



**Università degli Studi di Sassari**

**SCUOLA DI DOTTORATO in  
SCIENZE VETERINARIE**

*Direttore: Prof. Sergio Ledda*

**INDIRIZZO: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare (XXVII CICLO)**

Coordinatore: Prof. Enrico De Santis

**Ricerca e caratterizzazione di protozoi zoonosici in mitili  
allevati e commercializzati nella Regione Sardegna**

**Docente Guida**  
Prof. Enrico De Santis

**Tutor**  
Dr. Sebastiano Virgilio

**Direttore**  
Prof. Sergio Ledda

**Tesi di dottorato della**  
Dr.ssa Sara Salza

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

The research presented and described in this PhD thesis was conducted at the Department of Food Hygiene of the Experimental Zooprophyllactic Institute of Sardinia, Italy.

The Author grants to University of Sassari the non-exclusive right to publish the Work electronically and in a non-commercial purpose make it accessible on the Internet. The Author warrants that he is the author to the Work, and warrants that the Work does not contain text, pictures or other material that violates copyright law.

© Sara Salza, November 2014

Printed by Copia-Copia s.r.l. Italy - <http://www.copiacopia.it/azienda.htm>

The printing of this thesis was supported by Experimental Zooprophyllactic Institute of Sardinia, Italy (<http://www.izs-sardegna.it/>) and the writing was created by Microsoft® Office 2010 Professional Edition - Redmond (USA) DTP and Scribus - Open Source Desktop Publishing®.

*Volevo rivolgere il mio modesto quanto sentito grazie a Prof. De Santis, il mio relatore, per la grande disponibilità e per la competenza dimostratami in tutti questi tre anni.*

*Un ringraziamento particolare a Dott. Virgilio, perché il raggiungimento di quest'importante traguardo scolastico, formativo e professionale, non è stato solo merito del mio impegno, ma è stato soprattutto grazie a lei, ai suoi insegnamenti, ai suoi consigli e ai suoi preziosi e affettuosi incoraggiamenti*

*Grazie di cuore Tiziana per avermi affiancato in laboratorio e*

*per il grande aiuto nella stesura di questa tesi*

*Alla mia famiglia, ai colleghi e agli amici*

*Per avermi affettuosamente supportato e... ..sopportato*

*in tutti questi anni di formazione e studio!*

## PREMESSA

L'Italia è il terzo produttore europeo di molluschi eduli lamellibranchi, dopo Spagna e Francia (IREPA, 2007). Nel 2005 sono state prodotte circa 180.000 tonnellate, di cui: 100.000 di mitili (*Mytilus galloprovincialis*); 40.000 di vongole veraci (*Tapes decussata* e *Tapes philippinarum*); 30.000 di vongole (*Venus gallina*). La molluschicoltura è la principale voce produttiva dell'acquacoltura nazionale: nel 2006, il 70,6% della produzione totale da acquacoltura (oltre 170.000 t) proveniva da allevamenti di molluschi e, in particolare, il comparto della mitilicoltura incidere per il 73% (oltre 125.000 t). Inoltre, su 979 impianti di acquacoltura censiti nel 2005 dall'IDROCONSULT, ben 442 riguardavano la molluschicoltura (ISMEA, 2007). Oltre il 40% degli impianti operanti nel settore dell'acquacoltura è localizzato in Veneto, seguito dalla Liguria (che vanta il maggior numero d'impianti di mitilicoltura), la Puglia, l'Emilia-Romagna, la Campania, il Friuli Venezia Giulia e la Sardegna.

Le vongole sono prevalentemente prodotte in Veneto e in Emilia-Romagna, mentre la produzione di mitili è più tipica delle regioni adriatiche e tirreniche, con la *leadership* dell'Emilia-Romagna, seguita dal Veneto, dalla Sardegna e dalla Puglia. In Sardegna le attività legate alla molluschicoltura sono presenti sin dal primo dopoguerra, quando vennero impiantati i primi allevamenti. Attualmente il comparto della molluschicoltura sarda appare consolidato: nel 2008, l'83% delle specie allevate in acquacoltura era rappresentato da molluschi, per un fatturato pari a Euro19.723.715,00 (SARDEGNA AGRICOLTURA/LAORE, 2009). La mitilicoltura, in particolare, occupa una posizione di rilievo: nel 2008 sono state prodotte in Sardegna circa 11.000 t di mitili, con un

incremento del 60% rispetto al 1992 (SARDEGNA AGRICOLTURA/LAORE, 2009).

Gli allevamenti di mitili sono dislocati principalmente nelle province di Oristano, Cagliari, Ogliastra ed Olbia-Tempio. Allo stato attuale, le zone classificate ai fini della produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi vivi sono 22 ([www.regione.sardegna.it](http://www.regione.sardegna.it)).

I molluschi bivalvi costituiscono quindi in tutto il mondo, Italia compresa, una delle principali risorse alimentari. La capacità dei molluschi di filtrare elevati volumi di acqua rende tali organismi in grado di concentrare un numero elevato di agenti patogeni per l'uomo e per gli animali. Questa abilità costituisce motivo di notevole preoccupazione soprattutto quando i molluschi vengono ingeriti crudi o poco cotti. L'attuale normativa italiana prevede la ricerca di *Salmonella* spp., di *Escherichia coli*, di tossine algali e metalli pesanti. Tuttavia un'enorme quantità di deiezioni contenenti anche protozoi di interesse zoonosico viene riversata, attraverso reflui zootecnici o urbani o tramite acque di dilavamento, nei fiumi. Questi, confluendo verso le acque costiere possono contaminare il mare e quindi i molluschi bivalvi.

Tra le specie di microrganismi parassitari, *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* assumono oggi notevole interesse in considerazione del loro possibile ruolo zoonosico.

## ABBREVIAZIONI

MBV	Molluschi Bivalvi Vivi
ISO	Organizzazione Internazionale per la Normazione
CE	Comunità Europea
UE	Unione Europea
CDC	Centre for Disease Control
OSA	Operatore Settore Alimentare
OA	Origine Animale
HACCP	Analisi dei Rischi e Controllo dei Punti Critici
CDM	Centro Depurazione Molluschi
CSM	Centro Spedizione Molluschi
UVAC	Uffici Veterinari per gli Adempimenti degli obblighi Comunitari
A.S.L.	Azienda Sanitaria Locale
I.Z.S.	Istituto Zooprofilattico Sperimentale
µl	microlitro
r.p.m	revolutions per minute
DNA	Acido desossiribonucleico
dNTP	Deossi-nucleotide-tri-fosfato.
PCR	Reazione a catena della polimerasi
Real time PCR	Reazione a catena della polimerasi in tempo reale
HRM	High Resolution Melting

## SUMMARY

Bivalves mollusks are one of the main worldwide food resource. In terms of food safety, in addition to being contaminated with the microorganisms indicators of health provided under Italian and European Community law (*E. coli* and *Salmonella* spp.), live bivalves mollusks may also be contaminated with 'emerging' microorganisms of fecal origin which are of considerable zoonotic interest. Of these, *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma*, known as agents of human infection, are little known and very underestimated in terms of health and thus not contemplated in the current legislation.

In consideration of the most recent acquisitions, it was demonstrated that: 1. oral-fecal infections, caused by these pathogenic protozoa, are widespread and frequently diagnosed in Italy; 2. some genotypes of these species can be shared by animals and humans, therefore they have a zoonotic interest; 3. if present in the mollusks, the processing and shellfish purification times currently required by law do not guarantee elimination, leading to a risk of infection for the consumers.

**AIM 1:** To acquire epidemiological data on the occurrence, distribution and parasitic burden of interesting zoonotic protozoa (*Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma*) in mussels from farms along the coasts of Sardinia.

**AIM 2:** To apply immunological test and molecular procedures for the simultaneous qualitative analysis of *Giardia*, *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* in mussels farmed for human consumption, and sequencing for molecular characterization (up to the level of genotype) through the use of more genetic markers and to estimate the real health risk of infection with *Giardia*, *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* for the consumer.

**Materials and Methods:** N. 85 samples of live mussels from different breeding areas of Sardinia and from commercial circuit were examined. From each sample were

obtained 2 different pools; the first one with digestive gland and the second with gills of shellfish. Every pool were processed for the research and genetic characterization of protozoans, using molecular biology techniques (Nested-PCR) i.e. extraction of DNA from each tissue/organ of the mollusk and molecular research by Real Time of Giardia (gdh/Tpi/ $\beta$  giardina), Cryptosporidium (COWP/gp60) and Toxoplasma (B1). The products was be sequenced for the identification up the sub-genotype level.

### **Results:**

The commercially available direct immunofluorescence antibody test used for the research of Cryptosporidium and Giardia gave negative results for all samples tested and for both protozoa.

The different diagnostic techniques, PCR and Nested PCR, gave negative results for Cryptosporidium, Giardia and Toxoplasma in all pools.

The Real Time PCR techniques has highlighted the following results out of 170 digestive glands and gills pool sample tested: 11 (6.4%) pools were positive for Cryptosporidium parvum, 8 (4.7%) for Giardia duodenalis and 17 (10%) for Toxoplasma gondii.

The sequence analyzed of all these amplicons revealed Giardia duodenalis assemblage A, Cryptosporidium parvum and Toxoplasma gondii type 1.

The results of this study represent the first data collected in Sardinia about the presence of Cryptosporidium, Giardia and Toxoplasma in specimens of Mytilus galloprovincialis.

The demonstration of a real risk for the consumer should be considered in order to modify/integrate the existing legislation.

**Considerations:** low prevalence, but genotypes of protozoa that are potentially pathogenic to humans detected in products intended for direct human consume.



## INDICE

PREMESSA .....	4
ABBREVIAZIONI .....	6
SUMMARY .....	7
INTRODUZIONE.....	11
I Molluschi bivalvi .....	11
I molluschi nell'alimentazione umana .....	13
La filiera produttiva.....	14
Rischi sanitari associati al consumo dei MBV.....	27
Protozoi zoonosici nei molluschi bivalvi .....	28
Il Genere <i>Cryptosporidium</i> .....	31
➤ Ciclo biologico.....	31
➤ Vie di trasmissione.....	32
➤ Criptosporidiosi umana.....	37
➤ Criptosporidiosi negli animali .....	40
➤ Profilassi, terapia e disinfezione .....	41
➤ Caratterizzazione genotipica.....	42
Il Genere <i>Giardia</i> .....	48
➤ Il ciclo biologico .....	49
➤ Vie di trasmissione.....	50
➤ Giardiasi umana .....	54
➤ Giardiasi negli animali.....	57
➤ Profilassi, Terapia e Disinfezione.....	58
➤ Caratterizzazione genotipica.....	59
Il Genere <i>Toxoplasma</i> .....	60
➤ Ciclo biologico.....	61
➤ Vie di trasmissione.....	63
➤ <i>Toxoplasmosi umana</i> .....	68
➤ <i>Toxoplasmosi</i> negli animali.....	70
➤ Caratterizzazione genotipica.....	73

Tecniche analitiche.....	74
Colorazioni per microscopia a luce ordinaria e a fluorescenza.....	74
Tecniche immunologiche.....	75
Tecniche di biologia molecolare.....	76
SCOPO DELLA RICERCA.....	81
MATERIALI E METODI.....	83
➤ Preparazione del campione.....	84
➤ Immunofluorescenza diretta.....	84
➤ Lisi della parete (oo)cistica.....	85
➤ Estrazione del DNA.....	85
Indagini molecolari.....	86
➤ Real Time PCR.....	92
➤ Analisi HRM.....	94
Sequenziamento.....	95
RISULTATI.....	96
Immunofluorescenza.....	96
PCR-Nested PCR.....	96
Real Time PCR.....	97
Sequenziamento.....	99
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	100
FIGURE.....	104
TABELLE.....	120
BIBLIOGRAFIA.....	124

## INTRODUZIONE

### ➤ *I Molluschi bivalvi: cenni di anatomia e fisiologia*

I molluschi bivalvi sono organismi acquatici appartenenti al phylum dei molluschi, classe bivalvi. Ne fanno parte più di 8500 specie, tra cui i fasolari (*Mercenaria mercenaria*), le ostriche orientali (*Crassostrea virginica*), le ostriche europee (*Crassostrea gigas*), le comuni cozze (*Mytilus edulis*), le cozze mediterranee (*Mytilus galloprovincialis*) e le vongole (*Cerastoderma edule*). I molluschi bivalvi sono caratterizzati dal possedere una conchiglia formata da due valve incernierate tra loro da denti e fossette. Le valve prodotte dal mantello si sviluppano dall'umbone (zona con i resti della conchiglia embrionali) e l'accrescimento è evidenziato da linee concentriche, parallele ai margini liberi delle valve. L'acqua di mare fornisce il carbonato di calcio da cui è prevalentemente costituita la conchiglia. Le valve sono tenute aperte dall'azione di un potente legamento elastico, al quale si oppongono uno o due potenti muscoli adduttori (Fig.1). Il mantello lascia sulle valve l'impronta palleale, delimitata dalla linea palleale, in alcune specie presenta un'insenatura (seno palleale), la cui presenza attesta che l'animale era provvisto di sifoni retrattili. Il mantello secerne la conchiolina contenente carbonati di calcio che solidificandosi forma lo strato esterno della conchiglia (periostraco). Sotto a quest'ultimo c'è lo strato prismatico formato da cristalli di calcite di forma prismatica ordinatamente orientati perpendicolarmente alla superficie delle valve. In alcune specie di bivalvi è presente uno strato madreperlaceo direttamente a contatto con il mantello. Il corpo dei molluschi è racchiuso dal mantello. Il liquido intravalvare, contenuto nello spazio delimitato dal mantello, permette gli

scambi gassosi e metabolici con l'ambiente circostante. Questo liquido consente inoltre ai molluschi di poter sopravvivere per molto tempo al di fuori dell'ambiente marino. Immerse nel liquido intravalvare vi sono le branchie, di forma lamellare che oltre alla funzione respiratoria hanno anche quella di raccolta dell'alimento, costituito principalmente da fitoplancton e zooplancton. L'alimento introdotto con l'acqua dal sifone inalante, viene incluso nelle secrezioni mucose delle branchie e spinto da ciglia verso la bocca. Nella bocca i palpi selezionano il materiale da introdurre nell'apparato digerente e quello di scarto da allontanare mediante il sifone esalante (fig.2). L'apparato circolatorio è costituito da un cuore dorsale racchiuso in un pericardio che comprende un ventricolo e due atrii laterali. La circolazione dei bivalvi è aperta, ossia il sangue inonda i tessuti formando un sistema lagunare in parte del suo percorso. I molluschi sono animali a sangue freddo e quindi la loro temperatura corporea si adatta a quella dell'ambiente. I molluschi bivalvi presentano due reni (nefridi) a entrambi i lati del cuore, nei quali avviene una filtrazione del sangue. Il filtrato finisce nella cavità del mantello e in seguito viene eliminato all'esterno. La distinzione tra i due sessi nel genere *Mytilus* è possibile grazie all'osservazione del colore del mantello, il quale una volta raggiunta la maturità sessuale, si presenta di colore giallo crema nei maschi e di colore rosso arancio nelle femmine. La riproduzione avviene emettendo sperma e uova nell'acqua, dove avviene la fecondazione esterna. Le larve attraversano diversi stadi di sviluppo prima di diventare adulte, quando per mezzo del bisso, un filamento bruno che secernono e che si solidifica a contatto con l'acqua, sono in grado di fissarsi a rocce o supporti duri. La sua vita media è di circa quattro anni e l'attività sessuale dura per tutta la vita. Ha una fecondazione crociata (1).

*Mytilus galloprovincialis*

Conchiglia equivalve, inequilaterale, di colore nero. La conchiglia presenta un bordo anteriore dritto e quello posteriore arrotondato. Dimensione comune 50-80 mm (Fig.3).

*Mytilus edulis*

Conchiglia equivalve, inequilaterale, di colore nero. La distinzione fra le due specie è difficile, *M. edulis* ha forma trapezoidale che gli conferisce un aspetto maggiormente slanciato. Dimensione comune 50-80 mm (2) (Fig.4).

➤ ***I molluschi nell'alimentazione umana***

I molluschi hanno sempre rappresentato una parte della dieta umana: tutti i popoli che vivono vicino al mare li hanno sempre raccolti per alimentarsene. I molluschi sono particolarmente apprezzati dai consumatori per le loro proprietà nutrizionali e per i benefici che comporta il loro consumo. Il 10% del peso dei molluschi è rappresentato da proteine di elevato valore biologico e a basso costo (3). I grassi sono presenti in quantità limitate (tra 1% e il 3% del peso) e sono costituiti principalmente da acidi grassi polinsaturi a lunga catena (4). Le carni dei molluschi bivalvi contengono alte percentuali di basi azotate, nonché alte concentrazioni di arginina e acido aspartico e glutammico, superiori a quelle riscontrate nei pesci. La differenza più significativa tra crostacei e molluschi è rappresentata dal maggior contenuto di carboidrati dei secondi: per esempio, i carboidrati (in gran parte glicogeno) costituiscono il 3,4% della polpa dei

bivalvi e cappellette e il 5,6% della polpa delle ostriche (5). I molluschi inoltre risultano una fonte eccellente di vitamina B12 e contengono in misura variabile le altre vitamine del gruppo B. Quanto ai minerali, iodio (utile per il funzionamento della tiroide), ferro (necessario per il legame dell'ossigeno ai globuli rossi), zinco (importante per la crescita e per il sistema immunitario) e selenio (antiossidante) sono molto ben rappresentati. I molluschi bivalvi per il loro basso contenuto calorico (tra le 70 e le 85 calorie/ 100 grammi) e la scarsa presenza di tessuto connettivo nelle carni che risultano quindi morbide e altamente digeribili risultano anche molto adatti per le diete.

### ➤ **La filiera produttiva**

La produzione dei molluschi avviene sia mediante coltivazione sia mediante raccolta da banchi naturali. Il “Produttore” è “la persona fisica o giuridica che raccoglie molluschi bivalvi vivi con qualsiasi mezzo in una zona di raccolta allo scopo di trattarli e immeterli nel mercato”(All. I del Reg (CE) 853/2004). Per “zona di produzione” si intendono “le parti di mare, di laguna o di estuario dove si trovano banchi naturali di molluschi bivalvi oppure luoghi utilizzati per la coltivazione di molluschi, dove quest’ultimi vengono raccolti vivi”(All. I del Reg (CE) 853/2004). La prima linea di controllo si basa sul monitoraggio dell’area di raccolta mediante la determinazione di un batterio indicatore di contaminazione fecale, *Escherichia coli*, usando un metodo standardizzato (ISO 16649-3) per valutare l’entità della contaminazione da scarichi nell’area di raccolta. La qualità sanitaria dell’area di raccolta determina il livello di trattamento che i molluschi devono subire prima di essere posti nel mercato. Nello specifico il Reg. CE 854/2004 prevede una distinzione delle zone di produzione

destinate all'allevamento dei mitili nelle tre classi A, B e C.

Zona di classe A: I molluschi possono essere raccolti e andare direttamente al consumo umano. Una zona di classe A deve soddisfare i seguenti requisiti:

- *E. coli*: non oltre 230 MPN (Most Probable Number) per 100 g di polpa e liquido intravalvare;
- *Salmonella spp*: assente in 25 g di polpa di mollusco e di liquido intravalvare;
- Mercurio: non oltre 0,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Piombo: non oltre 1,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Biotossine: complesso DSP (Diarrhetic Shellfish Poison):
  - Acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine non oltre 160 µg di equivalente acido okadaico/Kg;
  - yessotossine non oltre 1 mg di equivalente yessotossine /Kg;
  - azaspiracidi non oltre 160 µg di equivalente acido azaspiracido/Kg;
- ASP (Amnestic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non oltre 20 mg/Kg di acido domoico (secondo il metodo di analisi HPLC riportato nell'allegato del D.M. 16/5/2002);
- PSP (Paralytic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non oltre 800 µg di equivalente di saxitossina/Kg , utilizzando il metodo biologico.
- Nuclidi radioattivi: nei limiti previsti dalla normativa vigente.

**Zona di classe B:** i molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A.

Una zona B deve soddisfare i seguenti requisiti:

- *E. coli*: non oltre 4600 MPN per 100 g di polpa e liquido intravalvare secondo il metodo MPN in cinque provette e tre diluizioni, o altro metodo alternativo se convalidato rispetto a questo metodo di riferimento secondo i criteri fissati dalla norma EN/ISO 16140;
- Mercurio: non oltre 0,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Piombo: non oltre 1,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Biotossine: complesso DSP (Diarrhetic Shellfish Poison):
  - Acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine non oltre 160 µg di equivalente acido okadaico/Kg;
  - yessotossine non oltre 1 mg di equivalente yessotossine /Kg;
  - azaspiracidi non oltre 160 µg di equivalente acido azaspiracido/Kg;
- ASP (Amnestic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non oltre 20 mg/Kg di acido domoico (secondo il metodo di analisi HPLC riportato nell'allegato del D.M. 16/5/2002);
- PSP (Paralytic Shellfish Poison) nelle parti commestibili non oltre 800 µg di equivalente di saxitossina/Kg , utilizzando il metodo biologico.
- Nuclidi radioattivi: nei limiti previsti dalla normativa vigente.

**Zona di classe C:** i molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto esclusivamente previa stabulazione, per un periodo non inferiore a due mesi, in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A. La stabulazione può essere associata o meno ad un processo di depurazione intensivo. I molluschi raccolti da tali zone devono soddisfare i seguenti requisiti:



- *E. coli*: non oltre 46000 MPN per 100 g di polpa e liquido intravalvare secondo il metodo MPN in cinque provette e tre diluizioni, o altro metodo alternativo se convalidato rispetto a questo metodo di riferimento secondo i criteri fissati dalla norma EN/ISO 16140;
- Mercurio: non oltre 0,5 ppm nella polpa del mollusco;
- Piombo: non oltre 1,5 ppm nella polpa del mollusco;

## **La raccolta**

La pesca dei molluschi bivalvi viene fatta soprattutto sui fondali sabbiosi. Possono essere utilizzati diversi attrezzi, come draghe idrauliche o turbosoffianti, rastrelli e attrezzi da traino, con barche da tonnellaggio variabile tra le 10 e le 15 tonnellate stazza lorda. Le draghe idrauliche o turbosoffianti sono attrezzi che penetrano nel fondo marino. Il sistema consente di trattenere i molluschi espellendo con dei getti d'acqua sabbia e fango. I rastrelli sono attrezzi che possono essere trainati a mano o da piccole imbarcazioni. Le tecniche di raccolta e le successive manipolazioni non devono provocare una contaminazione ulteriore del prodotto o danni eccessivi ai gusci o ai tessuti. In particolare gli OSA non devono esporre i molluschi bivalvi a temperature eccessive, devono proteggerli da compressioni, abrasioni o vibrazioni e non li devono immergere nuovamente in acqua che potrebbe contaminarli ulteriormente. I mezzi di trasporto devono garantire un adeguato drenaggio e le migliori condizioni di sopravvivenza e devono fornire una protezione contro la contaminazione.

## Depurazione e stabulazione

Ai sensi del Reg (CE) 853/2004 successivamente alla raccolta i molluschi bivalvi giungono presso un Centro di Depurazione. Se provenienti da zona di Classe A vengono direttamente condotti presso un Centro di Spedizione per il confezionamento e l'etichettatura.

Se i molluschi provengono da aree di raccolta non di categoria A è necessario un trattamento di depurazione o stabulazione per ottenere molluschi che abbiano i requisiti dalla Zona A.

- **Depurazione:** i molluschi contaminati possono essere purificati mettendoli in vasche con acqua di mare pulita per permettere che continuino il processo di nutrizione per filtrazione, al fine di decontaminarsi dai patogeni delle acque contaminate. La depurazione è accettabile solo per i molluschi raccolti in aree B.
- **Stabulazione:** i molluschi raccolti nelle aree contaminate sono trasferiti in ambienti naturali microbiologicamente puliti per il tempo necessario alla riduzione dei contaminanti affinché diventino idonei al consumo umano.
- **Trattamento con calore:** per distruggere i patogeni prima del consumo.

La depurazione avviene in un Centro di Depurazione: *“lo stabilimento comprendente bacini alimentati con acqua marina pulita, in cui i molluschi bivalvi vivi sono collocati per il tempo necessario alla riduzione dei contaminanti affinché diventino idonei al consumo umano”*(All. I del Reg. (CE) 853/2004). La stabulazione avviene in una Zona di Stabulazione: *le parti di mare, di laguna o di estuario, chiaramente delimitate e segnalate mediante boe, paletti o qualsiasi altro strumento fisso e destinate*

*esclusivamente alla depurazione naturale dei molluschi bivalvi vivi* “(All. I del Reg. (CE) 853/2004). Per Stabulazione s’intende il “*trasferimento di molluschi bivalvi vivi in zone marine, lagunari o di estuari per il tempo necessario alla riduzione dei contaminanti affinché diventino idonei al consumo umano; ciò non include l’operazione specifica di trasferimento dei molluschi bivalvi in zone più adatte a una crescita o un ingrasso ulteriori*” (All. I del Reg. (CE) 853/2004). Affinché il processo di depurazione sia efficace sono fondamentali il tempo di trattamento del prodotto, la vitalità dei molluschi e le caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche dell’acqua. I regolamenti comunitari non stabiliscono regimi standard di tempi e temperature per la depurazione. Cariche batteriche della categoria B vengono in gran parte eliminate entro 24 - 48 ore durante la depurazione in impianti idonei. Se i molluschi provengono da Zone di Classe C è necessario un trattamento di stabulazione di lunga durata per ottenere molluschi che hanno i requisiti della Zona A. I molluschi bivalvi vivi provenienti da Zone B e C che non sono stati sottoposti a depurazione o stabulazione possono essere inviati ad uno stabilimento di trasformazione, dove devono essere sottoposti ad un trattamento termico che elimina i microrganismi patogeni. Dev’essere garantito il controllo delle biotossine termoresistenti. I metodi di trattamento termico consentiti per i molluschi delle zone B e C non sottoposti a depurazione o stabulazione comprendono: 1) immersione in acqua bollente per il tempo necessario a portare la temperatura interna della loro carne ad un minimo di 90°C e mantenimento di questa temperatura interna per almeno 90 secondi. 2) cottura, da 3 a 5 minuti, in un contenitore chiuso la cui temperatura sia compresa fra 120 e 160°C e la pressione compresa fra 2 e 5 Kg/cm<sup>2</sup>, con successiva sgusciatura nonché congelamento della carne a -20°C al centro della massa. 3) cottura a vapore sotto pressione.

