

VIRUS ENTÈRICS A AIGÜES URBANO-INDUSTRIALS

**FRANCISCO LUCENA, ALBERT BOSCH, ROSINA GIRONÉS
i JOAN JOFRE**

*Departament de Microbiologia.
Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.*

Rebut 30 Maig 1983

SUMMARY

Increasing amounts of wastewater are recled for human use. Neither the natural mechanism of virus inactivation, which vary from water to water, nor the methods used by man for water purification can guarantee the complete elimination of infectious viruses. Although the importance of the presence of human viruses in waters has not been fully stablished as the cause of viral infectious diseases, it becomes evident that the evaluation of viruses in waters is of major relevance. Such evaluation presents a great deal of difficulties, the most important one being the lack of indicator cells for the majority of human enteric viruses. So far, only Enteroviruses are well evaluated. The usual need of virus concentration prior to the evaluation of the viral load is another difficulty. There are a good deal of concentration methods which represent the main difference among the procedures used to evaluate the amount of virus in waters. Using the technique of adsorption-elution on glass powder and BGM cells as indicator system we have been evaluating in the last years the presence of Enterovirus in superficial waters in Barcelona and Surroundings. Poliovirus, Coxsackievirus and Echovirus have been detected either in the rivers (Llobregat and Besós) and in seawater.

INTRODUCCIÓ

L'urbanització molt ràpida que ha tingut lloc a molts països, ha portat a l'aparició de problemes crítics d'aprovisionament d'aigua i d'eliminació de residuos. Això fa que la major part d'aigües emprades com a font d'aigua potable continguin quantitats d'aigües usades en concentracions variables que en alguns casos com pot ésser a l'aprofitament d'aigües del Llobregat, probablement sobrepassa el 50 %, sobretot a l'estiu.

El mètodes actuals de tractament tant per la depuració com per la potabilització d'aigües no són sempre suficients per a impedir que els virus es trobin a les aigües utilitzades com a potables. Hi han dades que permeten assegurar que els enterovirus poden sobreviure a l'aigua més temps que els indicadors bacterians de contaminació fecal com *E. coli* i *Streptococcus faecalis*. A més fins ara no s'ha pogut establir una relació entre la presència d'Enterovirus i altres paràmetres de contaminació considerats com a bons indicadors.

Encara que els estudis fets als últims 30 anys sobre la presència de virus intestinals a l'aigua, no han permès avaluar l'importància sanitària d'aquesta contaminació, en part per problemes a la detecció d'aquests virus i en part per problemes lligats als estudis epidemiològics de les malalties per ells produïdes, es palesa l'importància del coneixement de la presència de virus d'origen humà a diferents tipus d'aigües.

VIRUS HUMANS A LES AIGÜES RESIDUALS

El que es trobi un virus d'origen humà a l'aigua depen de que arribi a ella i de que hi pugui sobreviure. Això fa que la quasi totalitat de virus originats a l'home que trobem a aigües siguin aquells alliberats

junt amb les excretes i que en podríem dir virus intestinals. S'en coneixen més de 100 tipus diferents que són resumits a la taula 1. Als excrements d'una persona infectada, presenti o no símptomes d'infecció, podem trobar fins a 1.000.000 de partícules infeccioses per gram de femta. A aigües residuals no depurades podem trobar fins a 100.000 partícules infeccioses per litre.

Aquestes partícules víriques, al menys les corresponents a enterovirus que són els millors estudiats, poden sobreviure llargs períodes a l'aigua. Els temps que apareixen a la literatura com a necessaris per reduir el nombre de virus en un 99 % a diferents tipus d'aigües és molt divergent, anant des de 2 fins a 160 dies. (KATZENELSON, 1978; HETRICK, 1978; RAY et al 1981).

