, Fatt. cog., Aneuploidie)
  - Diagnostica virale (HPV, CMV)
  - Diagnostica batterica e parassitaria (T. gondi, G. lamblia)
  - Diagnostica oncologica (linfomi B e T, traslocazioni cromosomiche)
  - Determinazione di microorganismi negli alimenti (Salmonella e Listeria)
  - Diagnostica e monitoraggio ambientale

Organizzazione e coordinamento corsi specialistici

## SCOPO DEL PROGETTO

**"STUDIO COMPARATIVO SULL'UTILIZZO DEI DIVERSI KIT DIAGNOSTICO AMBIENTALI MESSI A PUNTO, ALLESTIMENTO DI KIT DIAGNOSTICO MOLECOLARE PER LA DETERMINAZIONE DELLA TRACCIABILITÀ DEI DIVERSI CEPPI DI VIRUS E MICRORGANISMI NELLE ACQUE E NEL SEDIMENTO"** Linea Progettuale n. 10

al fine di determinare:

- il rischio di contrarre patologie dall'uso ricreativo delle acque analizzate (D.P.R. 155 del 1988: attuazione della direttiva 76/160/CEE relativa alla qualità delle acque di balneazione)
- gli indici di qualità delle acque sulla base dei microorganismi e virus presenti

## INTRODUZIONE

La contaminazione delle acque di superficie con liquami ha assunto proporzioni rilevanti anche perché sempre più spesso vengono utilizzate, previo trattamento, come acque potabili. I liquami trasportano una grandissima quantità di microorganismi molti dei quali patogeni e responsabili di infezioni oro-fecali. Oltre ai batteri, essi veicolano anche molte particelle virali escrate con le feci dall'uomo e degli animali. I virus enterici, caratterizzati da labilità di infezione principalmente i tessuti del tratto gastroenterale, sono una delle principali cause di malattie nell'uomo e nei mammiferi [1,2]. Una volta escreti arrivano nelle acque fognarie ed, essendo in grado di resistere ai normali trattamenti di depurazione e disinfezione, provocano la contaminazione delle acque superficiali, marine e dei sedimenti. I virus enterici comprendono le seguenti specie: adenovirus, enterovirus, norovirus, rotavirus, hepatitis A virus (HAV). Gli adenovirus sono gli unici virus enterici a DNA; tra questi il ceppo F, o ai appartengono i sierotipi 40 e 41 [6,7,8], è il più noto e studiato dal punto di vista sanitario.

Gli enterovirus sono l'unico parametro virale contemplato dalla legislazione europea per il monitoraggio della qualità delle acque. Nello specifico questa italiana prevede la costante assenza nelle acque potabili di enterovirus (D.P.R. n°155 del 14 maggio 1988), Escherichia coli, enterobatteri patogeni (ex. *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*) e stafilococchi patogeni (ex. *Staphylococcus aureus*).

Vengono qui riportati gli studi relativi alle analisi mediante PCR per la determinazione di virus enterici

1) nelle acque di scarico di 10 differenti siti della regione Veneto, anche in relazione alla presenza di E. coli ed al tipo di disinfezione presente;



Localizzazione dei 10 siti lagunari di campionamento nei quali sono stati prelevati 10 litri d'acqua e 100 gr di sedimento.

## MATERIALI E METODI

Le acque di scarico prelevate allucida dei depuratori di 10 siti del Veneto sono state analizzate per i seguenti virus enterici: adenovirus, enterovirus, HAV, reovirus, norovirus, rotavirus, negli stessi siti si è voluto determinare anche la presenza di E.coli e si è posta l'attenzione sul tipo di disinfezione effettuata. La determinazione di adenovirus è stata effettuata mediante Nested PCR, su campione TQ, la determinazione di enterovirus mediante RT-nested PCR dopo un passaggio su cellule BGJ8, la determinazione di HAV, reovirus, norovirus e rotavirus, mediante RT-nested PCR su campione TQ. Per campione TQ si intende il campione che ha subito il solo passaggio di concentrazione (volume iniziale 10 l, volume finale 20 l). L'estrazione di DNA e RNA è avvenuta mediante i kit "QIAamp DNA mini kit" e "QIAamp Virus RNA mini kit" (Qiagen).