### Depurazione a ciclo aperto

Sono impianti che non recuperano l'acqua successivamente al contatto con i molluschi. Si utilizza acqua di mare o della laguna che prima dell'immissione nelle vasche viene filtrata meccanicamente per eliminare il materiale corpuscolato, disinfettata utilizzando cloro, raggi ultravioletti oppure ozono e addizionata di ossigeno.

### Depurazione a ciclo aperto

Sono impianti dove al termine del ciclo depurativo l'acqua viene recuperata. Questi impianti offrono il vantaggio di poter variare i parametri fisici e chimici dell'acqua, permettendo di adattarli alle esigenze degli animali.

## **Marchiatura ed etichettatura dei molluschi bivalvi**

I molluschi possono essere immessi nel mercato solo attraverso un centro di spedizione. Tale centro deve avvalersi della consulenza di un laboratorio di analisi detto di "autocontrollo" per verificare l'idoneità dei MBV ad essere immessi in commercio. Dopo il lavaggio, la pulitura e la calibratura i molluschi vengono confezionati e imballati. *"Tutti i colli di molluschi bivalvi vivi che lasciano i centri di spedizione o sono destinati ad un altro centro di spedizione, devono essere chiusi. I colli di molluschi bivalvi vivi, destinati alla vendita al dettaglio diretta, devono restare chiusi fino alla presentazione per la vendita al consumatore finale"* così modificato dal Reg. (CE) 558/2010). La confezione deve assicurare la vitalità dei molluschi al di fuori

dell'ambiente naturale, consentire quindi un adeguato ricambio d'aria ed evitare il più possibile l'apertura delle valve contribuendo in tal modo al trattenimento dell'acqua intravalvare nelle conchiglie. L'operatore alimentare deve “*garantire che i prodotti di origine animale abbiano una marchiatura d'identificazione*”(Reg (CE) 853/2004, All.II, Sez.I). Per i molluschi bivalvi non è previsto un Bollo Sanitario, come in passato, ma un **marchio d'identificazione** che attesta che il prodotto di origine animale è stato prodotto in conformità al Reg. (CE) 853/2004 in stabilimenti riconosciuti. Il marchio dev'essere leggibile e indelebile e i caratteri devono essere facilmente decifrabili; dev'essere chiaramente esposto in modo da poter essere controllato dalle autorità competenti. Deve identificare il nome del Paese in cui è situato lo stabilimento, indicato per esteso o mediante un codice a due lettere conforme alla norma ISO pertinente (per l'Italia IT, per la Spagna ES, per la Francia FR ecc.). Il marchio deve indicare il numero di riconoscimento dello stabilimento. Se apposto in uno stabilimento all'interno della Comunità, il marchio deve essere di forma ovale e recare l'abbreviazione CE. Il marchio può essere apposto direttamente sul prodotto, sull'involucro o sull'imballaggio o essere stampato su un etichetta apposta a sua volta sul prodotto, sull'involucro o sull'imballaggio. Il marchio può consistere anche in una targhetta inamovibile di materiale resistente. L'etichetta, compreso il marchio d'identificazione, deve essere impermeabile. Oltre il marchio deve contenere (Reg. (CE) 853/2004, All.III, Sez.VII, Cap.VII):

- specie dei molluschi bivalvi (denominazione comune e scientifica)
- data d'imballaggio, con identificazione almeno del giorno e del mese

*In deroga alla direttiva 2000/13/CE, il termine minimo di conservazione può essere sostituito dalla menzione “Questi animali devono essere vivi al momento dell'acquisto”.*

In etichetta devono essere riportati anche il metodo di produzione (cattura in mare o nelle acque interne o allevamento) e la zona di cattura.

L'etichetta deve riportare inoltre:

- Quantità netta
- Nome o ragione sociale o marchio depositato o sede del confezionatore;
- Sede dello stabilimento di confezionamento;
- Identificativo del lotto;
- Modalità di conservazione ed utilizzazione;
- Luogo di origine o di provenienza, nel caso in cui l'omissione possa trarre in inganno l'acquirente.

Oltre al tradizionale e diffuso sistema di confezionamento dei molluschi bivalvi vivi in reti di plastica è possibile trovare confezioni sottovuoto e in atmosfera protettiva, che ne garantiscono una sopravvivenza analoga o leggermente superiore al sistema tradizionale. Dal punto di vista microbiologico, il confezionamento sottovuoto, combinato con una refrigerazione a 4°C, limita lo sviluppo della flora microbica; resta tuttavia il rischio di sviluppo di *Clostridium botulinum* che può moltiplicarsi anche a queste condizioni. In queste confezioni deve essere indicato il termine minimo di conservazione.

### ***Parametri microbiologici per l'immissione sul mercato dei molluschi bivalvi vivi***

Secondo il Regolamento (CE) n. 1441/2007 che modifica il Regolamento (CE) 2073/2005 tutti i molluschi bivalvi vivi immessi nel mercato durante il loro periodo di

conservabilità devono essere conformi ai limiti stabiliti nei criteri di sicurezza alimentare per *Salmonella* e *E.coli*. La *Salmonella* deve essere assente in 25 g in 5 unità campionarie (n=5) mentre *E.coli* deve essere < 230 MPN/100 g di polpa più liquido intravalvare in 1 unità campionaria formata da un campione aggregato costituito da almeno da 10 animali. Gli OSA devono eseguire controlli per assicurare il rispetto di questi criteri.

## **Normativa comunitaria e nazionale**

Il pacchetto igiene comprende tre Regolamenti d'importanza fondamentale per la produzione di molluschi bivalvi che devono essere applicati dagli Stati membri dell'UE. Il Reg. (CE) 852/2004 sull'igiene degli alimenti definisce i requisiti generali che gli OSA devono rispettare, attribuendo agli stessi la responsabilità della sicurezza degli alimenti. Introduce i requisiti per l'applicazione dei principi HACCP durante i processi di produzione, tuttavia non si applica alla produzione primaria. Nel settore dei molluschi bivalvi, i principi del sistema HACCP devono essere applicati durante trattamenti quali la depurazione o la cottura, ma non durante la raccolta. Il Reg. (CE) 853/2004 fornisce i requisiti per gli alimenti di origine animale per l'industria. La sezione VII dell'allegato III si applica ai molluschi bivalvi vivi. Le disposizioni relative alla classificazione delle zone di produzione si trovano nel capitolo II, parte A. Il Reg. (CE) 854/2004 riguarda l'organizzazione e l'applicazione dei controlli ufficiali sui prodotti di OA dalle autorità competenti degli Stati membri. Per la normativa sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (Reg. (CE) 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il Reg. (CE) 2073/2005 tutti i molluschi bivalvi vivi immessi sul mercato durante il loro periodo di

conservabilità devono essere conformi a questi limiti: *E.coli* < 230 MPN/100 g di carne più liquido intravalvare (indice di contaminazione fecale) e *Salmonella* assente in 25 g. I produttori di molluschi bivalvi hanno la responsabilità di eseguire controlli regolari dei loro prodotti che entrano nel mercato per assicurare la corrispondenza con questi standard.

## **Normativa regionale**

**Piano Regionale per la Vigilanza ed il Controllo Sanitario della Produzione e Commercializzazione dei MBV e per la Sorveglianza Periodica delle Zone di Produzione e di Stabulazione di MBV – Anno 2008 – Det N1067 del 21/12/2007  
Direttore Servizio Prevenzione.**

Lo scopo del piano è garantire un'attività coordinata dei servizi veterinari e favorire l'applicazione uniforme dei regolamenti comunitari d'igiene sul territorio della regione Sardegna. Il pacchetto igiene attribuisce il concetto di responsabilità della sicurezza dei propri prodotti ai titolari delle imprese. Il controllo ufficiale deve pertanto focalizzare l'attenzione non più sul controllo dei prodotti, ma sulla verifica del processo di produzione e delle procedure in uso presso le aziende del settore (autocontrollo). Responsabilità degli OSA è stabilire l'accettabilità di un prodotto e di un processo in base alla conformità con i criteri microbiologici del Reg. (CE) 2073/2005. I produttori primari hanno l'obbligo di una corretta tenuta delle registrazioni per i prodotti, di adottare corrette misure igienico - sanitarie, di utilizzare acqua potabile e/o pulita, di impiegare personale in buona salute, di evitare contaminazioni, di prevenire la propagazione delle malattie, di effettuare analisi di laboratorio e di adottare le opportune



misure correttive quando sono informati di eventuali problemi individuati nel corso dei controlli ufficiali. Da parte dei produttori primari è inoltre auspicabile l'utilizzo di corretta prassi igienica "sistema HACCP" e un controllo dei microrganismi, delle tossine, dei metalli pesanti, degli elementi radioattivi, dei derivanti da rifiuti biologici e non biologici (inclusi i fertilizzanti, i fitosanitari, l'eliminazione di animali morti) e di componenti biologici che possono provocare malattie contagiose trasmissibili all'uomo. Devono inoltre garantire che l'alimento venga prodotto, manipolato, immagazzinato e trasportato in adeguate condizioni igieniche. Secondo il Reg. (CE) 853/04 i requisiti specifici per la produzione primaria sono: la raccolta solo in zone classificate, tener conto delle informazioni ottenute dal piano di autocontrollo, stabilire e dare indicazioni sul trattamento appropriato cui sottoporre i lotti raccolti e l'utilizzo di punti di sbarco autorizzati (Mappatura anagr. A.C.). Requisiti per la raccolta ed il successivo trattamento sono : proteggere i MBV da compressioni, abrasioni e vibrazioni, esporre i MBV a temperature compatibili con vitalità e sicurezza alimentare, non immergere nuovamente i MBV in acqua che potrebbe contaminarli ulteriormente, eventuale finitura in Zone di classe A e mezzi di trasporto idonei. La modalità di campionamento presso un C.D.M. al fine di valutare l'efficienza del processo depurativo viene prelevato 1 campione dello stesso lotto prima e dopo la depurazione, si valutano i parametri microbiologici (*E.coli* e *Salmonella*), le aliquote sono 2, il verbale dev'essere in triplice copia ( 1 titolare dello Stabilimento, 1 ASL, 1 IZS) e non c'è diritto alla difesa ad eccezione di un campionamento seguente una non conformità. Nel caso di un campionamento presso un CSM, un mercato ittico, un deposito, un ingrosso, un cash and carry, un esercizio di vendita al dettaglio o un centro di ristorazione si controlla la sicurezza alimentare e quindi la conformità ai parametri indicati dal Reg. (CE)

853/2004, si valutano i parametri microbiologici (*E.coli* e *Salmonella*), biotossicologici e i caratteri chimico-fisici, le aliquote sono 2, il verbale dev'essere in triplice copia ( 1 titolare dello Stabilimento, 1 ASL, 1 IZS) e c'è diritto alla difesa. In caso di non conformità ai parametri microbiologici è necessaria una corretta gestione delle non conformità che consiste in un'immediata informazione dal laboratorio di analisi, proposta Ordinanza Sindacale temporanea (divieto d'immissione al consumo, obbligo di depurazione e/o stabulazione oppure trasformazione in stabilimenti riconosciuti), notifica a tutte le Ditte, alla Regione e ai Comuni interessati, notifica agli altri Servizi Dipartimento Prevenzione, piani di campionamento a tutte le specie della stessa zona ed eventualmente dalle aree confinanti e per finire l'eventuale attivazione del Sistema di Allerta. La revoca delle misure restrittive potrà avvenire solo dopo aver accertato il ripristino dei requisiti sanitari. Il Servizio Veterinario procederà alla determinazione delle cause che hanno determinato la non conformità.

### Comunicazione di analisi non ripetibili

Il verbale di prelievo deve accompagnare il campione e dev'essere controfirmato dal Responsabile dello stabilimento/impresa registrata o da un suo delegato, oltre che dall'operatore del Servizio Veterinario che ha eseguito il campionamento. I molluschi bivalvi in base al Decreto legislativo n.123 del 03/03/1993 (art.4 comma I) sono alimenti altamente deperibili. I MBV costituiscono quindi un campione unico garantito e l'analisi non è ripetibile. Il Responsabile dello stabilimento dovrà essere quindi informato sul luogo, giorno e ora dell'apertura del campione per garantire i diritti alla difesa (art. 54, Reg. (CE) 882/2004). Si procederà quindi all'analisi di un campione in aliquota unica con le relative unità campionarie previste dal Reg. (CE) 2073/2005. La

ricerca di *Salmonella* verrà effettuata su ciascuna delle 5 u.c. che costituiscono l'aliquota, mentre la presa di saggio (minimo 10 molluschi) per la numerazione di *E.coli* sarà costituita da un pool delle 5 u.c. Ciascuna u.c. dovrà contenere una quantità di matrice alimentare adeguata rispetto al numero di determinazioni richieste al laboratorio. Il campionamento UVAC dev'essere costituito da 2 aliquote quando non è conseguente ad una precedente non conformità (monitoraggio) (nota Min.Salute 600.9/CE/7467 del 19/11/1998) oppure da 4 aliquote quando è successivo ad una precedente non "conformità" da ripetere per tre partite successive. Una nota del 15/05/2008 del Ministero della Salute dispone che, al fine di garantire il diritto alla revisione d'analisi del soggetto speditore della merce oggetto di scambi intracomunitari ( art.11, par.5 e 6 del Reg. (CE) 882/2004), il campione sia suddiviso in quattro aliquote: 1 per il detentore nazionale della merce, 1 per l'analisi di prima istanza, 1 per l'eventuale revisione d'analisi e 1 per il contenzioso internazionale.

### **Rischi sanitari associati al consumo dei MBV**

I frutti di mare fanno parte della cultura culinaria in molti paesi del mondo, la molluschicoltura ha una grande importanza economica in tutto il Mediterraneo con la maggiore produzione nelle coste dell'Italia, della Spagna e della Francia (6). In Italia, le stime attuali indicano che vengono processate ogni anno, 203.810 e 131.000 tonnellate, rispettivamente di pesci e molluschi (Ismea 2012). Il frutto di mare che viene più coltivato per il consumo umano è il *Mytilus galloprovincialis*, seguito da *Ruditapes philippinarum*. Nel 2011 sono state prodotte 98.000 tonnellate di cozze e l'80% della produzione proviene dalle regioni meridionali (Ismea 2011).

I molluschi sono animali “scavatori sessili” che si nutrono di piccole particelle alimentari presenti nell’acqua o sul sedimento mediante un meccanismo di filtrazione. I molluschi sono in grado di filtrare quantità variabili di acqua. Un esemplare di *Mytilus* filtra a 14°C fino a 1,5 litri di acqua l’ora, l’ostrica europea ne filtra 12 litri a 15°C mentre quella americana supera i 18 litri a 20°C, per un totale di acqua filtrata che varia da 36 a 432 litri al giorno. I molluschi bivalvi per la loro natura di “filtratori” sono in grado di accumulare nei propri tessuti contaminanti chimici e microbiologici presenti nell’acqua dove vivono (7). I MBV possono accumulare oltre a batteri patogeni (*Salmonella*, *E.coli*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp.) , virus ( virus Epatite A e Norovirus) e alghe tossiche produttrici di biotossine quali saxitossina, acido domoico e i suoi isomeri, acido okadaico e dinofisiotossine, yessotossine, azaspiracidi, palitossine, ecc.,e sostanze di natura inorganica (pesticidi, metalli pesanti e idrocarburi) (8) (9).

### **Protozoi zoonosici nei molluschi bivalvi**

I protozoi parassiti d’interesse zoonosico possono essere riversati, attraverso reflui zootecnici e urbani o acque di dilavamento, nelle acque superficiali e raggiungere tramite i fiumi le zone costiere marine o lagunari dove verranno filtrati e concentrati dai molluschi bivalvi. I protozoi vengono captati dalle branchie e si accumulano nelle ghiandole digestive dei molluschi. Tali patogeni rappresentano un rischio per la salute umana (EFSA 2012) nel caso in cui non vengono inattivati con i processi di preparazione (10)(11) e cottura (12) dei molluschi e in maniera particolare se i prodotti vengono consumati crudi o poco cotti. La naturale contaminazione dei molluschi da parte dei protozoi è strettamente associata alla capacità delle cisti/oocisti di

sopravvivere alla salinità delle acque degli estuari e delle coste marine; tuttavia elevati livelli di salinità compresi tra i 20 e 30 ppt determinano una inattivazione delle (oo)cisti. Le oocisti di *Cryptosporidium* possono sopravvivere in acqua salata a temperatura compresa tra 6° e 8°C per un anno (13).

Le oocisti di *Toxoplasma* possono sporulare in acqua di mare ad una salinità di 15 e 32 ppt a 24°C (14). In condizioni sperimentali è stato osservato che le oocisti sporulate di *Toxoplasma* permangono infettanti in acqua dolce per 15 mesi alla temperatura di 20-25°C e per 54 mesi a 4°C (15); alle medesime condizioni in acqua salata per 6 mesi, con una salinità pari a 15 ppt (14).

Nel corso dell'ultimo decennio *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. sono stati isolati da molluschi provenienti da diverse zone del mondo. Nel Nord-America circa l'80% delle ostriche e dei mitili provenienti dal Chesapeake Bay (Stati Uniti) risultavano contaminate da *Cryptosporidium* (16)(17)(18). Fayer e autori hanno esaminato circa 1000 esemplari di molluschi prelevati da 37 siti costieri della Florida (Stati Uniti) ed hanno riscontrato oocisti di *Cryptosporidium* nel 3,7% dei molluschi analizzati (19). In Quebec, Canada, *Giardia* e *Cryptosporidium* sono stati riscontrati nel 18% e 73% rispettivamente, di *Mytilus edulis* analizzati tra il 2004 e il 2007 (9). In Brasile nel periodo 2005 - 2006 sono stati analizzati campioni di ostriche (*Crassostrea rhizophorae*) e di vongole (*Tivela mastroides*) provenienti da una zona costiera di São Paulo. Le oocisti di *Cryptosporidium* sono state evidenziate mediante immunofluorescenza nel 50% e nel 10% dei pool di branchie, rispettivamente di vongole e di ostriche (20). In Europa sono stati condotti numerosi studi che hanno portato all'isolamento di protozoi da diverse specie di vongole (*Corbicula fluminea*, *Dosinia exoleta*, *Ruditapes philippinarum*, *Venerupis pullastra*, *Venerupis rhomboideus*

*Venus verrucosa*), da mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e da ostriche (*Ostrea edulis*). La maggior prevalenza (29-56%) di *Cryptosporidium* nei molluschi bivalvi è stata riscontrata in Spagna (12)(21)(22)(23), in Portogallo (33.3%) (24) e nel Regno Unito (11%) (22). I protozoi dei generi *Cryptosporidium* e *Giardia* sono stati isolati inoltre nel 13% delle ostriche provenienti dai Paesi Bassi (25) e nel 40-50% di quelli provenienti dalla Norvegia (26).

La probabilità che un mollusco accumuli al suo interno protozoi dipende da diversi fattori, quali natura, quantità e livello di contaminazione delle acque reflue che scaricano in mare, capacità di sopravvivenza e diffusione del parassita nell'acqua marina e attività filtrante del mollusco (27) (28). Quest'ultimo processo viene influenzato sia da fattori intrinseci (specie del mollusco) che da fattori estrinseci di origine ambientale quali: salinità, temperatura dell'acqua e quantità di ossigeno disciolta nell'acqua (29). L'attività filtrante, maggiore nelle aree costiere marine dove vi è un frequente ricambio d'acqua e una continua variazione di salinità (27), dipende dalla quantità e dalla qualità delle particelle alimentari (30). Numerosi studi indicano che l'emolinfa, le branchie e la ghiandola digestiva, dove il parassita viene concentrato, rappresentano i tessuti più idonei per valutare il livello di contaminazione dei molluschi. La presenza del parassita nel liquido intervalvare ma non nel corpo del mollusco è considerata aspecifica (31). Le branchie trattengono particelle, incluse cisti e oocisti, attraverso la filtrazione, questi elementi non sembrano aderire fermamente e possono passare rapidamente nella ghiandola digestiva (31). Il parassita viene concentrato nell'epatopancreas prima di essere eliminato (32). Gli omogenati di branchie e di ghiandole digestive rappresentano i tessuti più idonei per il rilevamento dei parassiti nei molluschi (12)(20)(21)(23)(24)(26).

## **Il genere *Cryptosporidium***

Il genere *Cryptosporidium* appartiene al Phylum *Apicomplexa*, Classe *Conoidasida*, Sottoclasse *Coccidiasina*, Ordine *Eucoccidiorida*, Famiglia *Cryptosporidiidae*. All'interno del genere *Cryptosporidium* vengono attualmente riconosciute 26 specie e numerosi genotipi distinti sulla base di specifiche caratteristiche morfologiche, biologiche e genetiche (33).

Il maggior numero degli episodi d'infezione nell'uomo, a livello mondiale, è causato dalle specie, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* (34). Tuttavia si riconoscono, allo stato attuale, altre specie d'importanza zoonosica, quali *C.felis* (35), *C.meleagridis* (35), *C.canis* (35), *C.suis* (35), *C.muris* (36) e più raramente *C. baileyi* (37). La trasmissione dell'infezione umana avviene per inalazione/ingestione delle oocisti provenienti dall'ospite infetto; tuttavia la rilevanza clinica ed epidemiologica delle diverse specie e sottotipi di *Cryptosporidium* nell'uomo non è tutt'ora chiara. Nei casi umani d'infezione da *Cryptosporidium hominis*, rispetto a quelli sostenuti dalla specie *Cryptosporidium parvum*, si riscontrano più spesso sintomi non gastroenterici, quali vertigini, stanchezza, dolori articolari e agli occhi.

### **➤ Ciclo biologico**

*Cryptosporidium* è un parassita endocellulare non obbligato e per la sua localizzazione intracellulare, ma extracitoplasmatica, è in grado di evadere il sistema immunitario dell'ospite (38). Il ciclo biologico (fig.5) caratterizzato da fasi di sviluppo asessuate e sessuate, inizia con l'ingestione/inalazione delle oocisti sporulate (4,8-5,6 x 4,2-4,8 µm) (fase esogena) da parte di un ospite idoneo (39). Le oocisti, raggiunto il sito bersaglio, si disincistano liberando gli sporozoiti. Questi invadono rapidamente le cellule epiteliali

del piccolo intestino e/o del tratto respiratorio e danno inizio alla fase endogena dell'infezione. Gli sporozoiti si trasformano in trofozoiti che in seguito a riproduzione asessuata (merogonia) danno origine a meronti di tipo I e II, contenenti i merozoiti; questi, in parte, andranno ad infettare altre cellule determinando reinfezioni per un tempo indefinito, ed in parte evolveranno in meronti di tipo II che produrranno merozoiti, in grado di dare inizio alla fase di riproduzione sessuata (gametogonia), cioè alla formazione dei micro e macrogameti e quindi allo zigote. Attorno allo zigote si forma una parete cistica (oocisti immatura) al cui interno, per sporogonia, si sviluppano gli sporozoiti (oocisti matura). Si possono distinguere due forme differenti di oocisti: “a parete sottile” (circa il 20%) coinvolte nei fenomeni di autoinfezione e “a parete spessa”(circa l'80%) ad elevata resistenza ambientale; quest'ultime vengono eliminate nell'ambiente esterno con le feci e sono responsabili della trasmissione dell'infezione.

### ➤ **Vie di trasmissione**

*Cryptosporidium* è attualmente considerato un'importante agente patogeno alimentare, in quanto causa nell'uomo una malattia di rilevanza socio – economica in tutto il Mondo (40). L'elevato livello di contaminazione ambientale è principalmente dovuto a: bassa dose media infettante (10-30 oocisti), elevata quantità di oocisti eliminate con le feci da un ospite infetto ( $10^8 - 10^9$ ) anche 50 giorni dopo la scomparsa dei sintomi (41)(42); notevole resistenza delle oocisti alle più svariate condizioni ambientali (43) e scarsa efficacia dei comuni disinfettanti ambientali (44)(45).



### ***a) Acqua***

Le oocisti di *Cryptosporidium* sono ampiamente diffuse nell'acqua. In un lavoro condotto da LeChevallier e altri autori le oocisti sono state isolate nell'87% delle acque grezze analizzate (46) e nel 27% delle acque potabili (47). *Cryptosporidium* spp. ha causato negli Stati Uniti importanti episodi di infezione umana associati al consumo di acqua potabile. Le acque responsabili di tali focolai provenivano da sistemi idrici trattati esclusivamente con cloro e da sistemi idrici superficiali sottoposti a filtrazione (48)(49)(50). Oocisti di *Cryptosporidium* sono state riscontrate recentemente anche in Spagna in campioni di acqua potabile e non trattata (51).

*Cryptosporidium* è responsabile di circa il 50% dei numerosi focolai infettivi documentati in tutto il Mondo, conseguenti ad ingestione di acqua contaminata da protozoi zoonisici (52). Nel nostro Paese le acque potabili, le acque grezze e depurate non vengono costantemente monitorate per la presenza di protozoi dei generi *Cryptosporidium* e *Giardia*. Alcuni autori, tuttavia, hanno effettuato studi che hanno evidenziato la presenza di *Cryptosporidium* in acque reflue e di fiume (53)(54)(55). Le oocisti di *Cryptosporidium* sono state isolate anche in campioni provenienti da acqua di pozzo utilizzata per l'irrigazione (54)(55)(56), con una maggiore prevalenza in campioni prelevati da pozzi con profondità inferiore a 30 metri dove era presente una contaminazione da batteri di origine fecale (55). Un importante studio condotto da autori italiani nel periodo compreso da febbraio 2006 e gennaio 2007 ha evidenziato la presenza di oocisti di *Cryptosporidium* in campioni di acque reflue trattate, nella laguna di Verano, nel Sud d'Italia (57).

Le oocisti di *Cryptosporidium* sono state occasionalmente isolate da campioni d'acqua ricreazionale (52)(54)(58)(59)(60). La disinfezione con il cloro ha un minimo effetto

sulla densità delle oocisti (54)(61). Nuotare in acque contaminate o in piscine non correttamente sanificate rappresenta quindi un rischio per la trasmissione dell'infezione umana da *Cryptosporidium*. In Francia si è manifestata un'epidemia di diarrea associata al consumo di acqua e il 91% dei campioni esaminati è risultato positivo per *C. hominis* type Ib (62), in accordo con l'idea corrente che Ib è l'allele predominante nelle criptosporidiosi associate all'acqua in tutto il mondo (63).