Així mateix és ben conegut que tots els procediments de tractament d'aigües residuals eliminen en certa mesura els virus, però probablement ni una sola els elimina totalment (OMS, Rappports techniques, 1979; RAD, 1976; SCHWARTZBROD, 1979). Ni tan sols la cloració abans d'evacuar les aigües al ambient es la situació ideal.

Tampoc la majoria de procediments emprats per a tractar l'aigua destinada a beguda permeten de garantir l'eliminació total de virus en qualsevol situació. Potser tan sols la desinfecció amb clor, i encara només en determinades condicions la seva eficàcia total és problemàtica, i l'ozò poden garantir una eliminació total (OMS, Rappports techniques, 1979; FOLIGUET et DANCOEUR, 1975).

DESTI DELS VIRUS ANIMALS ALLIBERATS A LES AIGÜES

Es obvi que un dels factors més importants a l'eliminació de virus intestinals alliberats per l'home a les seves excretes és el poder d'autodepuració que exerceixen les aigües tant dolçes com marines.

TAULA 1. Virus intestinals humans que es troben a l'aigua

Grups de virus	Nombre de tipus
Enterovirus	(71)
Poliovirus	3
Echovirus	34
Virus Coxsackie A	24
Virus Coxsackie B	6
Nous enterovirus humans	4
Hepatitis A (probable Enterovirus)	1
Virus de la gastroenteritis (agents tipus Norwalk)	2
Rotavirus (família <i>Reoviridae</i>)	3
Adenovirus	> 30
Parvovirus (A.A.V.)	3

El poder d'autodepuració de les aigües varia segons les seves característiques. A zones a on es donen grans concentracions urbano-industrials com és el cas de Barcelona i el seu cinturó industrial que la rodeja, la contaminació d'origen industrial de l'aigua afecta el poder d'autodepuració de la mateixa al que respecta a microorganis-

mes d'origen fecal. No obstant és previsible que afecti diferencialment als diferents tipus de microorganismes i per tant podem pensar que la utilització d'un únic tipus d'indicador, com per exemple els indicadors bacterians, pot donar una visió equivocada dels nivells d'altres microorganismes com poden ésser els virus. A la taula 2 és resumeix breument algun dels aspectes com la contaminació d'origen industrial afecta als virus presents a aigües a les que hi ha barreja de contaminació fecal i industrial.

En primer lloc cal esmentar que l'augment de temperatura porta a un augment de l'inactivació (KATZENELSON, 1979). Normalment encara que l'efecte és limitat la contaminació d'origen industrial, més aviat escalfa l'aigua, amb el que caldria pensar en un augment, encara que petit, del poder d'inactivació.

Molt més important serien els components químics, que podrem agrupar en dos grans grups, que són materia orgànica i productes tòxics. En conjunt tal i com que-

TAULA 2. Influència de la contaminació no fecal sobre el destí dels enterovirus a l'aigua

INACTIVACIÓ	}	TEMPERATURA. Augment ↑	}	Materia orgànica	Recobriments virus ↓
		COMPONENTS QUÍMICS			Augment activitat predadors ↑
					Tòxics
		FACTORS BIOLÒGICS. Alteració nombre i activitat predadors ↑↓			
AGREGACIÓ	}	TENSOACTIUS ↓			
		SUSPENSIONS COLOIDALS ↑			
		PRESENCIA DE IONS (di i trivalents) ↑			
SEDIMENTACIÓ		FACTORS QUE AUGMENTEN AGREGACIÓ ↑			
PERMANÈNCIA AL SEDIMENT		INACTIVACIÓ ↓			

da reflectit a la taula dos podem pensar que com més contaminada químicament estigui l'aigua el balanç es més favorable als virus, ja que es veuen menys afectats que els bacteris d'origen fecal. Cal assenyalar que l'inactivació dels predadors que juguen un paper importantíssim als processos d'inactivació és segurament un dels factors més importants en el canvi de poder d'autodepuració d'aigües. Quan parlem de predadors ens referim tant a aquells que ingereixen el virus com aquells que els degraden a l'exterior de les cèl·lules, segurament mitjançant proteases extracel·lulars. Per el contrari, sembla que l'efecte dels contaminants químics directament sobre la viabilitat dels virus és relativament petita, com cal esperar de l'estructura i composició química dels virus intestinals humans, tots ells constituïts bàsicament d'un acid nucleic envoltat de moltes subunitats de un mateix polipéptid. (KAPUSCINSKI, R. B. i R. MITCHELL, 1980; JORDAN i MASSAR, 1971).