I campioni di sedimento (100 gr) sono stati conservati a -20 °C per un periodo massimo di due giorni. E' stato effettuato l'estrazione del DNA mediante il "FastDNA kit for Soil" e dell'RNA mediante il "FastRNA Pro Soil Direct Kit" (Q-Biogene) e il FastPrep Instrument (Qiagen). I campioni di DNA ed RNA estratti sono stati analizzati mediante i diversi kit Experteam messi a punto nel corso dei progetti Biotech 1 e 2: \*Adenovirus kit 1-ROV, HAV kit 1, Enterovirus kit 1, Adenovirus kit 1, Adenovirus kit 2, Norwalk virus kit 1, Rotavirus kit 1, Reovirus kit 1. Tutte le determinazioni di sedimento sono state effettuate direttamente sui campioni senza passaggio di concentrazione. Le determinazioni sulle acque relative su campioni TQ per tutte le determinazioni, tranne la det. di enterovirus per i quali è stato effettuato un passaggio su cultura BG6.



\*FastPrep Instrument" (Q-Biogene)

## RISULTATI

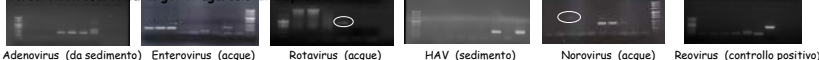
Tabella relativa alla determinazione di virus enterici nelle acque di scarico di 10 differenti siti della regione Veneto, in relazione alla presenza di E.coli ed al tipo di disinfezione presente.

Sito	Adenovirus	Enterovirus	Rotavirus	HAV	Reovirus	E. coli	Disinfezione
SA1	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA2	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA3	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA4	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA5	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA6	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA7	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA8	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA9	+	+	+	+	+	+	Cloro
SA10	+	+	+	+	+	+	Cloro

Tabella relativa alla determinazione di virus enterici nei sedimenti e nelle acque di 10 differenti siti della laguna di Venezia

Sito	Adenovirus	Enterovirus	Rotavirus	HAV	Reovirus	E. coli	Disinfezione	Analisi	Analisi	Analisi	Analisi	Analisi
SA1	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA2	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA3	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA4	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA5	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA6	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA7	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA8	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA9	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+
SA10	+	+	+	+	+	+	Cloro	+	+	+	+	+

Corse elettroforetiche in gel di agarosio di amplificati di:



## DISCUSSIONE

I dati relativi all'analisi delle acque di scarico hanno dimostrato come gli adenovirus risultino i migliori indicatori di contaminazione virale delle acque e che il trattamento di disinfezione migliore risultati quello con ipoclorito di sodio rispetto all'utilizzo di acido peracetico o al trattamento con radiazioni UV. Interessante l'analisi del sito 4, dove ad un'elevata presenza di E. coli si somma la positività all'analisi di enterovirus (unico sito positivo), la positività ad adenovirus e l'utilizzo di radiazioni UV come metodo di disinfezione. Interessante la positività a norovirus nel sito 3 e la positività al rotavirus nel sito 7.

I siti lagunari nei quali si riscontrano una maggiore positività a virus enterici (adenovirus, HAV e rotavirus) sono i siti SA1, SA4, SA5, SA6. Il sito SA4 è situato nelle vicinanze dell'Ospedale SS. Giovanni e Paolo. Le acque reflue dell'Ospedale vengono infatti scaricate direttamente in acqua ed è probabile che contengano una maggiore quantità di virus. Analogo il discorso per i siti SA5 e SA6, probabilmente positivi perché localizzati in piccoli canali nei quali vengono scaricate acque reflue. È da chiarire invece la causa della positività del sito SA1, dall'analisi delle acque dei quattro siti citati solo SA4 mostra effetto di diluizione; d'altra parte dobbiamo ricordare che tra i virus enterici gli unici che crescono in modo ottimale su cellule BG6 sono gli enterovirus e nessuno dei quattro siti presi in considerazione risulta positivo ad enterovirus. Viceversa il sito SA3 che mostra effetto cromatico risultava debolmente positivo all'analisi del sedimento per enterovirus, mentre gli enterovirus risultano stranamente assenti nell'acqua corrispondente.Dall'analisi dei dati riportati in tabella risulta come la determinazione qualitativa di adenovirus nel sedimento risulta di poco rilevante, dato che tutti i siti analizzati sono risultati positivi. Diversamente l'analisi del medesimo sedimento mediante Real Time PCR (quantitativa) è rilevabile solo per il sito SA6. Si infuoca quindi come la Real Time PCR abbia una sensibilità notevolmente inferiore rispetto alla PCR qualitativa nested. La determinazione qualitativa di adenovirus delle acque relative ha rilevato positività uncinamente per i siti SA5 e SA6. La positività nel sedimento alla determinazione di HAV nei campioni SA1, SA4 e SA6, non corrisposta da positività nei corrispondenti campioni acqua, conferma l'ipotesi che il sedimento funga da serbatoio di virus presenti nell'acqua. In ogni caso sembra che l'analisi del sedimento non possa essere utilizzato come indice di qualità delle acque sovrastanti. Nessun campione analizzato è invece