### ***b) alimenti di origine vegetale***

Il 21.1% delle epidemie da *Cryptosporidium* verificatesi a livello globale, è associato al consumo di alimenti, in particolare quelli freschi come vegetali e frutta (64). Le acque d'irrigazione contaminate sono considerate tra le principali fonti di contaminazione di prodotti ortofrutticoli freschi da protozoi del genere *Cryptosporidium* e *Giardia*. Una notevole quantità di acque utilizzate per l'irrigazione di colture di vegetali tradizionalmente consumati crudi negli Stati Uniti e in alcuni Paesi del Nord Europa è risultata positiva per la presenza di oocisti del genere *Cryptosporidium parvum*. I prodotti vegetali, possono essere contaminati, inoltre, nella fase di lavaggio post raccolta; infatti, oocisti di *Cryptosporidium* sono state isolate in serbatoi di acque di lavaggio, la cui disinfezione è resa molto difficile in quanto le oocisti protozoarie possono essere protette all'interno di biofilm batterici che colonizzano sia i serbatoi di raccolta che i sistemi di distribuzione. Tali oocisti possono essere rilasciate dal biofilm, causando ripetuti episodi di contaminazione secondaria dell'acqua. Ad aggravare ulteriormente tale situazione si aggiunge la notevole resistenza delle formazioni oocistiche ai trattamenti a base di cloro normalmente utilizzati per disinfettare l'acqua potabile industriale (65).

Sono stati associati dei focolai d'infezione da *C.parvum* al consumo di succhi di frutta a partire dal 1990, quando è stato descritto il primo caso associato al consumo di sidro di mela (66). Nel periodo compreso tra settembre e novembre 2003, nel nord dell'Ohio, ci sono stati 12 casi di criptosporidiosi associati al consumo di sidro di mela ozonizzato (67). L'incidenza delle infezioni associate ai succhi di frutta con basso pH contaminati è in notevole aumento (68).

### ***c) Molluschi bivalvi***

I molluschi bivalvi filtrano elevati volumi d'acqua e possono concentrare organismi patogeni per l'uomo e per gli animali. Le oocisti di *Cryptosporidium parvum* sono state isolate per la prima volta in Italia in campioni di *Chamelea gallina* a breve distanza dalle foci dei fiumi Tronto, Vomano, Tordino e Vibrata (69). L'acqua di questi fiumi, analizzata dall'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise (70) presenta, inoltre, un'elevata concentrazione di batteri fecali. La presenza di protozoi nei molluschi della costa abruzzese è attribuibile sia all'inquinamento dei fiumi con reflui urbani ed agricoli, dovuti spesso all'inefficienza degli impianti di depurazione, sia alla documentata presenza lungo le aree costiere di scarichi abusivi (71). Contemporaneamente è stata evidenziata la presenza di oocisti di *Cryptosporidium* (*C. hominis* e *C.parvum*) in *Ruditapes philippinarum* in due aziende agricole situate in Veneto e Friuli Venezia Giulia (72). Un altro studio effettuato nel 2009 ha rilevato la presenza di *Cryptosporidium* e *Giardia* in campioni di acque provenienti dalla laguna di Varano in Puglia; mentre i campioni di molluschi bivalvi (*Ruditapes decussatus* e *Mytilus galloprovincialis*) provenienti dal medesimo sito risultavano tutti negativi per entrambi i generi protozoari (57).

Altri studi dimostrano la contaminazione di *Mytilus galloprovincialis* da *Cryptosporidium* raccolte dalla laguna Sacca di Scardovari (nel mare nord Adriatico) e nella zona di Messina (39).

In Sardegna, i primi dati sulla presenza di *Cryptosporidium* e di *Giardia* nei molluschi derivano dallo studio condotto dal Laboratorio di Ispezione Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico di Sassari. Da aprile 2011 a febbraio 2012, sono stati analizzati un totale di 1335 esemplari di molluschi. In particolare l'analisi è stata effettuata su 1095 esemplari di *Mytilus galloprovincialis* prelevati dal Golfo di Olbia e dal Golfo di Oristano (rispettivamente nella costa nord e ovest della Sardegna) e 240 esemplari di *Crassostrea gigas* raccolte nello stagno di San Teodoro. Tutti i campioni, sia di branchie che di epatopancreas, sono risultati negativi all'osservazione al microscopio, al test di immunofluorescenza e alle metodiche molecolari (73)(74).

In Europa, *Cryptosporidium* spp., è stato isolato in esemplari di *Ruditapes decussatus* in Portogallo (75), in specie di ostriche, mitili e vongole nella Spagna nord-occidentale (76), in esemplari di *Mytilus edulis* in Irlanda (77) e di *Mytilus galloprovincialis* nella Spagna nord-occidentale (21)(78). In California oocisti di *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. felis*, *C. andersoni* e due nuovi genotipi) sono state individuate in campioni di emolinfa prelevata da mitili (79). In quest'ultimo lavoro, in particolare, è stata individuata una correlazione tra contaminazione dei mitili, esposizione al deflusso dell'acqua e ultimo evento di precipitazione.

In Francia (80), esemplari di *Mytilus edulis* sono stati raccolti per un anno da tre zone nel litorale nordoccidentale della Normandia. Dai mitili sono stati prelevati polpa, branchie e liquido intervalvare. Mediante separazione immunomagnetica e test d'immunofluorescenza oocisti di *Cryptosporidium* sono state rilevate in tutti i campioni

esaminati e nella totalità delle matrici. I tassi di contaminazione più elevati sono stati riscontrati nei periodi d'intense precipitazioni. L'analisi molecolare ha rilevato che le oocisti appartenevano alla specie *Cryptosporidium parvum*.

### ➤ **Criptosporidiosi umana**

*Cryptosporidium* e *Giardia* sono responsabili della maggior parte delle malattie diarroiche umane in tutto il mondo. Sono state per questo incluse nella *World Health Organisation's Neglected Diseases Initiative* (81)(82). Le *Neglected Diseases*, sono un gruppo di malattie infettive poco conosciute, disabilitanti e spesso mortali. In America, ci sono più di 100 milioni di persone infettate con NID e molte sono quelle a rischio. Queste infezioni batteriche e parassitarie sono molto diffuse tra le persone che vivono in comunità rurali povere e nelle baraccopoli urbane. Le NID compromettono lo sviluppo fisico e cognitivo, possono causare aborti, limitano la produttività lavorativa e determinano esclusione sociale.

### **Clinica**

*Cryptosporidium* è responsabile del 20% di tutti i casi di diarrea. Le infezioni da *Cryptosporidium parvum*, sono infatti caratterizzate dalla comparsa di una diarrea acuta autolimitante che insorge circa 7-21 giorni post-infezione e che dura circa 2-7 giorni, spesso accompagnata da crampi addominali, anoressia, dimagrimento, nausea, vomito e lieve febbre. La diarrea è il risultato dell'invasione e distruzione delle cellule dell'epitelio intestinale da parte del protozoo, che determina un'atrofia dei villi e accorciamento e distruzione dei microvilli. Nei bambini della prima infanzia può causare ritardo mentale e della crescita (83). I problemi maggiori si riscontrano nei

soggetti immunocompromessi in cui la parassitosi si manifesta con gravi forme croniche debilitanti con emissione di circa 20 litri di feci al giorno, quindi grave disidratazione e forte dimagrimento che possono portare alla morte dell'ospite (84).

Da uno studio fatto in Bangladesh su 3646 pazienti che presentavano diarrea è emerso che erano causate da *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. *Cryptosporidium* spp. e *E. histolytica* prevalgono maggiormente nei pazienti con diarrea acuta, di tutte le età, e in particolare tra i bambini di età compresa tra 0 e 12 mesi. Inoltre, i pazienti con diarrea da criptosporidiosi non presentano generalmente dolore addominale, i soggetti affetti da amebiasi presentano sangue nelle feci e quelli con giardiasi tendono ad essere più disidratati, confrontati con casi-controllo (85). Di recente, i sintomi clinici come dolore addominale e/o diarrea sono stati usati come indicatori d'infezione da *Cryptosporidium* e *Giardia* anche in Belgio (86).

### **Epidemiologia**

*Cryptosporidium hominis* e *C.parvum* sono i principali agenti eziologici della criptosporidiosi umana; tale patologia si manifesta, con valori di prevalenza variabili, sia negli individui immunocompetenti che immunocompromessi (87).

L'analisi macroepidemiologica mostra che *C.hominis* è una specie maggiormente prevalente in Nord America, Sud America, Australia e Africa mentre *C.parvum* è la principale causa di infezioni umane in Europa, in particolare nel Regno Unito (87).

*Cryptosporidium meleagridis* può essere considerato un patogeno emergente, in quanto responsabile di un numero ridotto di casi di malattia nell'uomo; responsabile dell'1% di tutte le infezioni in Inghilterra (87) e del 10% in Perù (88).

I casi umani di criptosporidiosi sostenuta dalla specie *C. parvum* riguardano soprattutto i soggetti giovani, mentre *C. hominis* prevale nei bambini, di età inferiore a un anno soprattutto nei paesi in via di sviluppo, quali Perù (36)(88), Malawi (89), Kenya (90), India (91), Haiti (92) e Brasile (93) e nelle donne di età compresa tra i 15 e i 44 anni.

*C. parvum* mostra un picco di prevalenza in primavera mentre *C. hominis* viene riscontrato soprattutto in tarda estate ed inizio autunno e nelle persone che hanno fatto recentemente un viaggio all'estero (94).

Numerosi casi di criptosporidiosi causata da *C. meleagridis* sono stati riscontrati ad Haiti (92) e in adulti HIV positivi in Perù (95). Questa specie è stata riscontrata sia in pazienti immunocompetenti che immunodepressi anche in altre parti del mondo come Portogallo (96), India (91), Taiwan (97) e Iran (98). Anche in Cina, grazie ad uno studio condotto nel 2009, sono stati individuati degli isolati ambientali di *Cryptosporidium* (99). Le specie predominanti sono state *C. hominis* seguita da *C. meleagridis*. Le altre specie isolate sono state: *C. baileyi*, *C. parvum*, *C. suis*, *C. muris*, genotipo ratto, genotipo aviario 3 e un nuovo genotipo.

In Italia la criptosporidiosi umana non è una malattia soggetta a notifica. I dati sulla prevalenza derivano dagli studi effettuati e dimostrano che i criptosporidi sono protozoi comuni nell'ambito della popolazione del nostro paese. La prevalenza della criptosporidiosi nei pazienti immunocompetenti, indipendentemente dall'età, è più bassa della giardiasi, varia dall'1,27% (100) all'1,75 (101). Una prevalenza del 5,4% è stata registrata in persone immunocompetenti affette da diarrea in Toscana, anche se tali dati andrebbero confermati a causa di discrepanza tra i risultati della microscopia tradizionale e della biologia molecolare (102). Un'alta prevalenza di *Cryptosporidium* è stata osservata anche nei pazienti HIV positivi, prima dell'introduzione dell'HAART

(Highly Active Antiretroviral Therapy), una terapia basata sulla somministrazione di tre inibitori virali; in questi pazienti, nelle diverse regioni italiane, è stata riscontrata una prevalenza che varia dall'8,33% all'11% (103). La criptosporidiosi manifesta una certa stagionalità, correlata ai picchi di piovosità e quindi all'aumento dell'inquinamento delle acque con i reflui agricoli e animali. La presenza di alti tassi d'infezione da *Cryptosporidium* deriva indirettamente dalle indagini sierologiche. In Italia Centrale, il 5.3% delle persone sane presenta anticorpi contro l'antigene solubile dell'oociste (104). Nel Nord Italia, le IgG sono state riscontrate nel 62-83% dei donatori di sangue, a seconda dell'antigene utilizzato (105).

### ➤ **Criptosporidiosi negli animali**

La giardiasi e la criptosporidiosi in Italia non hanno ricevuto la stessa attenzione delle altre parassitosi. Solo ultimamente si stanno ricercando questi parassiti anche negli animali da compagnia. Uno studio epidemiologico condotto con metodi molecolari ha rilevato la presenza di *Cryptosporidium* spp. nel 3,3% dei cani, sia in quelli di proprietà che ospitati nei canili, invece, i cani randagi e quelli affetti da sintomi gastrointestinali erano maggiormente colpiti dalla malattia (106).

I segni clinici di una parassitosi si riscontrano generalmente in animali giovani o che vivono in campagna dove il sovraffollamento e la scarsità di cibo possono generare stress e amplificare i sintomi dell'infezione (107). Negli animali domestici i sintomi sono notevolmente variabili, da asintomatici a diarrea severa (108)(109). In uno studio condotto in Abruzzo sono stati testati per la presenza di *Cryptosporidium*, mediante immunofluorescenza e tecniche molecolari, 181 campioni di feci feline. Tutti i campioni sono risultati negativi per il patogeno ricercato (110).



Sono stati condotti anche alcuni studi sulla presenza di *Cryptosporidium* nei bovini (111) e nel latte bovino come possibile causa di diarrea neonatale (112). Questo parassita è stato rilevato nel 53% degli allevamenti presi in considerazione (113). In uno studio condotto in Canada nel 2005 sono stati analizzati 143 campioni di feci di bovini adulti, vitelli e giovenche. *Cryptosporidium* spp. ha mostrato un'alta prevalenza fra i bovini (27,3%) ma è stato isolato solo nei vitelli e nelle giovenche (114).

In uno studio condotto sui cavalli *Cryptosporidium* è stato riscontrato nell'8% degli animali testati (115).

Nei maiali è stato isolato nel 1984 (116) e recentemente con un livello di prevalenza del 19,8% degli animali testati (117). Solo uno studio condotto in Italia centrale ha testato la presenza di questo protozoo nel pollame, con una prevalenza del 26% nei galli e nei polli da carne affetti da sintomi gastro-intestinali (118).

Negli animali da reddito i sintomi sono caratterizzati da diarrea abbondante acquosa giallastra, febbre, inappetenza, dimagrimento e forte disidratazione. Nelle altre specie animali come il gatto, il cane, il cavallo e il suino i sintomi clinici sono generalmente assenti.

### ➤ **Profilassi, terapia e disinfezione**

I disinfettanti più idonei ad essere utilizzati in condizioni di campo sono quelli a base di ammoniaca, sia in soluzione acquosa sia in forma gassosa. Il cloro non è in grado di dare risultati efficaci nei confronti di *Cryptosporidium* anche ad alte concentrazioni; infatti questa molecola, impiegata frequentemente nel trattamento degli attrezzi e delle piscine, ha un impatto minimo o addirittura nullo sulla vitalità delle oocisti. Calce e solfato ferrico sono in grado di ridurre la vitalità delle oocisti soltanto ad elevate

concentrazioni, in condizioni di pH basico, e se utilizzati per tempi prolungati. Disinfezioni condotte con un'associazione di agenti chimici, come cloro e monocloramine oppure ozono e monocloramine, hanno dimostrato una maggiore efficacia all'uso di un singolo disinfettante (119). Molti studi sono stati condotti sulle strategie da adottare per la disinfezione e filtrazione dell'acqua potabile. L'ozono (0.3 mg/l per 2 minuti) e la luce ultravioletta ( 500 mJ/cm<sup>2</sup>) si sono mostrati efficaci nel ridurre l'infettività delle oocisti di *Cryptosporidium* e sono applicabili per la disinfezione delle acque.

L'essiccamento e il congelamento sono trattamenti efficaci per la devitalizzazione delle oocisti. Ad una temperatura di -20°C sono necessarie 2 ore per devitalizzarne il 97% e 4 ore per il 100%. Ad una temperatura di -70°C per devitalizzare il 100% delle oocisti è sufficiente un ora.

Per quanto concerne la terapia, va ricordato che anche dopo molti anni di ricerche, non sono ancora state individuate molecole efficaci e non pericolose da utilizzare per il trattamento della criptosporidiosi, sia negli animali che nell'uomo. L'unica valida opzione al presentarsi dei sintomi rimane una terapia di sostegno, che prevede il reintegro dei fluidi e degli elettroliti persi, supporto nutrizionale, farmaci antidiarroici, chemioterapia e immunoterapia antimicrobica (39).

### ➤ **Caratterizzazione genotipica**

Negli ultimi decenni sono state messe a punto numerose tecniche di biologia molecolare per isolare *Cryptosporidium* spp. su differenti matrici e per differenziare le varie specie/genotipi e i diversi sottotipi di *C. parvum* e *C. hominis*. Per la genotipizzazione di *Cryptosporidium* isolato da campioni umani, animali e di acqua, viene generalmente

ricercata la subunità piccola (18S) dell'RNA ribosomiale (SSU rRNA). In particolare, la genotipizzazione viene condotta mediante una amplificazione di un frammento di SSU rRNA di 860 pb e successiva digestione dell'amplicone con gli enzimi di restrizione SspI e VspI (120). La ricerca del gene che codifica per SSU rRNA al fine di effettuare la genotipizzazione di *Cryptosporidium* è ampiamente diffusa per via della natura polimorfica e per la presenza di regioni semi-conservate e iper-variabili del gene che facilitano il disegno di primers specifici di genere. Nell'ambito della diagnostica parassitologica vengono utilizzati, ai fini della genotipizzazione di *Cryptosporidium*, anche altri target genetici, quali il gene che codifica per la proteina della parete dell'oocisti COWP (spesso in associazione con SSU rRNA); tuttavia tali target, negli ultimi anni, sono stati sempre più abbandonati, in quanto consentono di amplificare frammenti di DNA appartenenti a *Cryptosporidium parvum* o a specie/genotipi strettamente legati a questa specie. Tali studi hanno quindi evidenziato un minor numero di specie/genotipi appartenenti al genere *Cryptosporidium* (50)(121)(122)(123)(124), ed in diverse occasioni l'analisi del gene COWP ha permesso di individuare *Cryptosporidium* in specie inaspettate (106)(125)(126). Metodiche molecolari per la sottotipizzazione sono state ampiamente utilizzate in numerosi studi relativi allo studio di *C. hominis* nell'uomo e di *C. parvum* nell'uomo e nei ruminanti. Tra queste la più utilizzata si basa sull'analisi della sequenza del DNA che codifica per una glicoproteina di 60 KDa (gp60 oppure gp40/15). Il gene gp60 è una sequenza microsatellite con sequenze, ripetute in tandem, di trinucleotidi TCA, TCG, TCT codificanti la serina, all'estremità terminale (gp40) del gene. In aggiunta alla variazione nel numero di trinucleotidi ripetuti, ci sono ampie differenze in regioni non ripetute, che permettono di suddividere *C. hominis* e *C. parvum* in famiglie di sottotipi. All'interno di

ogni famiglia i sottotipi differiscono uno dall'altro, per lo più, nel numero di ripetizioni di trinucleotidi (microsatellite TCA, TCG o TCT).

Il nome dei sottotipi gp60 inizia con la designazione della famiglia di sottotipi (Ia, Ib, Id, Ie, If, ect. per *C. hominis* e Iia, Iib, Iic, Iid, ect. per *C. parvum*) seguito dal numero di sequenze ripetute TCA (rappresentata dalla lettera A), TCG (rappresentata dalla lettera G), o TCT (rappresentata dalla lettera T) (127). Così il nome IbA10G2 indica che il parassita appartiene a *C. hominis*, famiglia sottotipo Ib e che ha 10 copie della sequenza di ripetizione TCA e due copie della sequenza di ripetizione TCG, nella regione dei trinucleotidi ripetuti del gene gp60. Nella famiglia sottotipo Iia di *C. parvum*, alcuni sottotipi hanno anche due copie della sequenza ACATCA subito dopo i trinucleotidi ripetuti e vengono rappresentati da "R2" (R1 per la maggior parte dei sottotipi). Inoltre all'interno della famiglia sottotipo Ia di *C. hominis* alcuni sottotipi sono ulteriormente identificati dal numero di copie di una sequenza ripetuta di 15 pb (rappresentata dalla lettera R) 5'-AA/GGACGGTGGTAAGG-3' (l'ultima copia è di 13 pb: AAA/GACGGTGAAGG) che si trova poco più a valle dei trinucleotidi ripetuti. Quindi il nome IaA28R4 indica che il parassita appartiene alla famiglia sottotipo Ia di *C. hominis*, che presenta 28 copie della sequenza TCA ripetuta nella regione dei trinucleotidi e 4 copie della ripetizione 13-15 pb. Nella famiglia sottotipo Iic di *C. parvum*, tutti i sottotipi hanno 5 copie di TCA e 3 copie di TCG ripetute: IicA5G3. Questi differiscono tra loro nella sequenza nucleotidica della regione 3' del gene. La sequenza originale per *C. parvum* famiglia sottotipo Iic (GenBank Accession No. AF164491) è stata indicata come IicA5G3a. I sottotipi che discostano da questa sequenza sono stati designati con le successive lettere alfabetiche. Ad esempio, il sottotipo IicA5G3b ha una delezione del trinucleotide (ACA) poco dopo i trinucleotidi

ripetuti e 31 sostituzioni nucleotidiche, mentre il sottotipo IIcA5G3c presenta 33 sostituzioni nucleotidiche. Bisogna tener presente che la sottotipizzazione basata sul gene gp60 (tra cui la tipizzazione multilocus) vale solo per *C. hominis* e *C. parvum* ma non per le altre specie. Il gene gp60 che codifica per una proteina che si trova sulla superficie della regione apicale nelle fasi invasive dell'ospite, verso la quale s'indirizza un'intensa risposta anticorpale da parte dell'ospite (128) è considerato il miglior marker polimorfico nel genoma di *Cryptosporidium* (129)(130)(131). Alcune delle famiglie di sottotipi di *C. parvum* come IIa e IIc, si ritrovano sia negli uomini che nei ruminanti e sono responsabili di zoonosi. In aree dove si ritrova sia IIa che IIc, come in Spagna, i sottotipi IIa infettano prevalentemente i vitelli, mentre IIc agnelli e capretti (132).

*C. parvum* IIc sono stati finora trovati solo negli umani (133)(134). Il recente sequenziamento dell'intero genoma di *C. hominis* e *C. parvum* ha permesso l'individuazione di microsatelliti e minisatelliti. Questi vengono spesso utilizzati in analisi multilocus per aumentare la caratterizzazione del sottotipo. Nella tipizzazione multilocus (MLT), variazioni di mini e microsatelliti vengono valutate sulla base di variazioni della lunghezza mediante elettroforesi su gel di acrilammide o la tecnologia GeneScan (130)(135)(136)(137)(138). La seconda tecnica di tipizzazione, la multilocus sequence typing (MLST), si basa sul rilevamento dell'eterogeneità genetica dal sequenziamento del DNA dei prodotti della PCR (129)(139)(140)(141).

I risultati dei recenti studi epidemiologici, grazie alle varie tecniche biomolecolari, hanno notevolmente migliorato le nostre conoscenze sulla criptosporidiosi umana, permettendo di caratterizzare la trasmissione del parassita nell'uomo e negli animali e portando ad una migliore comprensione delle fonti di infezioni. Inoltre, hanno permesso di comprendere che specie diverse di *Cryptosporidium* e diverse famiglie di

sottotipi inducono manifestazioni cliniche differenti e possiedono una diversa virulenza.

*C. parvum* famiglia sottotipo IIa, è molto comune tra gli uomini nelle aree rurali degli Stati Uniti e in Europa (133)(142)(143)(144). La maggior parte dei sottotipi IIa riscontrati negli uomini sono stati identificati pure nei vitelli. Per esempio, in Portogallo, il sottotipo isolato principalmente negli uomini IIaA15G2R1 predomina pure tra i vitelli e nei ruminanti (133)(145). Allo stesso modo, nell'Irlanda del Nord i più comuni sottotipi IIa identificati nei vitelli hanno causato casi sporadici e anche epidemie tra gli umani (142)(146). Negli Stati Uniti in un'epidemia di criptosporidiosi associata al citro di mela, tutti i pazienti erano infettati con *C. parvum* IIaA15G2R1 o IIaA17G2R1 e gli stessi genotipi sono stati riscontrati nel citro incriminato (67). Il sottotipo IIaA17G2R1 è raro negli USA, è stato riscontrato solo in alcuni vitelli in Ohio e Vermont (147). La famiglia di sottotipi IID di *C. parvum* meno comune tra i bovini ha determinato alcune infezioni zoonosiche nei paesi industrializzati. Nel Sud Europa (Italia, Portogallo, Serbia e Ungheria) tra i bovini predomina il sottotipo IIa di *C. parvum* mentre il IID viene isolato molto raramente (133)(148)(149)(150). In Portogallo, da pazienti malati di AIDS sono stati isolati alcuni sottotipi IID (133)(145). Circa la metà delle infezioni dei bambini, in una città del Kuwait, sono state associate al sottotipo IID, anche se la trasmissione appare di origine antroponica (127). Il sottotipo IID è stato riscontrato sia in uomini che in vitelli in UK, USA, Canada e Australia (142)(144)(146)(147)(151)(152). La tipizzazione evidenzia la trasmissione zoonosica della malattia di *Cryptosporidium parvum* in Galles e nelle regioni nord-ovest dell'Inghilterra (154). Nei loci gp60, ML1 e ML2 ci sono differenze significative tra *C. parvum* isolati da persone che hanno avuto e quelle che non hanno avuto contatti con

animali prima dell'insorgenza della malattia (153). La maggior parte delle persone con *C. parvum* sottotipo ML1-242 e ML2-223-237 sono entrate in contatto con animali. Allo stesso modo queste persone, per il locus GP60 danno prodotti di PCR più grandi. Comunque non tutte le infezioni da *C. parvum* sono a trasmissione zoonosica.

Nelle aree urbane negli USA, il sottotipo IIc è responsabile della maggior parte delle infezioni umane (109). In Europa, ad esempio in Portogallo e UK, i sottotipi IIa e IIc sono i più comuni tra gli uomini (133)(145).

In Scozia, l'analisi di tre minisatelliti e di quattro microsatelliti marcatori ha permesso di distinguere tre gruppi di *C. parvum*; due piccoli gruppi riscontrati solo negli uomini e un grande gruppo che si ritrova sia negli uomini che nei bovini (154)(155). Lo stesso è accaduto in Inghilterra e in Galles (130). In Portogallo l'analisi del gene GP60 conferma che gli uomini rispetto ai bovini vengono infettati da una maggiore varietà di sottotipi di *C. parvum* (156). In Francia, è stata invece osservata una più bassa diversità genetica di *C. parvum* tra uomini e bovini (135). Non è chiaro se è stata l'omissione di alcuni marcatori polimorfici, come gp60, a determinare, in questi studi Francesi, risultati diversi.