Pel que fa referència a l'aport de contaminació de tipus biològic diferent de la fecal, com podem ésser aigües amb gran contingut de microorganismes provinents d'industries de tipus agro-alimentàries, cal pensar que l'efecte sobre virus es té que relacionar forçosament també amb l'efecte d'aquesta població microbiana en el nombre i activitat dels microorganismes predadors (CLARKE et al 1962).

A més de l'inactivació hi han factors que afecten la presència de virus a aigües, principalment l'agregació i la sedimentació. Una i altra són també afectades per la contaminació d'origen no fecal. Així mateix la supervivència dels virus un cop als sediments també depend de la contaminació i es superior al temps de supervivència dels bacteris. Si considerem el sediment com a resultat final de tots aquests processos hi han dades de que a sediments de zones al-

tament contaminades en que no es troba cap indicador bacterià de contaminació fecal hi han quantitats importants de virus intestinals humans (SCHAIBERGER et al. 1982; COYAL et al. 1978; LaBELLE et al. 1980). Estudis preliminars fets al nostre Departament ens diuen que a les costes de-avant de Barcelona passa exactament el mateix.

Tot el que hem vist fins ara ens porta a pensar que malgrat la dificultat que comporta cal estudiar l'estat de la contaminació per virus intestinals humans dels diferents tipus d'aigües ja que els indicador bacterians de contaminació fecal no són bons indicadors de la presència de virus.

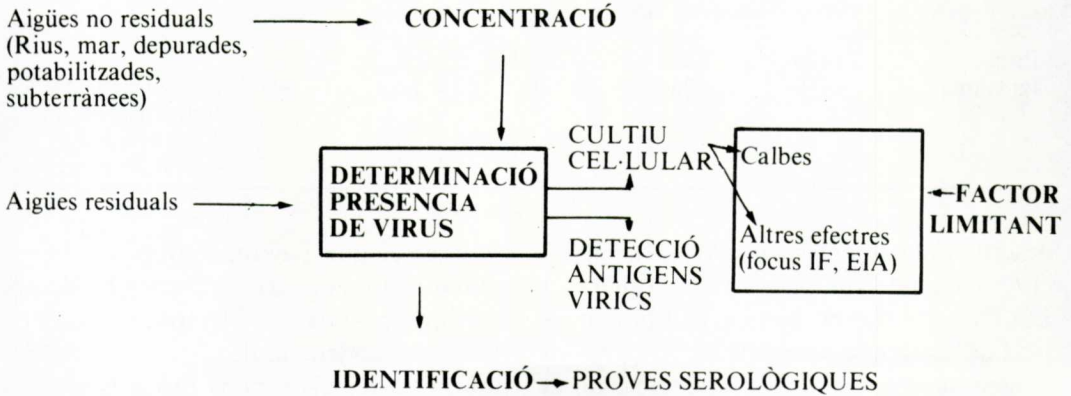
DETECCIÓ DE VIRUS HUMANS A LES AIGÜES

La metodologia per determinar la presència de virus a aigües és força complexa (Taula 3). No existeix un mètode únic que es pugui aplicar a la detecció de qualsevol tipus de virus i la quasi totalitat del mètodes descrits fins ara ho han sigut per enterovirus.

Si be a aigües residuals es pot quantificar directament alguns tipus de virus presents a les mateixes, a la majoria de tipus d'aigües no és poden titular directament, ja que l'anàlisi de grans quantitats de mostra sobre cultiu cel·lular es convertiria en una feïna enorme, totalment impossible de realitzar, al menys d'una manera rutinaria. Cal doncs concentrar els virus. Amb poques excepcions, a l'actualitat totes les tècniques normalment utilitzades per la detecció de virus a mostres d'aigua impliquen la concentració per la tècnica d'adsorció sobre un sustrate sòlid i posterior el·lució (RAY et al. 1981; OMS Rapports Techniques 1979; MORRIS i WAITE, 1980).

Aquest mètode de concentració per adsorció-el·lució es basa en trobar unes con-

TAULA 3. Determinació de la presència de virus humans a l'aigua



dicions en que els virus adsorbeixin a un substracte sòlid i unes altres en que s'alliberin (Taula 4). En uns casos es fan servir adsorbents amb càrrega positiva, descrits recentment. A pHs neutres els enterovirus s'adsorbeixen i després o be per alcalinització o be per la simple adició de matèria orgànica, per exemple extracte de carn, els virus s'alliberen. Encara que es previsible un canvi a la situació, per el moment són molt més emprats els adsorbents de càrrega negativa. A pHs neutres, adsorbents i enterovirus tenen la mateixa càrrega, cal baixar el pH de la mostra fins a 3,5 a la que els enterovirus tenen càrrega positiva.

Aleshores aquests adsorbeixen al substracte carregat negativament. Un posterior canvi a pH fortament alcali o l'adició d'extracte de carn, provoca l'alliberament dels virus adsorbits.

Els diferents substractes emprats com a adsorbents presenten degut a les seves característiques físiques diferents problemes, sobretot degut a que generalment s'emboquen (colmaten), el que fa que s'hagin d'establir operacions addicionals (Taula 4). Per aigües fortament contaminades generalment amb gran contingut de material particulat, és molt útil, i nosaltres el fem servir amb molt bons resultats, un mètode

TAULA 4. Diferents mètodes de concentració d'enterovirus a aigües per el sistema d'adsorció-elució

Adsorbent	Tipus de filtre	Necessitat de prefiltrat	Necessitat de reconcentració	Acidificació previa de la mostra
<i>Càrrega positiva</i>	Membrana, cartutx	SI	NO	NO
<i>Càrrega negativa</i>				
Nitrat de cel·lulosa	Membrana	SI	SI	SI
Fibra de vidre	Cartutx	SI	SI	SI
Resina epoxi				
fibra de vidre borosilicat	Cartutx	SI	NO	SI
Fibra de vidre, epoxi	Cartutx	SI	SI	SI
Pols de vidre	Dinàmic	NO	NO	SI

TAULA 5. Enterovirus a colectors d'aigües residuals del Barcelonès

Colector	Any	Valor mig (10 mostres) NMPUC/10 l	Valor màxim	Valor mínim	% Mostres positives	Virus aïllats
Prim	1979	3156	5500	120	100	—
Badalona	1980	234	1200	< 1.5	90	Poliovirus 1, 2 y 3; Poliovirus vacunal 1 y 3 Cox B 2, Cox B 5 Echo 11

descriu inicialment per SARRETE et al (1977) i modificat per SCHWARTZBROD i LUCENA (1978), en el que l'adsorbent es pols de vidre que es manté en suspensió a l'aigua durant el procés d'adsorció amb el que s'evita que es colmati el filtre. Aquest mètode ens permet concentrar els enterovirus de mostres de 25 litres d'aigües superficials fins a 50 ml, es a dir ens introdueix un factor de concentració de 500.

Ja sigui del concentrat o be directament de la mostra, si es tracte d'aigües residuals, es procedeix a la determinació de la presència de virus. Es pot determinar la presència de virus infecciosos si es disposa d'un sistema viu susceptible, es a dir d'un cultiu cel·lular. Per anàlisis més o menys rutinaris cal descartar l'utilització d'animals susceptibles, com podria pensar-se per estudiar la presència de virus de la hepatitis A.