Il sottotipo umano IIc di *C. parvum* è responsabile della maggior parte delle infezioni nei paesi in via di sviluppo (109)(157)(158)(159), mentre il sottotipo zoonosico IIa è più comune nei paesi Europei, in Australia e USA. In alcuni territori, come in Lima, capitale del Perù, il sottotipo IIc di *C. parvum* è l'unico isolato dagli uomini. In alcuni paesi in via di sviluppo, come Kenya e Malawi, è stato trovato il sottotipo umano IIe (95)(157)(158)(160). In Uganda, sono stati individuati negli uomini dei nuovi sottotipi di *C. parvum* (161). La maggior parte di questi studi sono stati eseguiti in aree urbane. Uno studio in Malawi, dove non è stata fatta la tipizzazione, ha dimostrato che le

infezioni da *C.parvum* sono più frequenti nelle zone rurali (162). Uno studio precedente aveva comunque isolato solo sottotipi umani (157).

## **Il genere Giardia**

Il genere *Giardia* appartiene al Phylum *Metamonadida*, Classe *Zoomastigophora*, Ordine *Diplomonadida*, Famiglia *Hexamitidae*. Attualmente è in corso un dibattito relativamente alla corretta classificazione e nomenclatura delle varie specie di *Giardia*. Sulla base delle diverse caratteristiche strutturali alcuni autori hanno individuato tre gruppi: il gruppo *agilis* isolato dagli anfibi, il gruppo *muris* isolato da roditori, uccelli e rettili e il gruppo *intestinalis* isolato da una varietà di mammiferi (incluso l'uomo), dagli uccelli e rettili (163). *G.lamblia* è il più comune flagellato isolato nel tratto intestinale. Sebbene le diverse specie di *Giardia* possano potenzialmente essere reperite nel tratto intestinale di tutte le classi di vertebrati, solo *G.duodenalis* (*G.intestinalis* oppure *G.lamblia*) è stata riscontrata nell'uomo e nella maggior parte dei mammiferi domestici e selvatici.

Con l'impiego di tecniche di biologia molecolare il morfotipo *G.duodenalis* è stato suddiviso in sette assemblaggi. I più importanti nell'eziologia della giardiasi umana sono gli assemblaggi A e B che raggruppano organismi isolati dall'uomo e dagli animali, mentre gli altri assemblaggi (C-D-E-F) presentano una più netta specificità d'ospite, e rivestono importanza esclusivamente in campo veterinario (164).



## ➤ Il ciclo biologico

Il ciclo presenta due fasi: un trofozoita attivo e replicante e una cisti resistente (Fig.6).

Il ciclo biologico di *Giardia* inizia con l'ingestione delle cisti da parte di un ospite recettivo di cisti che sono immediatamente infettive dopo l'escrezione con le feci da parte di un ospite infetto e che possono sopravvivere nell'ambiente per periodi molto lunghi (165). La cisti è lunga 11-14  $\mu\text{m}$  e larga 7-10  $\mu\text{m}$ , ha forma rotonda o ovale, contiene quattro nuclei, corpi parabasali e assostili (165). Questa, dopo l'ingestione, raggiunge lo stomaco dove per la presenza di acidi, inizia la decistazione che si completa nel duodeno. Da ogni cisti si liberano due trofozoiti. Il trofozoita di *Giardia duodenalis*, classicamente descritto "a forma di lacrima", è lungo 10-20  $\mu\text{m}$  e largo poco più della metà; visto di lato ha la forma di un cucchiaio. Nella parte ventrale è dotato di un disco adesivo; una depressione reniforme profonda fino a 0.4  $\mu\text{m}$  che copre l'intera superficie ventrale del protozoo e i cui margini formano la cresta laterale che contiene proteine contrattili come l'actina, la miosina e la tropomiosina. Il trofozoita possiede due nuclei con cariosoma centrale, due corpi parabasali, due assostili e quattro blefaroplasti da cui originano otto flagelli (2 anteriori, 2 ventrali, 2 caudali e 2 postero-laterali). *Giardia* è un protozoo con struttura estremamente semplice: non possiede mitocondri, perossisomi, idrogenosomi e l'apparato di Golgi è poco sviluppato (Fig. 7) (166). Nell'intestino dell'ospite, alcuni trofozoiti rimangono liberi nel lume mentre la maggior parte si attaccano, tramite il disco ventrale, alla mucosa del duodeno, del digiuno e di parte dell'ileo e iniziano a moltiplicarsi per scissione binaria. Successivamente i per meccanismi non ancora completamente noti, i trofozoiti durante il passaggio attraverso il colon iniziano il processo di incistamento; si retraggono i

flagelli, si condensa il citoplasma e comincia ad essere prodotta la parete cistica. Durante la maturazione della cisti le strutture interne vengono duplicate in modo che dopo l'escistazione, che di norma avviene nel duodeno in seguito all'ingestione delle cisti, da parte di un nuovo ospite, il citoplasma si divide producendo due nuovi trofozoiti. Solo nelle infezioni gravi ci può essere l'emissione attraverso le feci anche dei trofozoiti, ma queste forme in ambiente esterno sopravvivono solo per qualche ora e non sono infettivi (167).

### ➤ **Vie di trasmissione**

Il parassita appartenente alla specie *Giardia intestinalis* viene trasmesso per via oro-fecale o attraverso la contaminazione di acqua o di cibo.

#### **a) Acqua**

L'acqua rappresenta la via più frequente di trasmissione. *Giardia*, analogamente a *Cryptosporidium* sp., è l'agente zoonosico maggiormente trasmesso attraverso l'acqua, è infatti responsabile del 40% delle epidemie associate all'acqua (168) e rappresenta, a livello globale, un grave problema di sanità pubblica (169).

Le cisti di *Giardia duodenalis* si trovano comunemente nelle acque reflue, nelle acque superficiali, nelle sorgenti poco profonde e nelle acque potabili. Le acque non trattate vengono contaminate da acque reflue contenenti escrementi di animali selvatici e domestici (119). Le cisti rimangono infettive per molto tempo in ambienti freddi e umidi, ad esempio, per un periodo di durata superiore a 77 giorni a -10°C (Organizzazione Mondiale della Sanità, 2004), in particolar modo in acqua, per più di 2

mesi ad una temperatura minima di 8°C (170). Non è nota la loro longevità in acqua di mare, anche se infezioni di mammiferi marini e di molluschi suggeriscono che le cisti possono resistere a bassi livelli di salinità (171). In Olanda è stata valutata la qualità dell'acqua presente in canali e laghi della capitale relativamente alla presenza di indicatori fecali e di agenti patogeni. In tali acque che, in base alla legislazione Europea vigente, risultavano essere idonee alla balneazione, sono state rilevate cisti di *Giardia* (172). In Portogallo, la *Giardia* è risultata spesso presente in campioni di acqua, grezze e trattate, sia superficiali che profonde (133)(173). In Norvegia, uno studio di acque reflue, che scaricano nei fiumi e nel mare, provenienti da tre impianti di depurazione, ha dimostrato concentrazioni medie di cisti di *Giardia* comprese tra 480 e 5880 cisti/L (174), lo stesso studio in Canada ha rilevato livelli variabili di entrambi i parassiti, in particolare la concentrazione di *Giardia* variava da livelli molto bassi fino a 3000 cisti/L (175). Vi sono numerosi studi in letteratura che dimostrano la presenza di cisti di *Giardia* in acqua dolce, in particolare negli impianti di acqua potabile, mentre non è stata altrettanto documentata la presenza del parassita in acque costiere o marine. *Giardia* rappresenta un rischio per l'approvvigionamento idrico a causa della sua resistenza al cloro anche se può essere rimossa più facilmente di *Cryptosporidium* per le dimensioni più grandi delle cisti rispetto alle oocisti (176). La prima epidemia di giardiasi associata all'acqua si è manifestata negli Stati Uniti d'America, in Colorado, nel 1965-1966 e il *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) ha iniziato così la sorveglianza delle malattie idro-trasmesse nel 1971 (176). Tra il 1965 e il 1984, circa 90 focolai con un totale di 23.776 casi sono stati segnalati negli Stati Uniti (177). Tra il 1992 e il 1997, la sorveglianza che ha coinvolto 43 Stati degli Stati Uniti ha indicato che ogni anno si verificano 2,5 milioni di casi di giardiasi (178). Le feci dei castori sono i

principali responsabili della contaminazione delle acque con cisti di *Giardia* negli Stati Uniti come testimoniano le epidemie che hanno coinvolto escursionisti e campeggiatori entrati in contatto con acqua di fiumi o laghi. La presenza di cisti di *Giardia* nel sistema di trattamento delle acque cittadine e in due serbatoi di stoccaggio hanno causato un epidemia nel 1976 nello Stato di Washington, con 128 casi. Nel bacino sono stati individuati tre castori infettati con *Giardia* (179). Analoghe conclusioni hanno riguardato epidemie legate all'acqua in New Hampshire e Nevada, USA, dove nei bacini d'origine sono stati trovati castori infetti da *Giardia* (180). Relativamente alla situazione in Europa, in uno studio effettuato in Spagna, sono stati analizzati campioni di acqua provenienti da un bacino idrografico sito in Galizia, in prossimità di allevamenti di bestiame e campioni di feci bovine. Le cisti di *Giardia* sono state ritrovate nel 16% dei campioni di feci bovine con una concentrazione da 5 a 7895 cisti/g di feci. Il 93% dei campioni d'acqua sono risultati positivi con una concentrazione da 2 a 400 cisti/litro (181). Sempre in Galizia la *Giardia* è stata trovata in alta concentrazione nelle acque da bere destinate al consumo umano e animale (182). Un importante studio condotto in Italia (36) nel periodo febbraio 2006 - gennaio 2007 è stata riscontrata la presenza di cisti di *Giardia*, assemblaggi A e B, in campioni di acque reflue trattate, provenienti dalla laguna di Verano, nel Sud d'Italia (57).

### ***b) Alimenti***

I protozoi del genere *Giardia* s'inseriscono nel processo produttivo di un alimento con differenti modalità:

- la contaminazione di materie prime o di ingredienti in azienda

- acqua contaminata che viene introdotta nell'alimento o che viene utilizzata per il lavaggio del prodotto stesso o delle apparecchiature

Nel mondo occidentale, focolai di malattie parassitarie di origine alimentare sono stati associati soprattutto ad alimenti freschi non trattati (180). Negli USA un'epidemia è stata associata a salmone inscatolato in casa e in Cina ad una salsa preparata con pesce crudo di acqua dolce (182). *Giardia* è stata ritrovata in verdure fresche (183)(184)(185); ciò è correlato alla presenza di questi patogeni nelle feci di animali di allevamento e selvatici e quindi nell'ambiente e nelle acque di irrigazione utilizzate in agricoltura. Si rende pertanto necessaria l'adozione di adeguate misure di prevenzione e controllo al fine di evitare la diffusione di alimenti contaminati. I produttori alimentari devono quindi attuare una corretta analisi del rischio seguendo il sistema *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP).

### ***c) Molluschi bivalvi***

La capacità dei molluschi bivalvi di filtrare elevati volumi di acqua, da 20 a 100 litri al giorno a seconda della specie e dalla taglia, rende tali organismi in grado di concentrare un elevato numero di agenti patogeni per l'uomo e per gli animali, incluso *Giardia* sp.

La maggior parte degli studi condotti su campioni di molluschi eduli lamellibranchi, al fine di rilevare la presenza di protozoi dei generi *Giardia* e *Cryptosporidium*, ha evidenziato, nei molluschi, una maggiore prevalenza di *Cryptosporidium*, ad eccezione di due studi spagnoli che riportano una maggiore prevalenza di *Giardia* (186)(1879).

In uno studio condotto utilizzando molluschi di acqua dolce, *Dreissena polymorpha* e *Corbicula flumina*, si è osservato che venivano accumulate nei tessuti dei molluschi più oocisti di *Cryptosporidium* che cisti di *Giardia* nonostante la concentrazione iniziale di

quest'ultime fosse molto più elevata rispetto alle oocisti di *Cryptosporidium* (188). In Italia, la presenza di *Giardia* in molluschi bivalvi è stata segnalata in campioni di vongole (*Chamelea gallina*) della costa abruzzese (71) e in campioni di acqua raccolti in un'area lagunare della Puglia, mentre i molluschi (*Ruditapes decussatus* e *Mytilus galloprovincialis*) prelevati nel medesimo sito risultavano negativi (57). In un recentissimo studio condotto dagli stessi autori è stata rilevata la presenza di protozoi dei generi *Giardia* e *Cryptosporidium* in esemplari di *Mytilus galloprovincialis* prelevati in fase di commercializzazione (6). In uno studio condotto nei Paesi Bassi è stata riscontrata la presenza di *Cryptosporidium* e di *Giardia* in ostriche (*Crassostrea gigas*) provenienti sia dal circuito commerciale che dagli allevamenti (189).

### ➤ **Giardiasi umana**

I primi casi di giardiasi umana in Italia risalgono al 1960 (190)(191). Dai successivi studi fatti dopo il 1990 emerge che la *Giardia* colpisce il 3,2 % degli adulti (192) e da 0,9% (193) a 4,7% dei bambini (194). Più tardi si è osservato un calo significativo della prevalenza dal 4,66 al 0.94%, indipendentemente dall'età, nel corso di quattro anni (1994-1998) in pazienti ospedalizzati e non ospedalizzati (195). Questa minore prevalenza è stata confermata recentemente in altri studi (196)(197). Le persone ricoverate in cliniche psichiatriche e quelle HIV positive sono maggiormente predisposte alla giardiasi (198)(199). Tuttavia la *Giardia* non è considerata un patogeno opportunisto dei pazienti immuno-deficienti, infatti, prima dell'introduzione della terapia anti virale HAART il suo range variava dal 3,47 al 6,15% (103)(200). Studi condotti in Italia, hanno riscontrato la presenza di *Giardia* in associazione con *Entamoeba histolitica* in persone provenienti dai tropici (Phuket in Thailandia) (201).

## **Patogenesi**

I trofozoiti aderiscono alla mucosa del duodeno e dell'ileo tramite il disco ventrale, senza penetrare la parete intestinale; in casi eccezionali sono stati segnalati in sedi diverse (cistifellea, pancreas e nello stomaco di soggetti con acloridria). Non sono stati evidenziati specifici fattori di virulenza; un'azione patogena può essere esercitata direttamente dai protozoi che danneggiano le cellule a cui si fissano; inoltre gli antigeni di *Giardia* provocano l'emissione, da parte dei linfociti T della mucosa intestinale di linfokine tossiche per gli enterociti (166).

## **Clinica**

Il periodo d'incubazione varia da una a due settimane. I sintomi sia nell'uomo che negli animali sono molto variabili. In genere si manifesta un malessere generale, seguito da dolori addominali, diarrea acuta e cronica e perdita di peso. Tra i primi sintomi sono stati descritti anche brividi e lieve febbre; a questi fanno seguito una diarrea acquosa, abbondante e maleodorante, con gorgoglio addominale e distensione associata alla presenza di gas ed eventuale eruttazione. Possono manifestarsi anche crampi superiori o in localizzazione medio-epigastrica. La fase acuta ha una durata di 3 o 4 giorni e può risolversi spontaneamente (importante il ruolo delle IgA secretorie e dei linfociti T helper) o perdurare in forma cronica con feci steatorriche, malassorbimento e perdita di peso.

## **Epidemiologia**

Le cisti di *Giardia* sono estremamente resistenti, potendo sopravvivere nell'ambiente esterno per parecchie settimane. La bassa dose infettante, di circa dieci cisti, e l'elevato

numero di cisti eliminate con le feci dagli ospiti infetti rappresentano elementi di fondamentale importanza nella diffusione della giardiasi (201). Il serbatoio dell'infezione è costituito principalmente dagli ospiti umani, dalle acque superficiali e dagli oggetti e vegetali contaminati da feci umane infette. La trasmissione più frequente è quella oro-fecale diretta.

*Giardia intestinalis* è il parassita intestinale più comunemente isolato in tutto il mondo; ha un'incidenza che varia dal 2% al 5% nei paesi industrializzati e tra il 20% e il 30% nei paesi in via di sviluppo, in particolare nei bambini (202). Il parassita infetta più comunemente le popolazioni delle aree urbane rispetto a quelle provenienti da zone rurali (203). Negli Stati Uniti, il sistema di sorveglianza del *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) dal 1998 al 2003 indica che il numero di casi di giardiasi all'anno varia da 24.226 a 20.075 (204). Il più alto numero di casi è stato riscontrato nei bambini di età compresa tra 1-9 anni e negli adulti tra i 30-39 anni (205). Inoltre è stata osservata una diversa prevalenza legata alla stagionalità, con un picco in estate, probabilmente a causa del maggior contatto con acqua di laghi, fiumi, piscine e parchi d'acqua (204).

Le feci non contengono sangue e muco, in quanto il parassita con il disco adesivo non lede la parete intestinale, ma determina piuttosto un danno meccanico alla mucosa, con appiattimento dei microvilli (206)(207). L'effetto citopatico indotto dai cataboliti del parassita interferisce sulla permeabilità intestinale; nelle infezioni massive, i parassiti possono ricoprire porzioni considerevoli della parete intestinale e fungere da barriera tra il contenuto intestinale e l'epitelio assorbente con conseguente malassorbimento.



## ➤ **Giardiasi negli animali**

Nell'ambito del genere *Giardia*, solo la specie *G. duodenalis* è stata isolata dagli uomini, animali da reddito e animali da compagnia. Negli animali allevati, quali pecore e maiali, è frequente l'isolamento dell'assemblaggio E; in alcune specie tuttavia si riscontrano l'assemblaggio A e B (208)(209). La diffusione degli assemblaggi A ed E negli animali da reddito non presenta differenze significative legate all'età dei soggetti colpiti. In uno studio effettuato nella zona orientale degli Stati Uniti sono stati analizzati 2.000 bovini di diverse fasce di età. L'assemblaggio E era presente nel 28% dei bovini durante lo svezzamento, nel 45% dei bovini dopo svezzamento, nel 33% delle giovenche e nel 25% degli adulti, mentre, l'assemblaggio A si presentava nel 6% dei bovini durante lo svezzamento, nel 7% dopo svezzamento, nel 3% delle giovenche e nel 2% degli adulti (210). Nelle pecore, diversi studi hanno riscontrato una predominanza dell'assemblaggio E, sia negli agnelli che negli adulti, mentre gli assemblaggi A e B sono risultati poco frequenti. Alcuni autori hanno evidenziato inoltre la presenza degli assemblaggi A e B in un gruppo di cavalli affetti da giardiasi (211). La prevalenza di *Giardia* negli animali da compagnia varia dal 5% al 15% e dipende da alcuni fattori, quali la zona di provenienza dei soggetti, il metodo diagnostico utilizzato e lo stato di salute degli animali esaminati; gli animali giovani sono più colpiti dall'infezione rispetto agli adulti (212). Alcuni studi effettuati in Australia dimostrano l'isolamento nei cani degli assemblaggi A, B, C e D (213). La maggior parte degli studi effettuati sui cani ha riscontrato una prevalenza dell'assemblaggio A mentre l'assemblaggio B in genere è raro (214)(215). I gatti vengono infettati da *Giardia* assemblaggio A e F; ma vi sono autori che hanno rilevato la presenza nei gatti degli assemblaggi A, B, C, D e E

(214). Tali dati apparentemente contrastanti, sono il risultato di studi effettuati con l'utilizzo di metodiche per la genotipizzazione caratterizzate da sensibilità e specificità differente.

In Italia l'incidenza della giardiasi nei gatti varia dal 4% al 18% (216)(217)(218)(219). Relativamente alla diffusione della malattia negli animali selvatici, è stata riscontrata, in varie parti del mondo, la presenza degli assemblaggi A e E in cervi, alci, renne, daini, volpi e canguri (220)(221)(222). Gli assemblaggi B, C e D sono stati ritrovati anche in altri mammiferi selvatici, quali alcune specie di roditori, che negli Stati Uniti sono ritenuti i principali responsabili dell'inquinamento delle acque superficiali (223). Tutte le attuali conoscenze sulla giardiasi nell'uomo convergono sul ruolo di serbatoio degli animali, sia domestici che selvatici (224)(225)(226).

### ➤ **Profilassi, Terapia e Disinfezione**

Le infezioni da *Giardia duodenalis* stimolano l'immunità di tipo umorale, tuttavia lo sviluppo di anticorpi protettivi in grado di eliminare il parassita può richiedere tempi piuttosto lunghi (anche 100 giorni nei vitelli). Le bovine producono colostro e latte con attività anti-*Giardia* e l'assunzione di colostro è in grado di proteggere i giovani vitelli dall'infezione(39).

I farmaci più utilizzati per il trattamento dell'infezione da *Giardia* sono i nitroimidazoli, metronidazolo e tinidazolo; anche gli antielmintici come l'albendazolo o gli antimalarici come la quinacrina sono stati utilizzati con elevata efficacia terapeutica (227). La paromomicina (non assorbita a livello intestinale) è da preferire nel primo trimestre di gravidanza. Tali infezioni possono essere trattate con l'associazione di due farmaci appartenenti a classi diverse (166). Benchè la chemioterapia si rilevi molto efficace

nell'eliminazione di *Giardia*, i casi di reinfezione sono molto frequenti, qualora la fonte di contaminazione ambientale non venga eliminata (228). Per quanto riguarda la disinfezione ambientale, i prodotti più efficaci per la devitalizzazione delle cisti sono rappresentati dai disinfettanti a base di sali d'ammonio quaternari, ipoclorito di sodio all'1%, formalina in soluzione acquosa al 2.5% e soluzioni acquose al 5% di fenolo o cresolo (39).

### ➤ **Caratterizzazione genotipica**

Le metodiche biomolecolari, in uso già da alcuni anni nei laboratori di parassitologia, hanno consentito di distinguere, nell'ambito della specie *Giardia duodenalis*, sette diversi assemblaggi, sulla base delle differenze esistenti in alcuni geni, quali il gene *gdh* per la glutammato-deidrogenasi, la piccola subunità (SSU) dell'rRNA e il gene *tpi* per la triosofosfato-isomerasi (214)(223)(229)(230)(231). Tra i diversi assemblaggi, solamente gli assemblaggi A e B di *Giardia duodenalis* sono stati isolati da campioni di origine umana. Alcuni studi condotti nel nostro Paese hanno consentito di tipizzare ben 120 isolati umani di *Giardia*; con il 54,16% assemblaggio A, 32,5% assemblaggio B e 13% assemblaggio misto A e B (197)(232)(233). L'assemblaggio A è stato inoltre suddiviso in sette sottotipi (A1⇒A7) e quello B in tre (B1-B3-B4). La distribuzione dei due assemblaggi tra gli uomini varia da uno studio all'altro anche nello stesso Paese (234); infatti, considerato che nell'uomo la *Giardia* presenta solo questi due assemblaggi e questi sono stati riscontrati in moltissimi animali, gli studi sulla trasmissione zoonosica del patogeno si sono incentrati solo su questi genotipi. Diversi studi hanno confrontato gli isolati di *Giardia* da uomini e animali che vivevano nella stessa zona o addirittura nella stessa casa (235)(236)(237). L'assemblaggio A,

maggiormente implicato nella trasmissione animale-uomo, viene suddiviso in AI e AII a seconda della specificità d'ospite. Negli uomini si riscontra maggiormente AII mentre negli animali predomina AI. Basandosi sullo studio del gene della  $\beta$ -giardina è stato possibile identificare in campioni umani, un sottotipo AIII; questo potrebbe essere il risultato di una maggiore risoluzione del locus genico. I pazienti con diarrea intermittente presentano generalmente l'assemblaggio A mentre quelli con diarrea persistente quello B (238).

## **Il genere *Toxoplasma***

*Toxoplasma gondii* è un protozoo endocellulare che appartiene al Phylum *Apicomplexa*, Classe *Coccidia*, Ordine *Eucoccidiorida*, Famiglia *Sarcocistidae*. E' l'agente eziologico di una zoonosi parassitaria che rappresenta uno dei maggiori problemi di sanità pubblica. L'infezione decorre generalmente asintomatica e benigna; tuttavia sono ormai noti i rischi di trasmissione materno-fetale, all'origine di fetopatie, e la possibilità di riattivazione di una vecchia infezione nell'individuo immunocompromesso (AIDS, trapianti d'organo), all'origine di encefaliti o di forme disseminate. Il parassita fu descritto per la prima volta nel 1908 da Nicolle e Manceaux in Tunisia in un roditore selvatico (*Ctenodactylus gundi*) e da Splendore in Brasile, in un coniglio da laboratorio, tuttavia il ciclo del parassita fu descritto solo nel 1970 da Frenkel e Dubay (166). Durante la prima metà di questo secolo, sono state nominate diverse specie di *Toxoplasma* sulla base della specie ospite da dove sono stati isolati (239). All'interno della specie *Toxoplasma gondii* è possibile distinguere diverse linee genetiche (tipo I, II e III), probabile risultato della ricombinazione sessuale del protozoo nel gatto e che si

sospetta possano essere associate alla gravità e all'evoluzione dell'infezione nell'uomo (240)(241)(242).

### ➤ **Ciclo biologico**

Il ciclo vitale di *Toxoplasma* è stato chiarito verso la fine del 1960 quando si è capito che le feci dei gatti potevano contenere uno stadio infettivo di *Toxoplasma* che induce infezione quando viene ingerito da un ospite intermedio (243). Nel 1970, la conoscenza del ciclo di vita di questo coccidio è stata arricchita dalla scoperta di fasi sessuali del parassita nel piccolo intestino dei gatti (239)(244)(245)(246). Tuttavia la conoscenza del ciclo è stata completata circa sessant'anni dopo la prima descrizione delle fasi asessuali del protozoo in ospiti intermedi (Fig.8).