Hi ha diferents efectes dels virus sobre els cultius cel·lulars. Sens dubte el més interessant és la formació de calbes, que a més de permetre una quantificació ens permet aïllar per la posterior identificació tots el virus presents a la mostra. Altres maneres d'estudiar la presència de virus es per determinació de l'efecte citopatogènic a cultius cel·lulars a medi líquid, lo que permet una quantificació segons el mètode del nombre més probable.

També es poden determinar altres efectes com "focus" de IF o EIA (immunoperoxidasa). Així no es disposa de cap cultiu

cel·lular al que puguin multiplicar be els rotavirus humans. Recentment s'ha descrit una línia cel·lular, la MA104, a la que els rotavirus poden multiplicar un cicle i prou, es a dir els virions produïts són defectius. Aleshores fen servir anticòsos fluorescens es poden detectar "foci" de fluorescència que corresponents als rotavirus presents (SMITH i GERBA).

De fet la disponibilitat d'un cultiu cel·lular sensible es de fet el factor que limita els tipus de virus que es possible detectar. En realitat sols es disposa de cultius cel·lulars que garanteixen el creixement dels diferents *Enterovirus*, essent les més utilitzades les línees cel·lulars BGM i Vero, ambdues de ronyó de mono. Per tant totes les metodologies actualment emprades estan bàsicament encaminades a l'estudi dels enterovirus, el que no vol dir que accidentalment no es pugui determinar la presència d'algun Reovirus o d'algun Adenovirus.

També es pot pensar en detectar antigens vírics, es a dir, partícules totals, mitjançant tècniques serològiques, en lloc de determinar partícules infeccioses. Aquestes metodologies serien aplicables a virus amb gran interès sanitari i per les que no es disposa de cultiu cel·lular sensible, com pot ésser el virus de la hepatitis A.

Recentment PROZDOS i KAZANTSEVA (1981) han descrit que poden detectar antigens del virus de la hepatitis A a aigües residuals a les èpoques de més gran mobili-

TAULA 6. Enterovirus als rius del Barcelonès

Riu	Any	Valor mig (24 mostres) NMPUC/10 l	Valor màxim NMPUC/10 l	Valor mínim NMPUC/10 l	% mostres positives	Virus aïllats
Besós	1980	149	550	2	100	Polio 1, 2, 3; Polio vacunal 2, 3; Cox B 2; Cox B 3; Echo 1
	1981	205	1200	<1.5	90	—
	1980	37	550	<1.5	89	Polio 1, 2, 3; Polio vacunal 2, 3; Cox B 2, Cox B 3; Echo 1 Cox B 5
Llobregat	1981	30	550	<1.5	70	—

tat entre la població i en canvi no el detectem a altres èpoques. La posta amb evidència d'antigens virics té la desventatge de que no dona una mesura directa de la qualitat virològica de l'aigua ja que no diferencia entre partícules víriques vives o mortes.

Un cop determinada la presència de virus a l'aigua es interessant procedir a la seva identificació. Per fer-ho cal primer purificar els diferents virus obtinguts a la fase previa, abans de fer l'identificació per proves serològiques, de les que la neutralització amb anticòsos específics es la més freqüent de totes.

ALGUNES DADES DE VIRUS PRESENTS A LES AIGÜES SUPERFICIALS DE BARCELONA

Des de 1979, al nostre Departament hem estat estudiant la presència de Enterovirus a aigües de diferents característiques a Barcelona i rodalies. Els virus s'han concentrat mitjançant la tècnica d'adsorció-elució sobre pols de vidre, detecció per mesura de l'efecte citopatogènic a cèl·lules

BGM i identificació quan s'ha fet per neutralització amb anticòsos específics. Per l'identificació s'ha tingut l'ajut del laboratori del Centre Nacional per l'identificació de virus de l'Institut Pasteur de Lyon. Cal assenyalar que l'identificació de virus quantificats segons la tècnica del nombre més probable d'unitats citopatogèniques a medi líquid, a alguns dels tubs amb efecte citopatogènic hi pot haver una infecció mixta i que a l'identificació sols trobem el que multiplica més ventatjosament.