Il ciclo vitale è caratterizzato dalle seguenti fasi: intestinale (unicamente nel gatto), di sporogonia (nell'ambiente), extra-intestinale (in tutti gli animali incluso l'uomo). Fase intestinale: Il gatto s'infecta ingerendo oocisti sporulate ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) o cisti tissutali di animali infetti. Da questi elementi si liberano, rispettivamente sporozoiti (8 per ogni oocisti) e bradizoiti (presenti in gran numero all'interno delle cisti). Ogni "zoita" invade la cellula della mucosa dell'intestino tenue, dando inizio alla fase asessuata (schizogonia), con formazione di uno schizonte contenente numerosi merozoiti. Lo schizonte si accresce fino a "rompere" la cellula intestinale liberando i merozoiti, che invaderanno altre cellule avviando un nuovo ciclo schizomico. Nel corso di tali cicli schizomici, alcuni merozoiti si differenziano in micro e macro gameti (rispettivamente la forma "maschile" e "femminile"), dalla cui fusione (fase sessuata o gametogamia) prende origine l'oocisti (zigote) che, fuoriuscita dalla cellula, viene

eliminata con le feci nell'ambiente esterno. Tra l'ingestione degli elementi infettanti e l'escrezione delle oocisti possono trascorrere dai 3 ai 10 giorni.

Fase di sporogonia: giunta nell'ambiente, l'oocisti diviene infettante in 1-21 giorni, sviluppando al suo interno 2 sporocisti contenenti ciascuna 4 sporozoiti. Il tempo di sporulazione delle oocisti è in funzione delle condizioni ambientali ed in particolare della temperatura: a 24°C è di 2-3 giorni, mentre risulta di 14-21 giorni a 11°C. La maturazione non avviene al di sotto dei 4°C e al di sopra di 37°C. Le oocisti sono molto resistenti; è stato dimostrato che oocisti non sporulate sono in grado di rimanere vitali a +4°C anche per diversi mesi e mantengono la capacità di sporulare una volta riportate in condizioni idonee (39).

Fase extra-intestinale: è fortemente influenzata dallo stato immunitario dell'ospite. Quest'ultimo si può infettare ingerendo sporozoiti (nelle oocisti mature), bradizoiti (nelle cisti tissutali) e tachizoiti (nel sangue e nei secreti di ospiti infetti). Superata la barriera intestinale, questi "zoiti" diffondono con il circolo ematico a tutti gli organi e tessuti dando origine a tachizoiti, elementi di 3-7 µm caratterizzati da rapida moltiplicazione (fase acuta). In individui immunocompetenti, dopo circa 1-2 settimane segue la fase cronica, con formazione di bradizoiti che si moltiplicano lentamente all'interno di cisti terminali (30-60 µm), localizzate prevalentemente nel tessuto muscolare, ma anche in altre sedi (occhio, sistema nervoso centrale)(39).

### **Descrizione del parassita**

I tachizoiti sono parassiti intracellulari di forma arcuata di 2-4 µm di larghezza per 4-8 µm di lunghezza. All'estremità anteriore si trova il complesso apicale che permette la penetrazione attiva e rapida del parassita nei macrofagi, nelle cellule gliali o muscolari.

In queste cellule, che lisano, si riproducono molto rapidamente per endoduogenia asessuata in un vacuolo parassitoforo. I tachizoiti sono infettanti per via transplacentare, ma vengono distrutti dall'acidità gastrica. I bradizoiti, in numero variabile da alcune decine a qualche migliaio, sono contenuti all'interno di cisti di 15-200  $\mu\text{m}$  di diametro e si ritrovano in diversi tessuti. La parete cistica, spessa e rifrangente, deriva da una modificazione della parete del vacuolo parassitoforo. In queste cisti i bradizoiti si riproducono lentamente per endoduogenia asessuata. La loro persistenza per tutta la vita dell'ospite assicura un'immunità forte, durevole e protettrice contro qualsiasi ulteriore contaminazione. Le cisti sono infettanti, resistono all'acidità gastrica, al freddo (sopravvivono a 4°C per più di 2 mesi), ma sono distrutte dalla cottura (30 minuti a 56°C) e dal congelamento (più giorni a -20°C). Le oocisti di 10-15  $\mu\text{m}$  che costituiscono lo stadio finale del ciclo sessuato entero-epiteliale vengono eliminate con le feci dai gatti. Contengono, dopo maturazione nell'ambiente esterno, 2 sporocisti che racchiudono 4 sporozoiti di struttura simile ai tachizoiti, in grado di resistere all'acidità gastrica e che vengono distrutti dalla cottura, dal congelamento e dal disseccamento.

### ➤ **Vie di trasmissione**

I tachizoiti svolgono un ruolo fondamentale nella trasmissione verticale, mentre risultano essere estremamente sensibili alle condizioni ambientali e si inattivano rapidamente al di fuori dell'ospite. Si ritiene pertanto che le trasmissioni orizzontali d'infezioni tramite tachizoiti da *T.gondii* non rivestano grande importanza dal punto di vista epidemiologico. Vi sono tuttavia alcune segnalazioni relative alla trasmissione dei tachizoiti attraverso prodotti sanguigni, in particolare quelli contenenti la frazione di globuli bianchi o per iniezione accidentale in laboratorio (245)(247). Il rischio di

contrarre l'infezione in seguito a trasfusione di sangue è basso (245). In alcuni casi *Toxoplasma gondii* è stato trasmesso dalla madre, che ha acquisito un'infezione primaria, al neonato attraverso la suzione del latte materno (248). Oltre al sangue e al latte, i tachizoiti sono stati rilevati in altri fluidi corporei, tra cui la saliva, l'espettorato, l'urina, le lacrime e lo sperma (245).

Nei paesi occidentali e asiatici il consumo di carne cruda o poco cotta è la più probabile fonte d'infezione (249)(250). Una prova indiretta viene dall'osservazione che la sieropositività per *Toxoplasma* è più bassa nei vegetariani rigorosi (251)(252). Tuttavia, come dimostrano diversi studi epidemiologici, il consumo di frutta e verdure crude mal lavate è considerato un importante fattore di rischio (253)(254)(255).

### **a) Acqua**

*Toxoplasma* è stato associato raramente a malattie idro-trasmesse. Le oocisti del parassita sono in grado di resistere alla disinfezione, tuttavia i sistemi idrici comunitari non sono considerati come un'importante via di trasmissione delle zoonosi. Numerosi studi hanno confermato un legame tra epidemie di toxoplasmosi e contaminazione dell'acqua con oocisti di *Toxoplasma* (256)(257)(258). La prima epidemia documentata risale al 1982, a Panama e ha coinvolto delle truppe britanniche che avevano ingerito acqua di un torrente durante una manovra nella giungla. Il secondo focolaio si è manifestato in Canada nel 1995 con 110 infezioni identificate, tra cui 42 donne in stato interessante e 11 bambini. La causa dell'epidemia è stata l'acqua potabile comunale con infiltrazione di acque reflue contaminate da oocisti provenienti da felidi (257). Nei



primi anni 2000 si è manifestata un'ulteriore epidemia in Brasile, dovuta all'ingestione di acqua potabile contaminata (258).

### ***b) Alimenti di origine animale e vegetale***

Tachizoiti di *Toxoplasma gondii* sono stati isolati da campioni di latte provenienti da ospiti intermedi, tra cui bovini e piccoli ruminanti (259). Un episodio di toxoplasmosi acuta è stata associato al consumo di latte non pastorizzato di capra (260) e di pecora (261). La probabilità di acquisire l'infezione attraverso l'ingestione di latte vaccino è molto bassa, tuttavia il rischio aumenta con il consumo di latte crudo (262). Uno studio condotto in Polonia, per valutare i fattori di rischio associati all'infezione primaria da *T.gondii* in donne in età fertile, ha suggerito che il latte alimentare può essere un potenziale fattore di rischio per la trasmissione all'uomo (263).

I tachizoiti sono caratterizzati da elevata sensibilità all'azione di enzimi proteolitici e del succo gastrico; possono sopravvivere occasionalmente per brevi periodi (fino a due ore) in soluzioni acide contenenti pepsina (237). Negli esseri umani adulti, l'ingestione di pasti solidi può determinare un aumento del pH dello stomaco fino ad un valore di 5 per diverse ore e in tali condizioni, i tachizoiti possono depositarsi nell'intestino. E' stato suggerito che, in rare condizioni, i tachizoiti possano invadere la mucosa intestinale e raggiungere il sistema circolatorio e linfatico dell'ospite (264).

I tachizoiti vengono inattivati dal trattamento di pastorizzazione del latte e da un'adeguata cottura delle uova (262).

I bradizoiti sono più resistenti dei tachizoiti agli enzimi digestivi (pepsina e tripsina) (265). Le cisti tissutali di *Toxoplasma gondii* sono relativamente resistenti alle variazioni di temperatura e rimangono infettanti a temperature di refrigerazione (4°C)

nelle carcasse e nelle carni macinate per un massimo di tre settimane (266). Anche se la maggior parte delle cisti tissutali viene inattivata a temperatura di  $-12^{\circ}\text{C}$ , si è visto che possono essere in grado di sopravvivere al congelamento e che alcuni ceppi sono totalmente resistenti alle basse temperature (267). Alcuni studi hanno suggerito che le cisti tissutali vengono inattivate nel corso di processi di stagionatura degli insaccati, durante i processi di fermentazione con l'aggiunta di saccarosio o nelle carni affumicate a bassa temperatura (268). Il tempo di sopravvivenza delle cisti tissutali, nei prodotti a base di carne, dipende dalla concentrazione di sale e dalla temperatura di conservazione. In condizioni sperimentali le cisti sono state inattivate con l'aggiunta di NaCl al 6% a differenti valori di temperatura ( $4-20^{\circ}\text{C}$ ), mentre sono rimaste vive e vitali in soluzione acquosa a concentrazioni più basse di sale per diverse settimane (268). In salsicce di produzione domestica, a base di carne suina, è stato dimostrato che non sempre la salatura determina la devitalizzazione delle cisti (269). La sola salatura non è sufficiente a prevenire la trasmissione all'uomo della toxoplasmosi. Il trattamento più efficace al fine di determinare l'inattivazione delle cisti tissutali è il riscaldamento ad una temperatura pari o superiore a  $67^{\circ}\text{C}$  (267). L'inattivazione delle cisti a temperature inferiori dipende dalla durata del trattamento; è stato dimostrato sperimentalmente che le cisti rimangono infettive a  $60^{\circ}\text{C}$  per 4 minuti e a  $50^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti (266). La cottura domestica dev'essere prolungata per raggiungere, a cuore del prodotto, le temperature necessarie a devitalizzare le cisti tissutali di *Toxoplasma gondii* in tutte le parti della carne. Alcune cisti, possono sopravvivere se la cottura non è uniforme, come nel caso della cottura a microonde (270). Le cisti tissutali vengono eliminate anche con l'ausilio dei raggi gamma alla dose di 1.0 KGy (267); tuttavia l'irradiazione delle carni consentita in alcuni paesi, come gli Stati Uniti, è invece vietata dalla normativa

comunitaria. Recentemente, è stato dimostrato in laboratorio che il trattamento ad alta pressione (pari o superiore a 300 MPa) è in grado di inattivare le cisti; sottoporre però grossi quantitativi di carne a tale trattamento è molto costoso e si altera la consistenza della carne.

Relativamente agli alimenti di origine vegetale, il rischio per il consumatore è rappresentato dall'eventuale contaminazione con oocisti sporulate presenti nell'ambiente, in particolare nel suolo e nell'acqua di irrigazione. Si rende pertanto necessario effettuare un accurato lavaggio di tali alimenti prima del consumo se non vengono sottoposti a cottura o a processi di trasformazione in grado di disattivare il patogeno ed evitare la contaminazione crociata nelle cucine (271).

Le oocisti di *Toxoplasma* dimostrano notevole resistenza a vari agenti disinfettanti e reagenti chimici. Ad esempio, rimangono vitali per diversi anni in soluzione acquosa di acido solforico al 2% oppure di bicromato di potassio al 2.5% alla temperatura di 4°C (272). Inoltre risultano particolarmente resistenti all'ipoclorito di sodio e all'ozono.

### ***c) Molluschi bivalvi***

Le oocisti di *Toxoplasma* sono in grado di sporulare in acqua salata in pochi giorni e una volta sporulate, possono sopravvivere in ambiente marino per 6 mesi, rimanendo infettanti. Ciò giustifica l'elevata percentuale di anticorpi anti-*Toxoplasma* ritrovata in numerosi mammiferi marini come i cetacei, i pinnipedi, i sirenidi e la positività, seppur ridotta, nei molluschi bivalvi (171). L'encefalite da *Toxoplasma* è stata riscontrata in lontre marine e in altri mammiferi marini (273)(274). Alcuni autori hanno dimostrato che i mammiferi marini possono infettarsi ingerendo invertebrati contaminati da oocisti di *Toxoplasma gondii*. Le oocisti raggiungerebbero il mare attraverso le acque di

dilavamento o di depurazione (171), e verrebbero concentrate da filtratori invertebrati, inclusi i molluschi bivalvi. Tali organismi rappresentano quindi una fonte d'infezione per gli animali marini e per l'uomo, se consumati crudi o poco cotti (273)(275)(276). Studi sperimentali hanno dimostrato che le ostriche orientali (*Crassostrea virginica*) possono accumulare oocisti e che queste rimangono infettive per 6 giorni (277) e addirittura fino ad 85 giorni (276). In uno studio condotto in Turchia è stata valutata la presenza di *Toxoplasma gondii* in esemplari di *Mytilus galloprovincialis*. Il 9,4% dei campioni sottoposti a Eva Green® Real Time PCR e analisi HRM sono risultati positivi per *T.gondii*. Dalla tipizzazione il 24% è risultato *T.gondii* Type I (278).

Un recente studio condotto in Italia ha valutato la presenza di *Toxoplasma gondii* in campioni di molluschi eduli lamellibranchi, analizzando ben 1.734 esemplari, di cui 109 di *Crassostrea gigas* (6 pools), 804 *Tapes decussatus* (28 pools) e 161 *Tapes philippinarum* (6 pools), pescati nella laguna di Varano (Apulia, Italia). I 62 pools sono stati sottoposti a due tecniche biomolecolari: Nested PCR e FLAG Real Time PCR, entrambe basate sulla ricerca del gene multi-copy B1. Complessivamente sono risultati positivi, per entrambe le tecniche utilizzate, un campione di branchie di *C.gigas* e un campione di emolinfa di *T. decussatus* (279). I risultati ottenuti hanno evidenziato un possibile rischio per la salute del consumatore in seguito al consumo dei molluschi crudi o poco cotti.

### ➤ ***Toxoplasmosi umana***

La toxoplasmosi umana è un'infezione usualmente asintomatica in soggetti immunocompetenti; nel 10-20% dei casi si presenta come una linfadenite febbrile benigna autolimitante detta sindrome mononucleasica simile (257)(280). Manifestazioni

cliniche gravi quali l'encefalite, sindrome da sepsi/shock, miocardite, epatite sono piuttosto rare in pazienti immunocompetenti (280). Nei primi anni '50, *Toxoplasma gondii* è stato riconosciuto come causa di retinocoroiditi (281). Tale patologia veniva generalmente attribuita ad un'infezione prenatale, che si manifestava più tardi nel corso della vita (282); attualmente, si ritiene possa essere una patologia acquisita dopo la nascita (283).

Negli individui immunocompromessi la riattivazione di un'infezione pregressa può determinare encefalite o polmonite. La toxoplasmosi disseminata può anche complicare il trapianto di organi e di midollo osseo. *Toxoplasma gondii* provoca grave encefalite nel 40% dei pazienti affetti da AIDS (284). Si è visto che la terapia antivirale (HAART) l'incidenza dell'infezione tra i malati di AIDS è ora in declino in molti paesi e la riattivazione di un'infezione latente viene prevenuta mediante profilassi con trimetoprim-sulfamethoxazole (TMX-Sulfa).

### **Toxoplasmosi congenita**

Nelle persone immunocompetenti, l'infezione da *Toxoplasma gondii* determina una immunità permanente verso la toxoplasmosi. Pertanto, se l'infezione primaria viene acquisita 4-6 mesi prima del concepimento o in un periodo ancora precedente, l'immunità protettiva previene, nella donna gravida, la trasmissione verticale al feto. I tachizoiti invadono la placenta, si moltiplicano al suo interno e in parte la superano raggiungendo il circolo ematico e i tessuti fetali (285). La toxoplasmosi congenita può causare aborto, morte neonatale o anomalie fetali (286). Le lesioni al feto sono tanto più gravi quanto più la contaminazione è precoce durante la gravidanza, ma il rischio di

contaminazione, basso all'inizio della gravidanza (<10% nel primo trimestre), è tanto più elevato quanto più è avanzata la gravidanza (>80% nel terzo trimestre) (286). Nel feto la manifestazione clinica più seria è l'encefalomielite. Circa il 10% delle infezioni prenatali provoca aborto o morte neonatale; una percentuale variabile tra il 10 e 23% dei neonati infettati prima della nascita mostra segni clinici nel periodo perinatale, quali corioretinite, calcificazioni intracraniche e idrocefalo (286). La restante parte dei neonati mostra un'ampia varietà di sintomi tra cui: febbre, anemia, ittero, splenomegalia, epatomegalia, convulsioni, linfadenopatia. Circa il 12-15% dei bambini con questa sintomatologia muore a causa della malattia, mentre i bambini che sopravvivono possono andare incontro a gravi patologie neuro psichiatriche (286). Tuttavia, qualora l'infezione si verifichi nella fase tardiva della gravidanza gli effetti sul feto sono meno gravi, con la maggior parte dei bambini asintomatici alla nascita. Nel corso di una gravidanza una donna sieronegativa deve effettuare ogni mese l'esame sierologico per individuare al suo esordio la sierconversione. Vengono ricercati gli anticorpi IgM e IgG. Una donna non immune deve effettuare il controllo anticorpale ogni mese e seguire le misure igienico-dietetiche.

### ➤ **Toxoplasmosi negli animali**

La toxoplasmosi negli animali da reddito rappresenta una patologia a bassa prevalenza (287), tuttavia vi è il rischio reale di trasmissione diretta o indiretta all'uomo (288). Alcune specie animali utilizzate per la produzione della carne possono manifestare segni evidenti d'infezione da *Toxoplasma gondii*. Parassiti vitali sono stati isolati da carne o prodotti a base di carne provenienti da diverse specie, quali: pecora, capra,

cavallo, suino e selvaggina, più raramente carne di coniglio, pollo, manzo, bovino e bufalo (262).

Nei suini, i segni clinici della malattia sono rari, ma si possono rilevare nascite premature e polmoniti; sono stati segnalati, inoltre, casi di miocardite ed encefalite (287). Alcuni studi descrivono disturbi nervosi (tremori e atassia), tosse, diarrea, con tassi di mortalità del 50% (289), per lo più in concomitanza con altri fattori. La maggior parte dei casi è asintomatica o caratterizzata da sintomi di tipo generale, quali ipertermia e anoressia (290). I dati sulla sieroprevalenza, in Europa, variano da 0 a 64% nei maschi allevati e dal 3 al 31% nelle femmine. Negli Stati Uniti la prevalenza dell'infezione nei suini è piuttosto bassa grazie all'utilizzo di buone pratiche di allevamento (frequenti derattizzazioni); uno studio americano, inoltre, ha evidenziato una prevalenza pari a 0,38% nella carne di maiale (291). Dall'esame della letteratura si evince che sono stati accertati solo due (in Corea) di toxoplasmosi umana conseguenti al consumo di carne di maiale poco cotta. Nel primo focolaio, tre persone si sono infettate dopo aver mangiato milza e fegato crudi di un maiale selvatico, nel secondo cinque soldati si sono infettati dopo aver mangiato fegato crudo di un maiale domestico (292). Il recente cambiamento delle abitudini alimentari sempre più orientate al consumo di carni provenienti da suini allevati allo stato brado, con un maggiore contatto con l'ambiente esterno, porta ad un aumento del rischio di contaminazione delle carni con *T. gondii*. Un'incremento d'incidenza si osserva infatti nei suini allevati in aziende biologiche con accesso all'esterno (293).

Nei bovini non si registrano casi di toxoplasmosi con manifestazione clinica evidente e probabilmente diversi episodi di aborto sono stati erroneamente associati a questo patogeno, prima della scoperta di *Neospora caninum* (294). I bovini non rappresentano

pertanto un importante serbatoio del parassita (262).

La prevalenza di *Toxoplasma gondii* negli ovini adulti e negli agnelli è piuttosto alta; il parassita causa, in tali specie, aborti e morti neonatali (295). Gli agnelli che sopravvivono ad un'infezione congenita crescono regolarmente e rappresentano quindi una fonte d'infezione per gli esseri umani. Gli ovini e i caprini vengono solitamente tenuti al pascolo e se l'ambiente è fortemente contaminato da oocisti, le sieroprevalenze possono superare il 90% (262)(295). Numerosi studi dimostrano che la sieroprevalenza tra le pecore è maggiore rispetto alle capre.

Casi sporadici di toxoplasmosi clinica sono stati riportati in conigli, scoiattoli, canarini, fringuelli e corvi. Cisti tissutali sono state trovate in carne di cervo, di lepre e di cinghiale (262).

Il rischio d'infezione associato al consumo di carne può essere ridotto in modo significativo con un tipo di allevamento intensivo e l'applicazione di adeguate misure igieniche, in particolare una lotta agli infestanti.

Il gatto, domestico e selvatico, s'infetta ingerendo oocisti sporulate presenti nell'ambiente o tachizoiti e/o bradizoiti presenti nei tessuti di prede (roditori/volatili). Le infezioni da *Toxoplasma gondii* nei gatti sono in genere asintomatiche e le trasmissioni verticali si verificano molto raramente (294). Tuttavia, le infezioni latenti sono molto comuni nei gatti domestici e nei felini selvatici, in tutto il mondo (294). Nei gatti domestici la sieropositività è rilevata nel 74% dei gatti adulti. La positività è maggiore nei gatti randagi o selvatici rispetto ai gatti che vivono in ambiente urbano e suburbano. Tuttavia, tra il 9 e il 46% dei gatti domestici, in Europa, Sud America e Stati



Uniti mostrano evidenza sierologica di pregressa esposizione al parassita (262). Dopo l'infezione il gatto elimina le oocisti in numero molto elevato, ma per un periodo molto limitato (circa due settimane) mentre, nel caso di una seconda infezione, l'escrezione delle oocisti è ridotta o addirittura non si verifica, molto probabilmente in seguito all'istaurarsi di fenomeni immunitari (171). In generale, l'ingestione di bradizoiti porta ad una maggiore escrezione di oocisti (296). Buona norma è alimentare il gatto domestico con mangimi in commercio. Va infatti sottolineato che i gatti adulti, tenuti in ambiente domestico, alimentati con mangimi commerciali, che non hanno la possibilità di cacciare prede e che non entrano in contatto con altri gatti (gatti castrati e gatte sterilizzate) dovrebbero essere esclusi quale possibile fonte d'infezione.

### ➤ **Caratterizzazione genotipica**

L'analisi genetica di *Toxoplasma gondii* indica che il parassita si compone di tre linee clonali differenti, definite genotipo I, II e III, sia negli uomini che negli animali (297). Oltre il 70% dei casi di malattia nell'uomo verificatesi sia in Nord America che in Europa, è stato associato con il tipo II (297).

In animali infetti naturalmente sono stati riscontrati sia il tipo II che il tipo III, suggerendo quindi l'associazione del tipo II con la malattia clinica nell'uomo (297).

L'isolamento di altri genotipi e di ceppi atipici che non rientrano in queste tre grandi linee è raro in Europa (298). Studi condotti su animali da laboratorio hanno dimostrato che i ceppi di tipo I sono ad alta patogenicità, mentre i ceppi di tipo II e III sono relativamente meno patogeni (299) e causano più frequentemente l'infezione in soggetti immunocompromessi (297) (300).

Recentemente, per la genotipizzazione di *Toxoplasma gondii* è stato utilizzato il polimorfismo del gene B1 (278)(301). L'analisi mediante autoradiografia dimostra che il gene B1 presenta da 25 a 50 ripetizioni (302).

## **Tecniche analitiche**

Le oocisti/cisti di *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma* possono essere ricercate in qualunque contaminata da materiale fecale infetto o che contiene il parassita, tra cui alimenti freschi quali frutta e vegetali, molluschi eduli lamellibranchi e alimenti liquidi quali acqua, latte e succhi di frutta. I tachizoiti di *Toxoplasma* possono essere ricercati in campioni di latte ed acqua; i bradizoiti contenuti nelle cisti tissutali in campioni di carne fresca o prodotti a base di carne.

## ***Colorazioni per microscopia a luce ordinaria e a fluorescenza***

### ***a) Cryptosporidium***

Un primo livello di screening avviene attraverso un'esame microscopico diretto di uno striscio di campione da esaminare utilizzando colorazioni estemporanee (a base di nigrosina, carbofucsina, verde metile, merbromina). Le oocisti eventualmente presenti, non avendo assunto il colorante, alla luce ordinaria appariranno rifrangenti su fondo rosso o nero. Un secondo livello prevede la concentrazione del campione e successiva colorazione permanente a base di carbofucsina, basata sulle caratteristiche di colorazione acido-resistente delle oocisti (colorazione di Ziehl-Neelsen modificata). Le oocisti sono colorate in rosso su fondo blu o verde in base al tipo di colorante di contrasto utilizzato. Possono inoltre essere utilizzate colorazioni fluorescenti (auramina-

rodamina oppure auramina-carbolfucsina) nelle quali le oocisti appaiono luminose su fondo scuro.

### ***b) Giardia***

Per la diagnosi di routine è necessario eseguire almeno un esame microscopico diretto (a fresco e dopo colorazione con Lugol) e uno dopo concentrazione (ad esempio per sedimentazione con formil-etere). L'esame microscopico può anche essere eseguito su preparati colorati con Giemsa, Ematossilina ferrica e tricromica.

### ***c) Toxoplasma***

La diagnosi diretta mira ad evidenziare le oocisti di *Toxoplasma* nel campione in esame. Tale diagnosi presenta notevoli difficoltà tecniche dovute alle dimensioni ridotte delle oocisti che inoltre non possono essere distinte da oocisti morfologicamente simili (*Hammondia hyedorni* e *Besnotia besnoiti*). I tachizoiti possono essere ricercati direttamente in strisci di campioni che dopo asciugatura vengono sottoposti a colorazione con May-Grumwald Giemsa, Pappenheim e Wright-Giemsa. Cisti contenenti bradizoiti possono essere evidenziate in sezioni di organi e muscoli, inclusi in paraffina e colorati con ematossilina-eosina. I bradizoiti sono fortemente positivi all'acido periodico di Schiff (PAS).