Com exemple presentem algunes dades corresponents a aigües residuals (Taula 5), rius (Taula 6) i mar (Taula 7). Com es lògic el nombre d'Enterovirus presents va de més a menys, però cal assenyalar que s'han aïllat enterovirus a aigües de platjes relativament llunyanes de Barcelona, com es la platja de Castelldefels a una zona corresponent al termini municipal de Gavà i que en alguns casos dona unes concentracions de bacteris indicadors de contaminació fecals per davall dels valors considerats acceptables.

En quan als tipus d'Enterovirus identificats val a dir que es troben preferentment els tres tipus de poliovirus, ja siguin salvatges o vacunals, echovirus i coxsachie B.

TAULA 7. Enterovirus a les aigües de platjes del Barcelonès

Platja	Any	Valor mig (24 mostres) NMPUC/10 l	Valor màxim	Valor <i>mínim</i>	% mostres positives	Virus aïllats
Badalona	1980	2.8	46.5	< 1.5	22	Polio vacunal 3, Polio 1
	1981	0.43	3.5	< 1.5	18	—
	1980	0.12	1.5	< 1.5	8	Polio vacunal, 3 Echo 1
Barceloneta	1981	0.09	2	< 1.5	5	—
	1980	2.05	37.5	< 1.5	10.5	Polio 2 y 3
Gavà	1981	< 1.5	—	—	0	—

TAULA 8. Diversitat de les malalties provocades per membres del grup Enterovirus

Grups de virus	Malalties que provoquen
Poliovirus Echovirus	Paràlisis, meningitis i febre Meningitis, infeccions respiratòries, erupcions cutànies, diarrea i febre
Virus Coxsackie A	Faringitis vesiculosa, infeccions respiratòries, meningitis i febre
Virus Coxsackie B	Miocarditis, anomalies cardíques congènites, erupcions cutànies, infeccions respiratòries, meningitis i febre
Nous enterovirus humans	Meningitis encefàlitic infeccions respiratòries, conjuntivitis hemorràgica

IMPORTÀNCIA SANITARIA DE LA CONTAMINACIÓ PER VIRUS INTESTINALS HUMANS

L'importància que per la salut pública poden tenir concentracions de virus intestinals humans de magnituds com les senyalades a l'apartat anterior es un tema no resolt.

S'han descrit un nombre limitat d'epidèmies degudes a virus imputables a transmissió per aigües (MOSLEY, 1967; OMS, Reports techniques, 1979). No obstant, les tècniques epidemiològiques actuals no són prou sensibles per permetre la detecció d'una transmissió dèbil de malalties víriques del aigua, principalment per dues raons:

- La majoria de virus intestinals provoquen un nombre molt gran i variat de símptomes (Taula 8), que en casos dispersos presentarien una simptomatologia massa variada perquè s'els hi atribuis una sola etiologia.
- Molts virus són la causa d'infeccions silencioses o subclíniques que fan difícil determinar el seu origen.

De totes maneres cal assenyalar, que en els últims anys, el 60 % de tots els casos confirmats de malalties imputables al consum d'aigües potables als Estats Units de Nordamèrica han estat causades per agents desconeguts o no identificats, amb gran probabilitat virus d'origen intestinal humà.

Encara que alguns dels virus intestinals humans amb més interès sanitari avui dia, com es el virus de l'hepatitis A, amb una incidència clarament creixent als ultims anys o els rotavirus no es puguin detectar, els experts aconsellen fer servir els enterovirus que es poden detectar amb certa facilitat com a indicador de la presència d'altres virus patògens, doncs avui dia hi ha prou informació per assegurar que en moltes condicions com les que es donen a grans àrees urbano-industrials, els indicadors bacterians de contaminació fecal, no serveixen com a indicadors de la presència de virus.