## **Tecniche immunologiche**

I metodi analitici che sfruttano il potere discriminante degli anticorpi sono particolarmente utili nella determinazione di componenti o contaminanti, anche di

piccole dimensioni e presenti in piccole quantità, come le cisti/oocisti di *Cryptosporidium* e *Giardia*. Ulteriori vantaggi delle metodiche immunologiche sono rappresentate dalla semplicità di esecuzione e dalla rapidità del risultato.

Tra i metodi diagnostici su base immunologica, il test di immunofluorescenza diretta per l'identificazione di *Cryptosporidium* e *Giardia* trova attualmente largo impiego nell'ambito della diagnostica alimentare. Tale test si basa sull'utilizzo di una miscela di anticorpi monoclonali, marcati con fluorescina, diretti contro antigeni specifici della parete cellulare delle oocisti/cisti protozoarie.

### **Tecniche di biologia molecolare**

Le tecniche biomolecolari consentono, mediante l'analisi del DNA genomico, di effettuare in modo rapido e specifico la ricerca e l'identificazione dei protozoi nei molluschi bivalvi. Tali tecniche si basano sull'amplificazione di frammenti specifici di target genetici mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR). Tale reazione si basa sull'utilizzo di *primers* selezionati con sequenze complementari alle estremità opposte dei due singoli filamenti di un frammento di DNA specie-specifico che consentono di individuare il frammento bersaglio e di risintetizzare enzimaticamente il DNA a doppia catena. L'enzima DNA *polimerasi* permette la sintesi di milioni di copie del frammento desiderato, così da ottenere un frammento specifico (amplicone), che può essere utilizzato per il successivo sequenziamento o per l'esecuzione di altre tecniche di caratterizzazione molecolare. In una fase preliminare è necessario individuare i frammenti di DNA (geni *targets*) che mostrano differenze nella sequenza nucleotidica per specie strettamente affini; tali frammenti devono essere selezionati in modo da mostrare la massima differenza tra specie diverse e la minima differenza tra

individui della stessa specie. Per un corretto avvio di reazione è necessaria una scelta accurata dei *primers* d'innescio, l'introduzione di una DNA polimerasi termostabile, di efficienti soluzioni tampone, di nucleotidi oltre che il frammento di DNA bersaglio estratto e purificato, nella miscela di reazione.

### ***Nested PCR***

La PCR Nested viene utilizzata per aumentare la specificità di amplificazione; si effettua una prima amplificazione con una coppia di *primers*, seguita da una seconda PCR che utilizza come stampo il prodotto di amplificazione diluito ottenuto dalla prima reazione di PCR e come *primer* una coppia interna a quella utilizzata nella prima reazione. In questo modo si eliminano eventuali prodotti aspecifici ed è possibile aumentare la resa e la specificità di PCR particolarmente “difficili”.

### ***Real Time PCR***

Le tecniche di PCR tradizionale consentono di effettuare un'analisi di tipo qualitativo dei prodotti di reazione. Infatti, solo durante la fase esponenziale di accumulo del prodotto, il numero di molecole per ciclo dipende dal numero iniziale di molecole, successivamente l'efficienza della reazione diventa variabile e si raggiunge una fase di *plateau*, per cui non è più possibile correlare la quantità di prodotto finale con la quantità di stampo iniziale. La *Real Time* è una tecnica di PCR che consente di seguire l'amplificazione dei prodotti ad ogni ciclo in tempo reale e di realizzare anche un'analisi di tipo quantitativo se vengono utilizzati degli standard a concentrazione nota. Questa tecnica si basa sull'uso di coloranti intercalanti fluorescenti che si legano alle molecole di DNA a doppia elica o di sonde marcate complementari a specifiche

sequenze d'interesse. I coloranti usati sono molecole fluorescenti (esempio SYBER Green I) che legandosi ai frammenti di DNA a doppia elica emettono fluorescenza in maniera proporzionale alla quantità di amplificato. La quantità di amplificato può essere rilevata misurando l'emissione del segnale del fluoroforo al termine della fase di allungamento di ciascun ciclo. Il maggiore svantaggio nell'usare il SYBER Green è che essendo un intercalante si lega a tutte le molecole di DNA a doppio filamento quindi emette segnale anche quando si lega a dimeri di *primer* oppure a prodotti aspecifici a doppio filamento. Un altro svantaggio del SYBER<sup>TM</sup> Green I è che risulta tossico poiché riesce ad entrare nelle cellule umane in pochi minuti causando mutazioni. In questo studio è stata utilizzata la tecnologia dei fluorescenti "saturanti" utilizzando una molecola fluorescente di nuova generazione nota come EVA Green®. La caratteristica di molecola saturante consiste nell'essere presente in una quantità ben precisa e determinata quindi è in grado di legarsi alle molecole di DNA a doppia elica solo in una certa quantità. Questo evita la distribuzione del segnale di fluorescenza. Inoltre ha maggiore affinità per le molecole di una certa lunghezza e non per i frammenti piccoli quindi ha il vantaggio di non legarsi ai dimeri di primers. Inoltre i fluorescenti saturanti sono meno tossici di quelli non saturanti perché non sono in grado di attraversare le membrane cellulari e di conseguenza non entrano in contatto con il DNA genomico in cellule vive. Il colorante EVA Green® è non mutageno, non citotossico e sicuro per l'ambiente acquatico e quindi può essere utilizzato nelle reazioni di PCR in concentrazioni maggiori, senza che queste vengano inibite, consentendo la saturazione di tutti i siti. Questa saturazione elimina la possibilità che il fluorescente si ridistribuisca durante la melt. Dopo l'amplificazione in PCR inizia l'analisi del melting ad alta risoluzione nota come HRM.

## **Analisi HRM**

L'High Resolution Melting (HRM) analisi è una tecnica di biologia molecolare, post PCR utilizzata per la genotipizzazione, per l'identificazione di mutazioni, di polimorfismi e di differenze epigenetiche in campioni di DNA a doppia elica in base alle diverse temperature di melting degli amplificati. Rispetto alle altre tecnologie di genotipizzazione questa è più precisa, pratica e meno costosa in quanto non necessita di solventi per HPLC o di gel DGGE, viene effettuata nello stesso strumento della Real Time PCR e al termine dell'analisi il prodotto di PCR può essere usato direttamente per il sequenziamento. L'HRM utilizza le elevate temperature per separare il DNA a doppia elica e il controllo di questa temperatura è possibile grazie all'uso di un colorante fluorescente saturante. Il processo infatti consiste semplicemente in un riscaldamento degli amplificati da circa 50°C a circa 95°C con un intervallo di 0.2°C ogni 10 secondi. Ad un certo punto nel corso di questo processo, viene infatti raggiunta una temperatura ben precisa alla quale il 50% delle molecole di DNA sono separate e il 50% delle molecole sono ancora a doppio filamento. Questa temperatura, chiamata temperatura di melting ( $T_m$ ) è specifica per ogni amplificato e dipende sia dal contenuto di basi azotate sia dalla lunghezza. Anche solo un cambiamento di base in un frammento produrrà una differenza nelle temperature di melting dei vari amplificati.

Software di analisi in HRM analizzano la fluorescenza di tutti i campioni e individuano le aree pre-melt (in verde in figura 9) e post-melt (in rosso in figura 9).

I segnali di fluorescenza di tutti i campioni vengono poi normalizzati automaticamente, in modo che il valore di massima fluorescenza sia pari a 100 e che il valore più basso sia pari a 0 (curva di fusione normalizzata standard) eliminando così la fluorescenza di

fondo e aumentando la capacità di rilevare sottili differenze nel profilo di melting (Fig. 10).

Successivamente con la media della fluorescenza di tutti i campioni viene calcolata la curva mediana. Alla curva di fluorescenza di ogni campione viene sottratta questa curva mediana o una curva di riferimento per ottenere la curva specifica per ogni campione (Fig.11).

La diversa  $T_M$  e la diversa forma della curva permettono di definire il genotipo di ogni campione o di individuare le differenze di sequenza. L'ampiezza del picco è proporzionale alla quantità di amplificato.



## SCOPO DELLA RICERCA

L'allevamento dei mitili costituisce nella regione Sardegna un'importante realtà produttiva ed economica. I molluschi bivalvi si nutrono, com'è noto, mediante filtrazione di grandi quantità dell'acqua in cui vivono e sono pertanto in grado di accumulare nei loro tessuti edibili microrganismi potenzialmente patogeni (quali ad es. *Salmonella* spp., vibriani patogeni, *E.coli* patogeni, virus enterici, protozoi di interesse zoonosico), microalghe tossiche produttrici di tossine algali, inquinanti chimici (metalli pesanti, pesticidi, idrocarburi), qualora presenti. Dalla bibliografia consultata emerge un elevato numero di contributi scientifici relativi ai microrganismi potenzialmente patogeni (batteri, virus) e alle tossine di origine algale, mentre risultano ancora limitati gli studi e le ricerche sui protozoi di interesse zoonosico che possono essere veicolati dai molluschi eduli lamellibranchi e trasmessi al consumatore. *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii* sono stati più volte associati ad episodi endemici di malattia causata da acqua e alimenti contaminati anche nei Paesi più avanzati. Alcuni genotipi di questi parassiti risultano comuni agli animali e all'uomo e sono stati isolati in molluschi bivalvi (mitili, vongole, ostriche) allevati in differenti aree marine del mondo, compresa l'Europa e, più recentemente, l'Italia. Da quanto sopra emerge l'importanza per le autorità sanitarie regionali e locali di acquisire conoscenze aggiornate sui livelli di contaminazione dei mitili da protozoi zoonosici, sia per motivi prettamente scientifici che per acquisire elementi oggettivi e scientificamente sostenibili utili ai fini della valutazione del rischio connesso e delle eventuali decisioni da assumere; l'acquisizione di tali dati può altresì costituire un ulteriore parametro sanitario a disposizione dell'autorità sanitaria per la valutazione delle caratteristiche

igienico sanitarie dei MBV destinati al consumo umano diretto, così come previsto dal Reg. CE n. 882/04 nei casi in cui emergono “nuovi” pericoli e sia pertanto necessario procedere alla relativa valutazione del rischio. Il riscontro di questi parassiti nei molluschi bivalvi può assumere infatti un interesse sanitario notevole, soprattutto nell’eventualità che questi prodotti vengano consumati crudi o poco cotti (abitudine, questa, ancora molto diffusa in diverse regioni italiane) se si considera che sono necessarie poche decine di cisti/oocisti perché l’uomo contragga l’infezione e che i trattamenti di depurazione abitualmente utilizzati non riducono significativamente tale rischio. Lo scopo di questa ricerca è stato quello di acquisire dei dati epidemiologici attuali sul livello di contaminazione da *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii* in mitili allevati nella regione Sardegna e sui genotipi presenti, messa a punto e standardizzazione di metodi d’identificazione e caratterizzazione genotipica e contributo alla valutazione del rischio.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra settembre 2013 e marzo 2014, sono stati sottoposti ad indagini molecolari per la ricerca di protozoi dei generi *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma* n. 85 campioni di mitili, di cui 70 appartenenti alla specie *Mytilus galloprovincialis* e 15 alla specie *Mytilus edulis*. I campioni di mitili sono stati prelevati dai Servizi Veterinari territorialmente competenti delle Aziende Sanitarie Locali regionali nell'ambito del Piano Regionale per la vigilanza e il controllo sanitario dei molluschi bivalvi vivi e Monitoraggio delle zone di produzione e stabulazione. In particolare n.72 campioni provenivano da 14 diverse zone di produzione ubicate lungo tutte le coste della Sardegna (fig.2 - Tab.1), n. 2 da zone acquee sottoposte a controlli periodici ai fini della classificazione per la produzione di molluschi bivalvi vivi e n. 11 dal circuito commerciale regionale.

I campioni, opportunamente identificati, sono stati recapitati al laboratorio di analisi dell'IZS Sardegna in condizioni di temperatura controllata (refrigerazione) e analizzati entro 24 ore dal prelievo. In una prima fase i mitili sono stati puliti esternamente, sottoposti a spazzolatura manuale in particolare attorno alla linea di adesione delle due valve e sciacquati con acqua distillata. Prima dell'apertura è stato eliminato il bisso con l'ausilio di forbici. Successivamente gli esemplari di mitili di ciascun campione, dopo essere stati pesati e averne valutata la vitalità, sono stati raggruppati in pool costituiti ciascuno da n. 12 esemplari per un totale di 1.020 esemplari ( 180 *Mytilus edulis* e 840 *Mytilus galloprovincialis*). Da ciascun pool sono state prelevate le branchie e le ghiandole digestive (epatopancreas) a formare due ulteriori pool sottoposti entrambi ad una fase preliminare di preparazione del campione e concentrazione delle (oo)cisti.

### ➤ *Preparazione del campione*

I 170 pools complessivi sono stati sottoposti ad omogenizzazione con acqua distillata (5 ml) mediante l'utilizzo di Ultra-Turrax ® per 10 minuti. Il liquido ottenuto è stato filtrato con un doppio strato di garza sterile e centrifugato a 1000g alla temperatura di 4°C per 10 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato per due volte con TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA, pH 8.0) e centrifugato a 1000g a 4°C per 10 minuti. Una prima aliquota del pellet è stata utilizzata per il test d'immunofluorescenza diretta e una seconda aliquota per le indagini molecolari, previa lisi delle pareti (oo)cistiche.

### ➤ *Immunofluorescenza diretta*

I campioni di branchie e di epatopancreas provenienti dalla totalità dei campioni sono stati sottoposti al test d'immunofluorescenza diretta (IFA) con l'utilizzo di un kit (Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*; Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH, USA) per la ricerca dei protozoi dei generi *Cryptosporidium* e *Giardia*. In una prima fase si è proceduto al prelievo, con l'ausilio di un'ansa sterile, di una quantità di pellet pari a 10 µl, da distribuire nel pozzetto di un vetrino. In ogni vetrino sono stati distribuiti anche un controllo positivo e un controllo negativo per valutare il corretto funzionamento dei reagenti contenuti nel kit e l'eventuale presenza di contaminanti. Dopo aver lasciato asciugare il vetrino per 30 minuti a temperatura ambiente in ogni pozzetto è stata inserita una goccia di anticorpo primario marcato e una goccia di colorante di contrasto. Per permettere all'anticorpo di legarsi all'antigene eventualmente presente il vetrino è stato messo ad incubare per 30 minuti in camera buia e umida, a temperatura ambiente. Successivamente sono stati effettuati diversi lavaggi per rimuovere eventuali aspecifici ed è stato montato il vetrino coprioggetto. I vetrini così

preparati sono stati osservati al microscopio a fluorescenza. Le oocisti di *Cryptosporidium* sono di forma rotondeggiante oppure leggermente ovale ed hanno un diametro di 2-6  $\mu\text{m}$ . La parete delle oocisti appare di color verde mela brillante. Le cisti di *Giardia* sono ovali, con un diametro di 8-12  $\mu\text{m}$ , sono quindi più grandi delle oocisti di *Cryptosporidium*. La parete delle cisti appare di colore verde mela brillante. Il materiale di sfondo acquisisce la colorazione di contrasto arancione opaco o rosso. Si considera positivo per *Cryptosporidium/Giardia* ogni campione che presenta una o più oocisti/cisti con colore verde mela brillante e morfologia caratteristica.

## **Tecniche molecolari**

### **➤ *Lisi della parete (oo)cistica***

Da ciascun pool sono stati prelevati 500  $\mu\text{l}$  del pellet ottenuto precedentemente, successivamente il pellet è stato sottoposto per due volte al lavaggio con TE buffer e successiva centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti. Al fine di effettuare la rottura della parete delle cisti/oocisti eventualmente presenti, il pellet è stato sottoposto ad un trattamento termico (tre cicli di congelamento/scongelo a  $-80^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti,  $80^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti).

### **➤ *Estrazione del DNA***

Il pellet proveniente da ciascun pool di branchie ed epatopancreas è stato poi sottoposto ad estrazione del DNA genomico utilizzando il DNeasy®Blood & Tissue kit (Qiagen, Germania). Il kit si basa sull'utilizzo di specifiche colonnine senza l'ausilio del fenolo-cloroformio. Il DNA si lega specificamente alla membrana di silice della colonnina mentre i contaminanti vengono eliminati. Gli inibenti di PCR, come cationi bivalenti e

proteine, vengono eliminati con dei lavaggi specifici così da ottenere un DNA puro che può essere utilizzato sia per PCR “classica” che per Real Time PCR.

Al pellet sono stati aggiunti 180 µl di ATL Buffer e 20 µl di Proteinasi K; si è quindi proceduto ad incubazione over-night a 55°C con leggera agitazione. Dopo aver centrifugato a 13000 rpm per 3 minuti ed aver eliminato il sovrnatante, al pellet sono stati aggiunti 180 µl di AL Buffer. Questo è stato poi incubato a 70°C per 10 minuti. Dopo incubazione sono stati aggiunti 240 µl di etanolo assoluto e tutto il campione è stato trasferito nell'apposita colonnina con membrana in silice che è stata poi sottoposta a centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto. Dopo aver sostituito il porta colonnina si è proceduto con l'aggiunta di 500 µl di Buffer AW1 e successiva centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto. Successivamente sono stati aggiunti 500 µl di Buffer AW2 ed è stata effettuata un'ulteriore centrifugazione a 13000 rpm per 3 minuti ed ad un minuto alla massima velocità. Il DNA così ottenuto è stato poi eluito con 100 µl di AE Buffer, dopo aver trasferito la colonnina in eppendorf ed aver centrifugato a 8000 rpm per 1 minuto. Il DNA estratto è stato conservato a -20°C.

## **Indagini molecolari**

Il DNA genomico è stato poi utilizzato, stoccato come template nelle reazioni di Nested PCR e Real Time PCR per la ricerca dei generi *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma*.

➤ ***Nested PCR***

Tutte le reazioni di Nested PCR sono state eseguite nel termociclatore *Thermo Hybaid* (EuroClone, Italia)

***Nested PCR per il gene COWP di Cryptosporidium***

Per l'amplificazione del gene *COWP* che codifica per una proteina della parete dell'oociste di *Cryptosporidium* è stata effettuata una Nested PCR come descritto da Jae-Ran Yu e autori (303) utilizzando i seguenti primers ( Applied Biosystems, Life Technologies)

Cry-15 : 5' GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G 3'

Cry-9 : 5' GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G 3'

La miscela di reazione contiene Buffer 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl ), 5 mM MgCl<sub>2</sub> , 0.8 mM dNTPs, 0.5 mM di ciascun primer e 0.06 U/μl di *Taq-Gold* (Roche-Boehringer, Mannheim, Germany) e 1 μl di DNA, in un volume totale di 25 μl.

Il programma di amplificazione è stato il seguente:

- denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti
- 45 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 30 secondi, *annealing* a 52°C per 30 secondi, estensione a 72°C per 50 secondi
- un ciclo di estensione finale a 72°C per 5 minuti.

L'amplificazione ha consentito di ottenere un frammento di 550 pb del gene *COWP*, e visualizzato dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (Invitrogen, Life Technologies).

Per la seconda amplificazione sono stati utilizzati *primers* più interni:

Cowpnest- F1: 5' TGT GTT CAA TCA GAC ACA GC 3'

Cowpnest- R2: 5' TCT GTA TAT CCT GGT GGG 3'

La miscela di reazione contiene Buffer 1X (20 mM Tris-HCl , pH 8.4; 50 mM KCl), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> , 0.8 mM dNTPs, 0.5 µM di ciascun primers e 0.08 U/µl di *Taq-Gold* (Roche-Boehringer, Mannheim, Germany) e 1 µl di DNA in un volume totale di 25 µl.

Il programma di amplificazione utilizzato è stato così impostato:

- denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti
- 32 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 30 secondi, *annealing* a 60°C per 30 secondi, estensione a 72°C per 50 secondi
- un ciclo di estensione finale a 72°C per 10 minuti.

L'amplificazione ha consentito di ottenere un frammento di 311 pb del gene COWP e visualizzato dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (Invitrogen, Life Technologies).

#### ***Nested PCR per il gene Gp60 di Cryptosporidium***

Per l'amplificazione del gene *gp60* di *Cryptosporidium* è stata effettuata una Nested PCR come descritto da Sulaiman et al (127), utilizzando i seguenti primers:

AL3531: 5' ATA GTC TCC GCT GTA TTC 3'

AL3533: 5' GAG ATA TAT CTT GGT GCG 3'

( Applied Biosystems, Life Technologies)

La miscela di reazione di 25 µl contiene buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8.3, KCl 100 mM), la polimerasi termostabile (0.06 U/ µl), i dNTPs (0.4 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM) (REDTaq ®Ready Mix™ PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 pmol di ogni primer e 100 ng di DNA. In ogni reazione è stato aggiunto un controllo positivo e uno negativo.



L'amplificazione ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 3 minuti, successivi 35 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 45 secondi, *annealing* a 50°C per 45 secondi, estensione a 72°C per 1 minuto ed un ciclo di estensione finale a 72°C per 4 minuti.

L'amplificazione ha consentito di ottenere un frammento di circa 400 pb visualizzato dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (Invitrogen, Life Technologies).

Per la seconda reazione di amplificazione sono stati utilizzati dei *primers* più interni:

AL3532: 5' TCC GCT GTA TTC TCA GCC 3'

LX0029: 5' CGA ACC ACA TTA CAA ATG AAG T 3'

( Applied Biosystems, Life Technologies)

La miscela di reazione di 25 µl contiene buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8.3, KCl 100 mM), la polimerasi termostabile (0.06 U/ µl), i dNTPs (0.4 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM) (REDTaq ®Ready Mix™ PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 pmol di ogni primer e 100 ng di amplificato della prima PCR.

L'amplificazione ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 3 minuti, successivi 35 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 45 secondi, *annealing* a 51°C per 45 secondi, estensione a 72°C per 1 minuto ed un ciclo di estensione finale a 72°C per 4 minuti.

L'amplificazione ha consentito di ottenere un frammento di circa 358 pb visualizzato dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (Invitrogen, Life Technologies).

### ***PCR per il gene gdh di Giardia***

Un protocollo di PCR è stato utilizzato per amplificare un frammento di 432 pb del gene GDH che codifica per la *glutammato deidrogenasi* utilizzando i primers descritti da Read e autori (214)

GDHiF: 5' CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG 3'

GDHiR: 5' GTT RTC CTT GCA CAT CTC C 3'

( Applied Biosystems, Life Technologies)

La miscela di reazione di 25 µl contiene buffer 1X, 1.5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM di dNTPs, 0.5 µM di ogni primer, 0.08 U/ µl di Taq polimerasi e 1 µl di DNA.

Il programma di amplificazione ha previsto:

- un ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 3 minuti
- 2 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 2 minuti, *annealing* a 56°C per 1 minuti, estensione a 72°C per 2 minuti
- 55 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 30 secondi, *annealing* a 56°C per 20 secondi, estensione a 72°C per 45 secondi
- un ciclo di estensione finale a 72°C per 7 minuti.

L'amplificazione ha consentito di ottenere un frammento di 432 pb visualizzato dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (Invitrogen, Life Technologies).

### ***Nested PCR per il gene Tpi di Giardia***

Un protocollo di Nested PCR è stato utilizzato per amplificare un frammento del gene TPI che codifica per la *Triosofosfato Isomerasi* utilizzando i primers descritti da Sulaiman e autori (223).

AL3543: 5' AAA TTA TGC CTG CTC GTC G 3'

AL3546: 5' CAA ACC TTT TCC GCA AAC C 3'

( Applied Biosystems, Life Technologies)

La miscela di reazione di 25 µl contiene buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8.3, KCl 100 mM), la polimerasi termostabile (0.06 U/ µl), i dNTPs (0.4 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM)(REDTaq®Ready Mix™ PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, St. Louis ,MO), 100 pmol di ogni primer e 100 ng di DNA. In ogni reazione è stato aggiunto un controllo positivo e uno negativo.

L'amplificazione ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, successivi 35 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 45 secondi, *annealing* a 50°C per 45 secondi, estensione a 72°C per 1 minuto ed un ciclo di estensione finale a 72°C per 10 minuti.

L'amplificazione ha consentito di ottenere un frammento di circa 605 pb visualizzato dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (Invitrogen, Life Technologies).

Per la seconda amplificazione sono stati utilizzati dei *primers* più interni identificati come AL3544 e AL3545.

AL3544: 5' CCC TTC ATC GGT GGT AAC TT 3'

AL3545: 5' GTG GCC ACC ACT CCC GTG CC 3'

( Applied Biosystems, Life Technologies)

La miscela di reazione di 25 µl contiene buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8.3, KCl 100 mM), la polimerasi termostabile (0.06 U/ µl), i dNTPs (0.4 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM) (REDTaq®Ready Mix™ PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 pmol di ogni primer e 100 ng di amplificato della prima PCR.

L'amplificazione ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, successivi 35 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 45 secondi,

*annealing* a 55°C per 30 secondi, estensione a 72°C per 1 minuto ed un ciclo di estensione finale a 72°C per 10 minuti.

L'amplificazione ha consentito di ottenere un frammento di circa 530 pb visualizzato dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1% (Invitrogen, Life Technologies).

### ***Infezione sperimentale***

Nella fase iniziale del lavoro, si è proceduto ad infettare sperimentalmente branchie ed epatopancreas prelevati da un campione di *Mytilus galloprovincialis* del commercio con un aliquota contenente 1 µl di oocisti concentrate di *Cryptosporidium* provenienti da un campione di feci bovine contaminate e con cisti concentrate di *Giardia* provenienti da feci feline. Sui campioni di mitili infettati sperimentalmente è stata effettuata la ricerca di oocisti/cisti protozoarie mediante l'utilizzo delle tecniche di immunofluorescenza diretta e Nested PCR allo scopo di mettere a punto il protocollo di preparazione del campione, immunofluorescenza diretta, estrazione dell'acido nucleico e amplificazione mediante PCR.

### **➤ Real Time PCR**

Tutte le reazioni di Real Time PCR sono state eseguite nello strumento per Real Time PCR CFX-96 (BioRad, Italia).

### ***Real Time PCR per l'identificazione di Cryptosporidium***

Per l'amplificazione del gene *COWP* che codifica per una proteina della parete dell'oociste di *Cryptosporidium* è stata effettuata una Real Time PCR utilizzando i primers descritti da Traversa e autori (126) chiamati CRY9D e CRYINT2D

CRY9D: 5' GGA CKG AAA TRC AGG CAT TAT CYT G 3'

CRYINT2D: 5' TTT GTT GAA GAR GGA AAT AGA TGT G 3'

La mix di reazione con un volume finale di 20 µl contiene 4 µl di DNA genomico, 5X EvaGreen®Reagent (BioRad, Italy) e una concentrazione finale di 0.5 µM di ciascun primers.

Il protocollo di amplificazione ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 98°C per 2 minuti, successivi 45 cicli con una temperatura di denaturazione di 98°C per 5 secondi, *annealing* a 50.4°C per 30 secondi, estensione a 70°C per 1 minuto.

### ***Real time PCR per l'identificazione di Giardia***

Per l'amplificazione del gene della *β-giardina* è stata effettuata una Real Time PCR utilizzando i primers descritti da Mahbubani e autori (304) chiamati GGL e GGR:

GGL: 5' AAG TGC GTC AAC GAG CAG CT 3'

GGR: 5' TTA GTG CTT TGT GAC CAT CGA 3'

La mix di reazione con un volume finale di 20 µl contiene 4 µl di DNA genomico, 5X EvaGreen®Reagent (BioRad, Italy) e una concentrazione finale di 0.5 µM di ciascun primers.

L'amplificazione ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 98°C per 2 minuti, successivi 45 cicli con una temperatura di denaturazione di 98°C per 5 secondi, *annealing* a 55.6°C per 30 secondi, estensione a 70°C per 1 minuto.

### ***Real time PCR per l'identificazione di Toxoplasma***

Per l'amplificazione del gene B1 di *Toxoplasma gondii* è stata effettuata una Real Time PCR utilizzando i primers descritti da Arkush e autori (275) chiamati ToxB-41f e ToxB-169r:

ToxB-41f: 5' TCG AAG CTG AGA TGC TCA AAG TC 3'

ToxB-168R: 5' AAT CCA CGT CTG GGA AGA ACT C 3'

La mix di reazione con un volume finale di 20 µl contiene 5 µl di DNA genomico, 5X EvaGreen®Reagent (BioRad, Italy) e 10 µM di ciascun primer.

L'amplificazione ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 98°C per 2 minuti, successivi 45 cicli con una temperatura di denaturazione di 98°C per 5 secondi, *annealing* a 62°C per 30 secondi, estensione a 95°C per 60 secondi e a 70°C per 60 secondi.

#### **➤ Analisi HRM**

L'analisi di melting ha previsto un incremento della temperatura da 70°C a 95°C a intervalli di 0.2°C ogni 10 secondi per ciascun patogeno e ciascuna Real- Time PCR. Nella prima fase di analisi, i dati grezzi sono stati normalizzati in modo che il valore di fluorescenza massima sia pari a 100 e la più bassa sia pari a 0 (curva di fusione normalizzata standard). Successivamente, le curve sono state differenziate ed è stata fatta una curva mediana usando il valore medio ottenuto dai valori di fluorescenza di tutti i campioni. La curva di ogni campione è stata sottratta alla curva mediana per ottenere il grafico della differenza. Le differenze nella forma della curva di fusione e i punti di *Tm* sono stati utilizzati per attribuire la positività dei campioni alle varie specie.

## ***Sequenziamento***

Tutti i campioni positivi per *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum* e *Toxoplasma gondii*, determinati tramite la Real Time PCR e l'analisi in HRM, sono stati purificati con gli enzimi esonucleasi I (EXO I) e fosfatasi alcalina (FAST AP) termosensibile (*Fermentas*). I prodotti di PCR sono stati sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando il kit ABI PRISM *Byg Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* con gli stessi primer utilizzati nelle rispettive reazioni di PCR, secondo le istruzioni del produttore. Le sequenze sono state corse nello strumento ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer (Applied biosystems)*. Tutte le sequenze ottenute sono state confrontate con sequenze di riferimento presenti in *GenBank* appartenenti a *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum* e *Toxoplasma gondii* attraverso il programma *Blastn software* (305).

## RISULTATI

Come in precedenza specificato, i campioni sono stati analizzati con le tecniche di immunofluorescenza per la ricerca di *Cryptosporidium* e *Giardia* e con tecniche biomolecolari per la ricerca di *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma gondii*.

### ***Immunofluorescenza***

Nella fase preliminare del lavoro, sono stati sottoposti ad osservazione con microscopio a fluorescenza i pool di branchie e epatopancreas provenienti dal campione di mitili infettato sperimentalmente. In entrambi i casi è stato possibile visualizzare le formazioni (oo)cistiche di *Cryptosporidium* e *Giardia duodenalis*, verificando nel contempo l'integrità delle strutture in esse presenti.

La totalità dei pool di branchie e di epatopancreas analizzati provenienti dai campioni di mitili prelevati sia nell'ambito del piano di monitoraggio che del controllo ufficiale e osservati con il microscopio a fluorescenza, non ci ha consentito di visualizzare formazioni che, per morfologia, struttura e positività alla fluorescenza potessero essere attribuite con certezza ai protozoi in esame (Fig.13).

### **Nested PCR del gene COWP di *Cryptosporidium*:**

Nessun campione visualizzato, dopo l'elettroforesi su gel di agarosio, ha mostrato la caratteristica banda di 550 pb corrispondente alla prima reazione di amplificazione e la banda di 311 pb corrispondente alla seconda reazione di amplificazione. Il controllo positivo dimostra l'avvenuta amplificazione (Fig.14).



### ***Nested PCR del gene gp60 di Cryptosporidium***

Nessun campione visualizzato, dopo l'elettroforesi su gel di agarosio, ha mostrato la caratteristica banda di 400 pb corrispondente alla prima reazione di amplificazione e la banda di 358 pb corrispondente alla seconda reazione di amplificazione. Il controllo positivo dimostra l'avvenuta amplificazione (Fig.15).

### ***PCR del gene gdh di Giardia***

Nessun campione visualizzato dopo l'elettroforesi su gel di agarosio, ha mostrato la caratteristica banda di 432 pb. Il controllo positivo rappresentato da DNA estratto da *Giardia duodenalis* ci ha permesso di monitorare l'efficienza della reazione. (Fig.16).

### ***Nested PCR del gene Tpi di Giardia***

Nessun campione visualizzato, dopo l'elettroforesi su gel di agarosio, ha mostrato la caratteristica banda di 605 pb corrispondente alla prima amplificazione e di 530 bp corrispondente alla seconda amplificazione. Il controllo positivo rappresentato da DNA estratto da *Giardia duodenalis* ci ha permesso di monitorare l'efficienza della reazione. (Fig.17).

### **Real Time PCR**

Tutti i campioni (n. 85), per un totale di 1.020 esemplari (180 *Mytilus edulis* e 840 *Mytilus galloprovincialis*) appartenenti a 170 pool, 85 di branchie e 85 di epatopancreas sono stati sottoposti a Real Time PCR per la ricerca dei protozoi dei generi *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma*.

### ***Real Time PCR per il gene COWP di Cryptosporidium***

Sono risultati positivi alla Real Time PCR per *Cryptosporidium parvum* complessivamente n. 11 campioni di mitili (12,94%), per un totale di 132 esemplari, tutti appartenenti alla specie *Mytilus galloprovincialis*. Degli 11 campioni positivi, n. 8 (72,2%) sono stati prelevati in allevamento, nell'ambito delle attività di monitoraggio e n. 3 (27,2%) provenivano dal circuito commerciale (Tab.2). Relativamente ai pool di branchie ed epatopancreas analizzati, sono risultati positivi in tutto n. 11 pool (6,4%); di cui 5 branchie (5,8%) e 6 di epatopancreas (7%) (Tab.5). Nell'ambito degli 11 pool positivi, 3 provenivano da campioni prelevati nel circuito commerciale Regionale, nell'ambito delle attività di controllo ufficiale (13,6%) e 8 in allevamento, nell'ambito delle attività di monitoraggio (5,5%) (Tab.3). Questi ultimi provenivano da 6 diverse zone di produzione (42,8%): in particolare 1 dal nord-est della Sardegna, 3 dal centro-est, 2 dal sud-est e dal 2 centro-ovest dell'Isola (Tab.4). In nessun campione è stata riscontrata la contemporanea presenza di *Cryptosporidium* nel pool di branchie e di epatopancreas (Fig. 18 -19-20).

### ***Real Time PCR per il gene $\beta$ -giardina di Giardia***

Il numero di campioni di mitili positivi al test Real Time PCR è risultato complessivamente pari a 7 (8,2%), per un totale di 84 esemplari, tutti della specie *Mytilus galloprovincialis*. Dei 7 campioni positivi, n.4 (57,1%) sono stati prelevati in allevamento, n. 3 (42,85%) nell'ambito del circuito commerciale regionale (Tab.2).

Per quanto riguarda i pool di tessuti esaminati, sono risultati positivi alla Real Time PCR per *Giardia* n. 8 pool (4,7%); di cui 4 di branchie (2,3%) e 4 di epatopancreas (2,3%) (Tab.5). Degli 8 pool positivi, n. 3 provenivano da campioni di mitili prelevati

nell'ambito delle attività di controllo ufficiale (13,6%), nel circuito commerciale e n. 5 nell'ambito delle attività di monitoraggio, presso gli allevamenti (3,4%) (Tab.3). Questi ultimi provenivano da 2 diverse zone di produzione (14,2%): quattro dal nord-est della Sardegna e 1 dal sud (Tab.4). Per un campione è stata riscontrata la presenza di *Giardia* nei pool ottenuti dalle due tipologie di tessuto (Fig. 21-22-23).

### ***Real Time PCR per il gene B1 di Toxoplasma***

Sono risultati positivi alla Real Time PCR per *Toxoplasma gondii* complessivamente 12 campioni di mitili (14,11%), per un totale di 144 esemplari tutti appartenenti alla specie *Mytilus galloprovincialis*. Dei 12 campioni positivi, n.8 (66,6%) sono stati prelevati in allevamento, n.4 (33,3%) nell'ambito del circuito commerciale (Tab.2). Relativamente ai pool di branchie ed epatopancreas analizzati, sono risultati positivi in tutto n. 17 pool (10%); di cui 8 di branchie (9,4%) e 9 di epatopancreas (10,5%) (Tab.5). Dei 17 pool positivi, 6 erano di campioni prelevati nell'ambito delle attività di controllo ufficiale (27,3%) e 11 nell'ambito dei campionamenti per il monitoraggio (7,6%) (Tab.3). Gli 11 pool positivi per *Toxoplasma gondii* provenivano da 5 diverse zone di produzione (35,7%): 4 dal nord-est della Sardegna, 2 dal sud-est e 5 dal centro-ovest (tab.4). Per 5 campioni è stata riscontrata la presenza di *Toxoplasma* contemporaneamente nel pool di branchie e di epatopancreas (Fig. 24-25-26).

### **Sequenziamento**

Il sequenziamento degli amplificati ottenuti dopo Real Time PCR ha confermato l'identità specifica di *Cryptosporidium parvum* (n. 11 pool), *Giardia duodenalis* assemblaggio A (n. 8 pool) e *Toxoplasma gondii* Tipo I (n. 17 pool).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I prodotti alimentari del mare sono ai vertici nella scala di gradimento gastronomico dei consumatori.

Tuttavia, questi stessi prodotti, e in particolare i c.d. “frutti di mare”, costituiscono una classe di alimenti particolarmente delicata sia dal punto di vista organolettico e della conservabilità che sotto il profilo igienico-sanitario potendo, in assenza o carenza di adeguate misure igieniche di prevenzione e di sorveglianza sanitaria, risultare contaminati da microrganismi potenzialmente patogeni (batteri, virus, parassiti trasmissibili all'uomo) e da contaminanti ambientali di varia natura (mercurio, piombo, cadmio, idrocarburi, pesticidi, diossine ecc.).

Dall'analisi dei dati del Sistema Rapido di Allerta degli Alimenti degli ultimi anni emerge infatti che anche i prodotti della filiera della pesca sono stati più volte interessati da provvedimenti di allerta e di sequestro a seguito di accertata presenza di contaminazioni di tipo biologico e chimico, principalmente dovute all'influenza dell'ambiente acquatico.

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e l' ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) hanno reso pubblici, nel febbraio del 2014, i dati relativi alla relazione annuale sulle zoonosi e sui focolai infettivi di origine alimentare nell'Unione europea e dal Report emerge che i prodotti della pesca sono responsabili del 9% delle tossinfezioni alimentari riscontrate nel 2012 nell'ambito dei Paesi UE.

In Sardegna le attività legate alla molluschicoltura sono presenti sin dal primo dopoguerra, quando vennero impiantati i primi allevamenti. Attualmente il comparto della molluschicoltura sarda appare molto consolidato, con allevamenti di mitili

dislocati principalmente nelle province di Oristano, Cagliari, Ogliastra ed Olbia-Tempio.

La presente ricerca è stata condotta allo scopo di acquisire dati epidemiologici aggiornati sull'eventuale presenza di protozoi zoonosici dei generi *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma*, e acquisire elementi utili alla valutazione del rischio sanitario ad essi correlato in mitili allevati nella regione Sardegna.

I risultati del presente studio evidenziano la presenza di cisti/oocisti di *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* e *Toxoplasma gondii* in diversi campioni di mitili allevati e commercializzati nella regione Sardegna.

In particolare, *C.parvum* è stato riscontrato in 11 campioni di mitili prelevati sia in attività di monitoraggio (allevamento) che di vigilanza (circuiti commerciali), rispettivamente in 8 e 3 campioni.

*G.duodenalis* è stata riscontrata in 7 campioni prelevati sia in ambito di monitoraggio che di sorveglianza sanitaria, rispettivamente in 4 e 3 campioni.

*T.gondii* è stato anch'esso rilevato sia in campioni a mare (allevamento) che in campioni presenti nel circuito commerciale, rispettivamente in 8 e 4 campioni.

Il riscontro della presenza di cisti/oocisti rappresenta certamente un rischio potenziale.

Nell'ambito delle tecniche diagnostiche utilizzate (immunofluorescenza e tecniche biomolecolari), solamente la metodica di Real Time PCR si è rivelata in grado di evidenziare la presenza delle cisti/oocisti parassitarie dei protozoi oggetto d'indagine, nei campioni esaminati.

Relativamente alla tecnica di Immunofluorescenza, essa non può essere utilizzata per la ricerca di *T.gondii* a causa della mancanza di anticorpi monoclonali in grado di legarsi in maniera specifica alle proteine della parete oocistica.

Per quanto riguarda l'utilizzo di questa tecnica per la ricerca di *Cryptosporidium* e *Giardia*, la stessa non ha consentito, nei campioni esaminati nel presente lavoro, di discriminare in maniera specifica le cisti/oocisti rispetto ad altre formazioni similari per caratteristiche morfologiche e risposta alla fluorescenza, analogamente a quanto già evidenziato da altri autori (25)(57)(306)(307).

Nell'ambito delle metodologie diagnostiche utilizzate nel presente lavoro, la tecnica di Real Time PCR ha rappresentato, per sensibilità e specificità, la metodica di elezione per la rilevazione e l'identificazione dei protozoi zoonosici testati.

La caratterizzazione genotipica degli isolati ha consentito l'identificazione dei genotipi con attitudine zoonosica (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* Assemblaggio A e *Toxoplasma gondii* Type 1) e il conseguente reale rischio sanitario per il consumatore, come ipotizzato da altri Autori (71).

In studi precedenti, alcuni autori statunitensi hanno evidenziato la presenza di *Cryptosporidium parvum* in mitili delle specie *Mytilus galloprovincialis* e *M. californianus* (79), in ostriche della specie *Crassostrea virginica* e in vongole (18). La presenza di *Giardia duodenalis* Assemblaggio A è stata documentata, invece, solo in campioni di vongole non edibili (*Macoma balthica* e *Macoma mitchelli*).

Per quanto riguarda i molluschi bivalvi prodotti nell'Unione Europea, la presenza di *Cryptosporidium parvum* è stata accertata in campioni di *Mytilus galloprovincialis* allevati in Spagna (78) e *Mytilus edulis* allevati in Francia (80).

Alcuni autori italiani hanno riscontrato la presenza di *Cryptosporidium parvum* e di *Giardia duodenalis* Assemblaggio A in campioni di acqua provenienti da zone di raccolta del Mar Adriatico (57) e in campioni di *Mytilus galloprovincialis* prelevati presso esercizi di vendita al dettaglio della Puglia (6). In particolare, nel nostro Paese è

stata più volte segnalata la presenza di oocisti/cisti di *Cryptosporidium parvum* e di *Giardia duodenalis* Assemblaggio A nel suolo, in acque di mare, in materiale fecale proveniente da diverse specie di animali da reddito (bovini, bufali e piccoli ruminanti) (111) (113) e da compagnia (106) (110) e di origine umana (101), a dimostrazione del ruolo zoonotico dei suddetti genotipi.

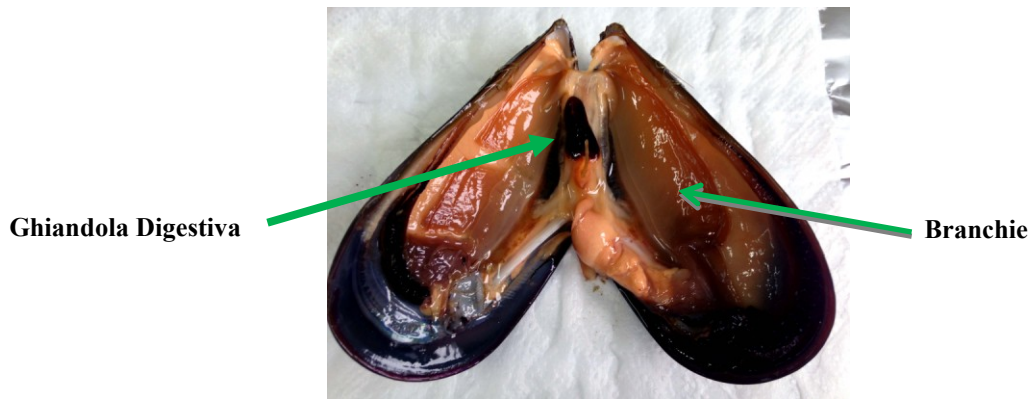
Il presente contributo rappresenta la prima segnalazione di oocisti di *Toxoplasma gondii* Type 1 in campioni di mitili allevati e commercializzati in Italia.

Il riscontro di (oo)cisti protozoarie non solo in campioni di mitili in allevamento, ma anche in campioni immessi nel circuito commerciale, rappresenta di per sé una indicazione, seppure indiretta, della scarsa efficacia dei trattamenti di depurazione attualmente in uso dei molluschi nei confronti di tali organismi e un conseguente potenziale rischio sanitario per la salute umana. Alcuni studi hanno dimostrato la persistenza delle formazioni (oo)cistiche nei molluschi bivalvi anche dopo alcune settimane di depurazione (21)(76).

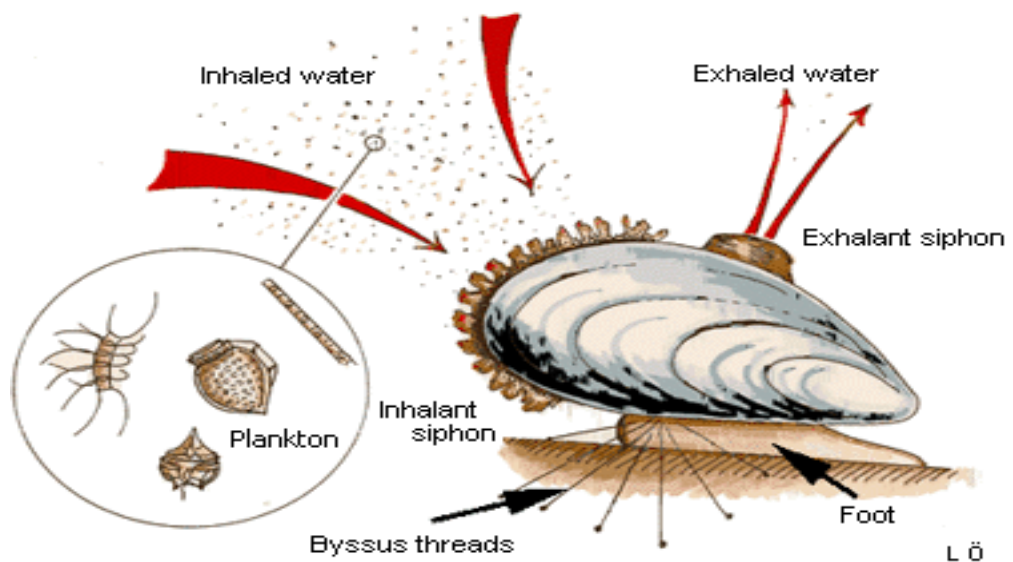
L'utilizzo del solo parametro *E. coli* per la classificazione delle acque di allevamento e l'esiguità del numero e della tipologia di criteri di sicurezza previsti dalla normativa vigente per i molluschi bivalvi destinati al consumo umano diretto rende necessaria una revisione degli stessi criteri con l'inserimento, ad es., di vibrioni patogeni, virus enterici e protozoi zoonosici. Considerata la particolare suscettibilità alle infezioni da *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* da parte di alcune categorie di consumatori (immunodepressi, donne in gravidanza) sarebbe auspicabile un'integrazione della normativa sull'etichettatura di tali prodotti, con particolare riferimento al rischio sanitario conseguente a un inadeguato trattamento di cottura.

# FIGURE





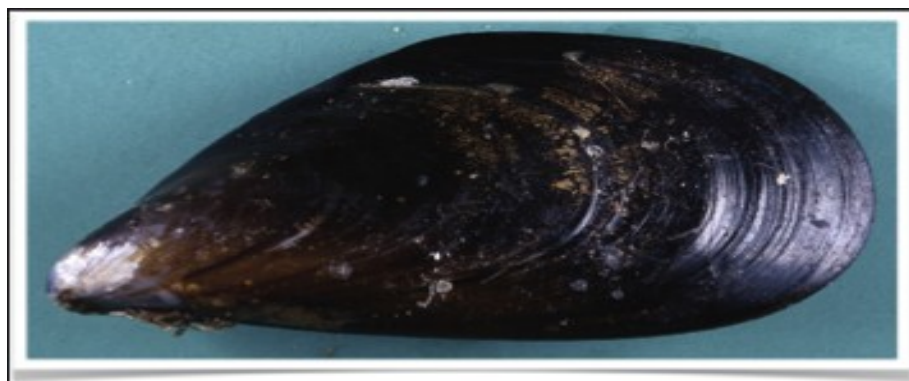
**Fig.1 Anatomia di un esemplare di *Mytilus***



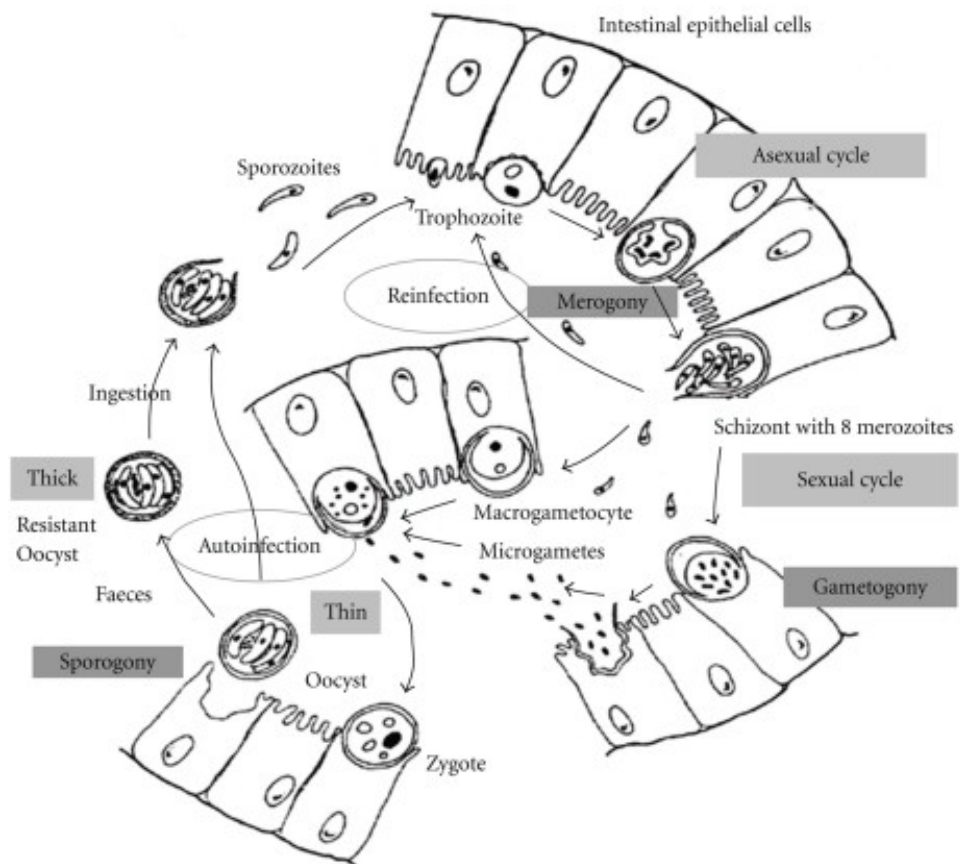
**Fig.2 Respirazione e nutrizione dei molluschi bivalvi**



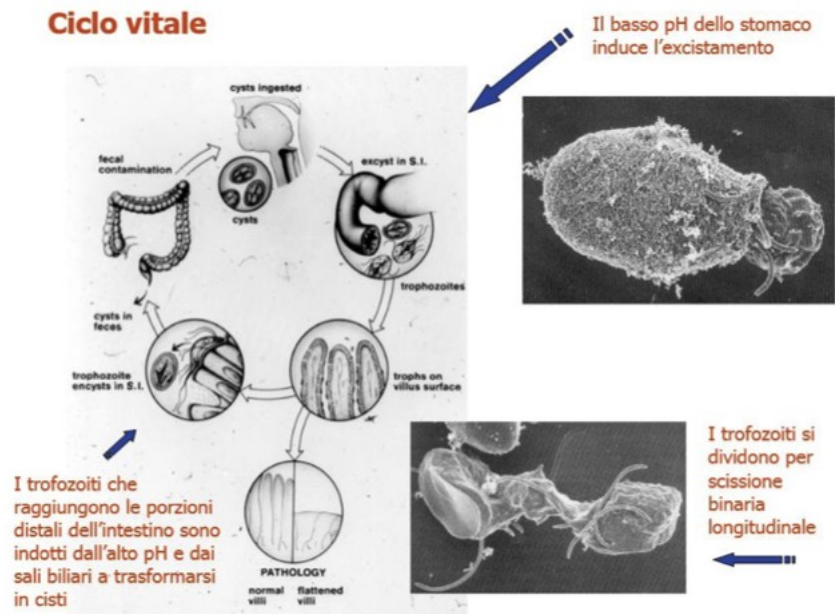
**Fig.3** esemplare di *Mytilus galloprovincialis*



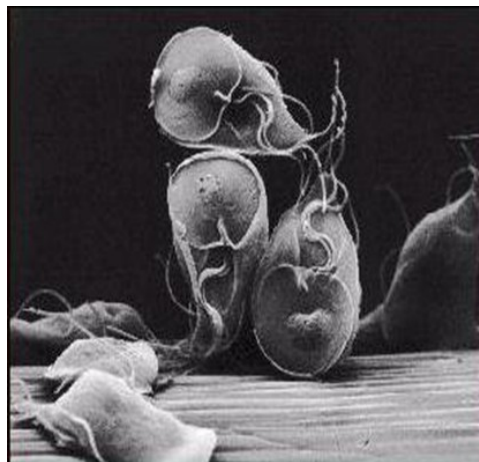
**Fig.4** esemplare di *Mytilus edulis*



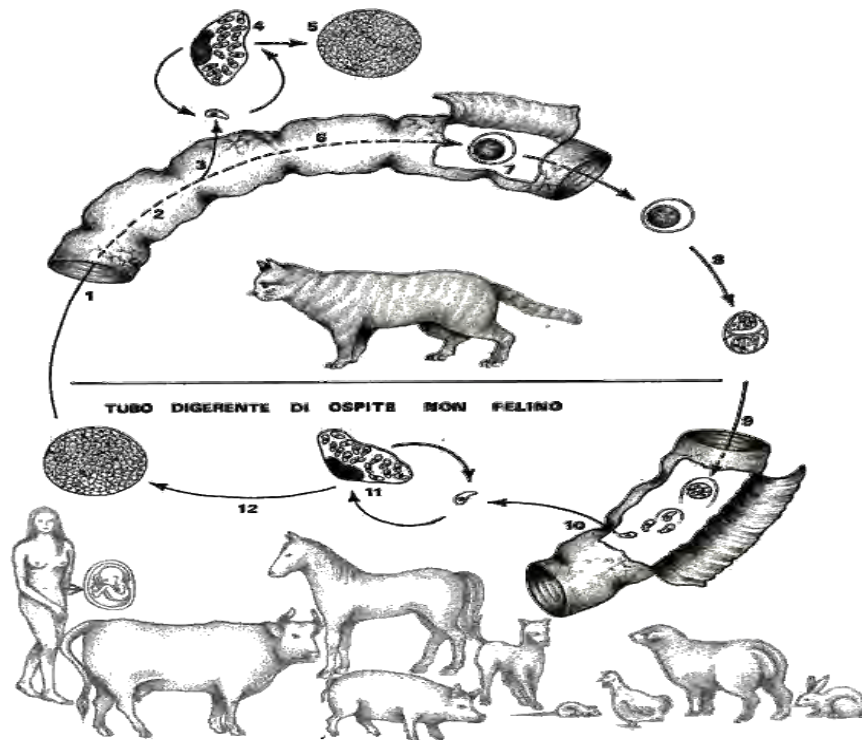
**Fig.5** Ciclo biologico di *Cryptosporidium* spp.