BIBLIOGRAFIA

- DROZDOV, S. G. and V. A. KAZANTSEVA. Pathogenic viruses and environmental protection. *Vest. Akad. Med. Nauk. USSR*; 3:85-93 (1981).
- FOLIGUET, J. M. et F. DONCOEUR. Elimination des virus au cours du traitement de l'eau prechloration au "Breakpoint". *Water Research*, 8:651-657 (1974).
- FOLIGUET, J. M. et F. DONCOEUR. Elimination des Enterovirus au cours du traitement des eaux d'alimentation par coagulation-floculation-filtration. *Water Research*, 9:953-961 (1975).
- GOYAL, S. M., C. P. GERBA and J. L. MELNICK. Occurrence and distribution of bacterial indicators and pathogens in canal communities along the Texas coast. *Appl. and Env. Microbiol.* 34:139-149 (1977).
- HETRICK, F. M. Survival of human pathogenic viruses in estuarine and marine waters. *ASM New*, 44 (6):283-285 (1978).
- JORDAN, F. T. W. and T. J. MASSAR. The influence of cooper on the survival of infection bronchitis vaccine virus in water. *Vet. Rec.* 89:609 (1971).
- KAPUSCINSKI, R. B. and R. MITCHELL. Processes controlling virus inactivation in coastal waters. *Water Research*, 14:363-371 (1980).
- KATZENELSON, E. Survival of viruses. In indicators of viruses in water and food, pag. 39-50. Ed. by G. Berg. Ann Arbor Science. Ann Arbor. Michigan (1978).
- LABELLE, R. L., C. P. GERBA, S. M. GOYAL, J. L. MELNICK, J. CECI and G. F. BOGDAN. Relationships between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:588-586 (1980).
- MITCHELL, R. and H. W. JANNASCH. Processes controlling virus inactivation in seawater. *Environ. Sci. Technol.* 3:941 (1969).
- MORRIS, R. and W. M. WAITE. Evaluation of procedures for recovery of viruses from water. I. Concentration Systems. *Water Research* 14:795 (1980).
- MOSLEY, J. W. In transmission of viruses by the water route. Ed. by G. Berg. Interscience Publishers. New York, 1967.
- OMS. Séries de Rapports Techniques, N.º 639. Les virus humains dans les eaux, les eaux usées et le sol. Rapport d'un comité d'experts de l'OMS (1979).
- RAO, V. C. Monitoring, prevention and control of viral pollution of water. *Journal of the Calcutta Institute of Public Health Engineers*, 3:51-59 (1976).
- RAY, D., M. TITTLEBAUM and J. MEYER. Microbiology: detection, occurrence and removal of viruses. *Journal WPCF* 53(6):1138-1142 (1981).
- SARRETE, B. A., C. D. DANGLOT et R. VILAGINES. A new and simple method for recuperation of enterovirus from water. *Water Research* 11:335-38 (1977).
- SCHAIBERGER, G. E., T. D. EDMOND and Ch. P. GERBA. Distribution of enteroviruses in sediments contiguous with a deppe marine sewage outfall. *Water Research* 16:1425-1428 (1982).
- SCHWARTZBROD, L., et F. LUCENA. Concentration des entérovirus par adsorption-élution sur poudre de veurre. Proposition d'un appareillage simplifié. *Microbia*, 4:55-68 (1978).
- SCHWARTZBROD, L. et F. LUCENA. Étude de la population virale dans l'afluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires. *Journal Français d'Hydrologie*, 10 (28):7-20 (1979).
- SMITH, E. M. and Ch. P. GERBA. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl. and Environ. Microbiol.* 43 (6):1440-1450 (1982).