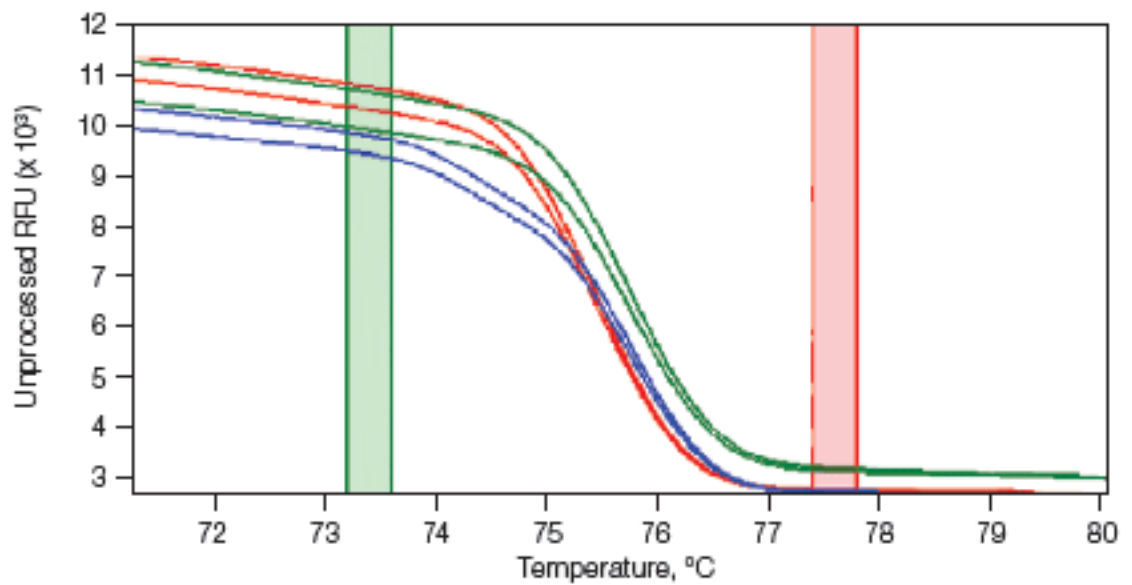
**Fig.6** Ciclo biologico *Giardia duodenalis*



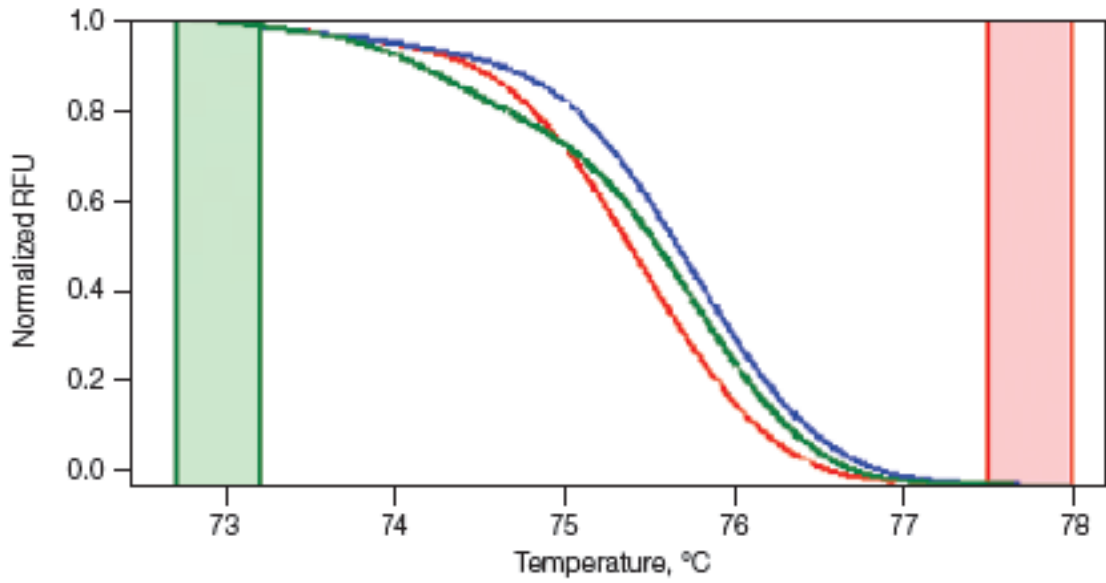
**Fig. 7** Trofoziti di *Giardia duodenalis*



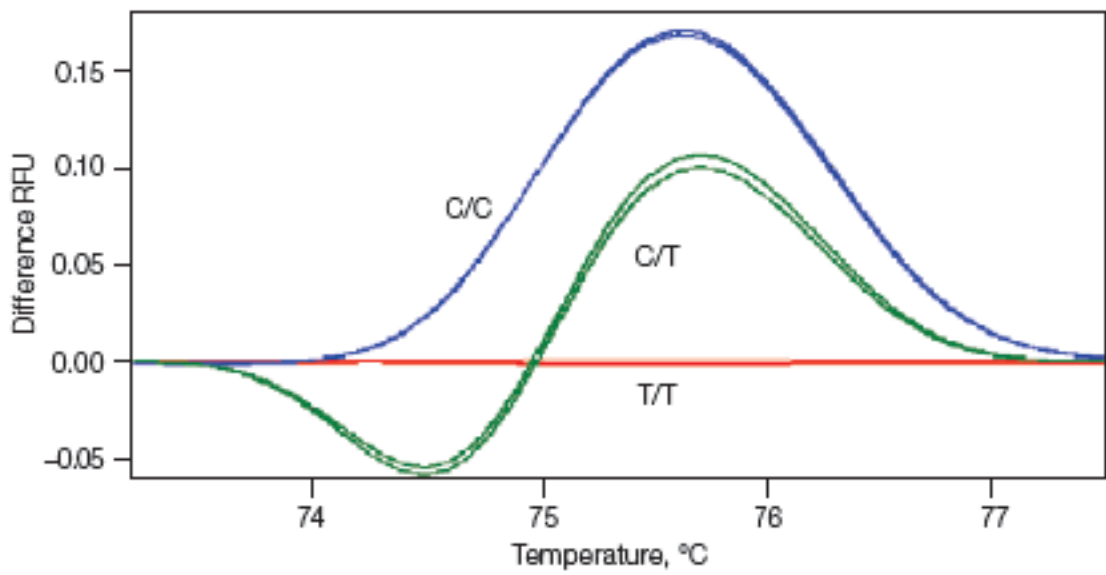
**Fig.8** Ciclo biologico di *Toxoplasma gondii*



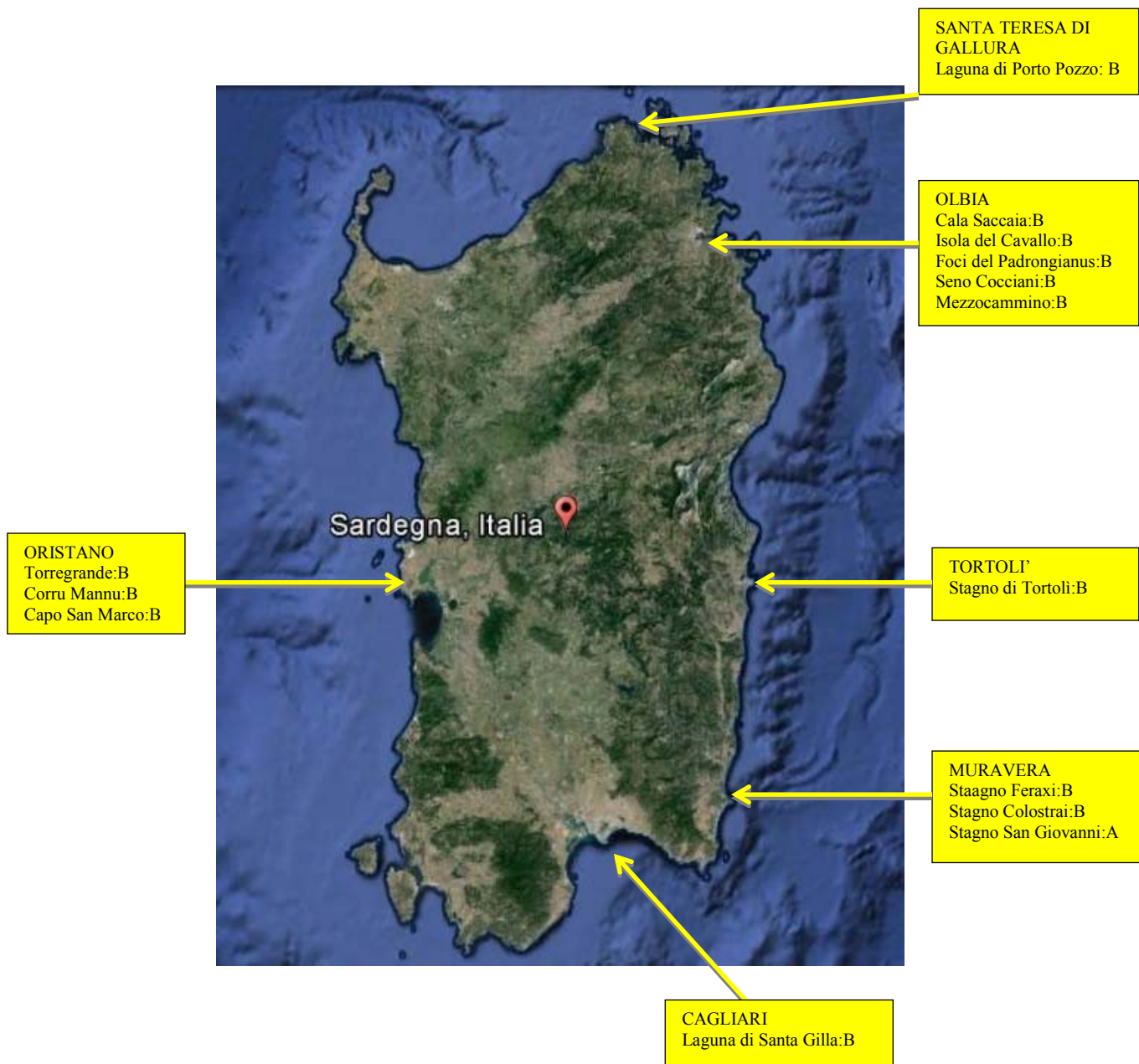
**Fig.9** Curva di Melt



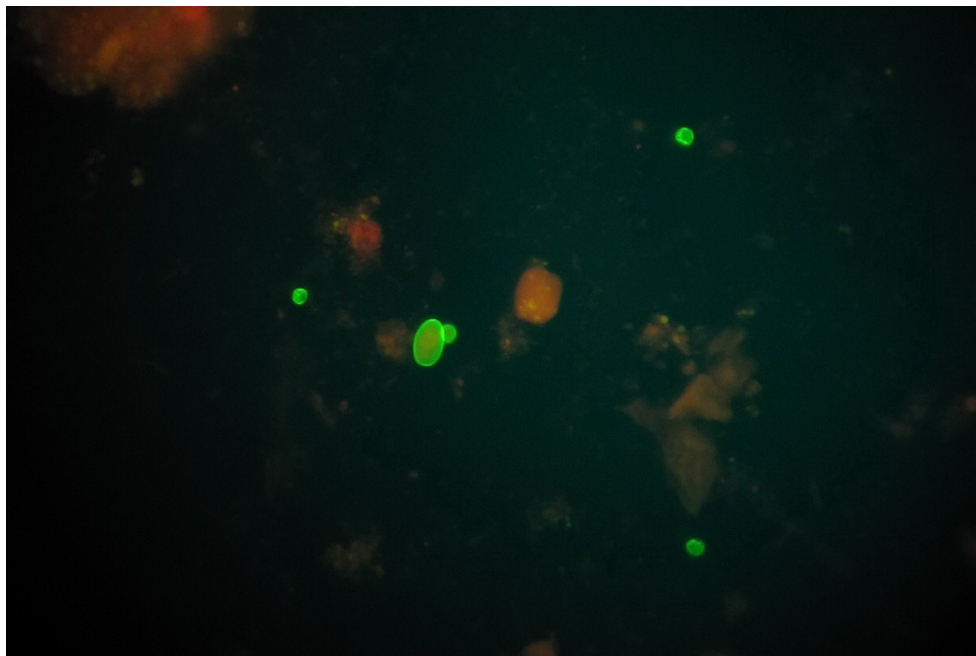
**Fig.10 Curva di Melt normalizzata**



**Fig.11 Curva di Melt delle differenze**



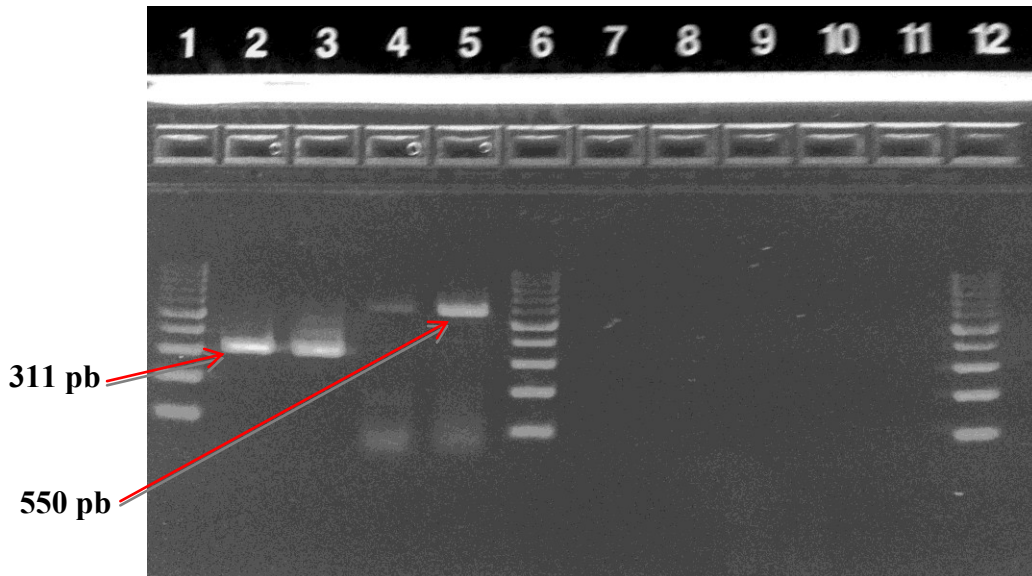
**Fig.12 zone di produzione di mitili prese in analisi nello studio**



**Fig.13 Immunofluorescenza: campione infettato sperimentalmente**

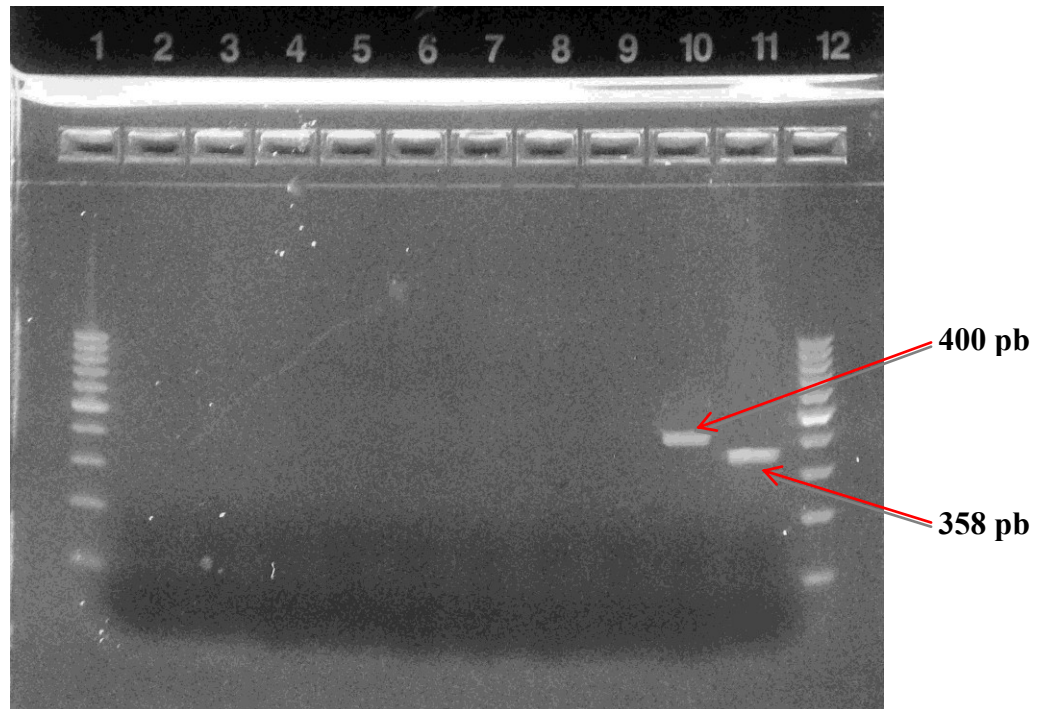


### *Nested PCR del genere Cryptosporidium*



**Fig.14** Prodotti di amplificazione della Nested PCR per il gene COWP

- Line 1-6-12: Molecular weight marker 100 bp**
- Line 2-3: Controllo positivo seconda amplificazione**
- Line 4-5: Controllo positivo prima amplificazione**
- Line 7-10: Campioni negativi**
- Line 11: Controllo negativo**



**Fig.15** Prodotti di amplificazione della Nested PCR per il gene *Gp60*

**Line 1-12: Molecular weight marker 100 bp**

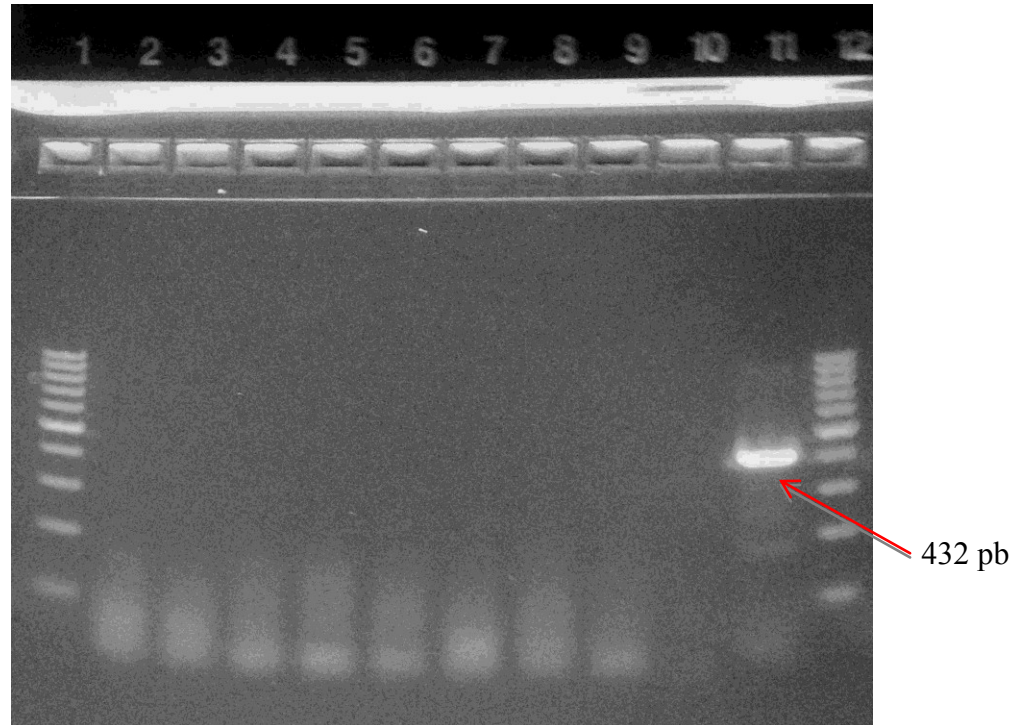
**Line 2: Controllo negativo**

**Line 3-9: Campioni negativi**

**Line 10: Controllo positivo prima amplificazione**

**Line 11: Controllo positivo seconda amplificazione**

### *PCR e Nested PCR del genere Giardia*



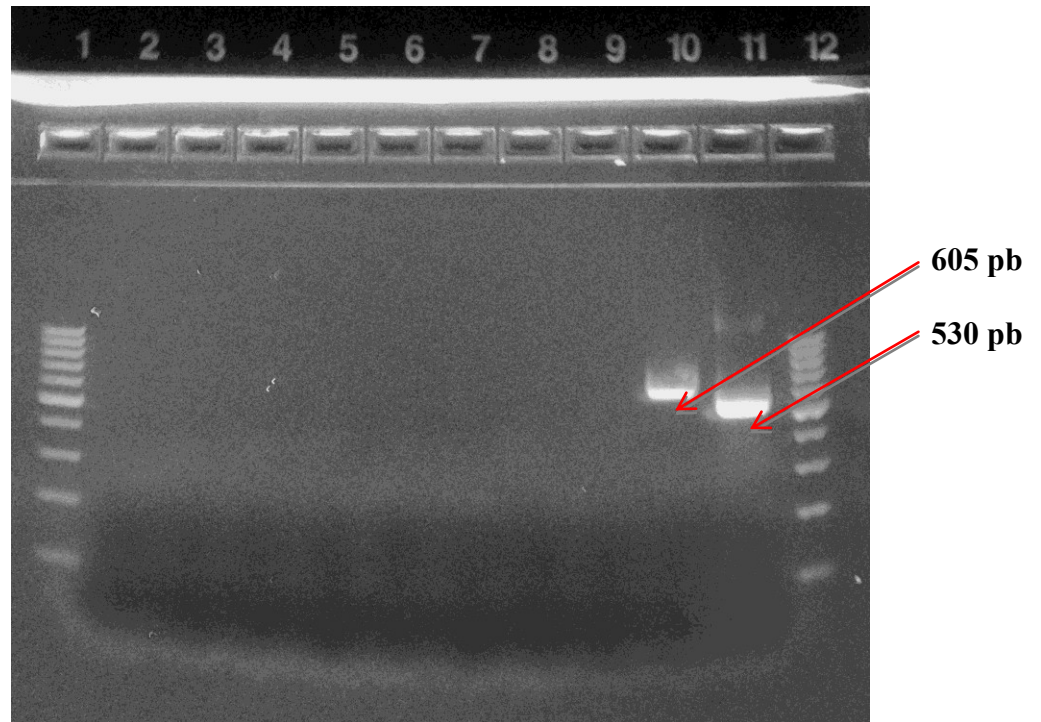
**Fig.16 Prodotti di amplificazione della PCR per il gene *gdh***

**Line 1-12: Molecular weight marker 100 bp**

**Line 2: Controllo negativo**

**Line 3-10: Campioni negativi**

**Line 11: Controllo positivo**



**Fig. 17 Prodotti di amplificazione della Nested PCR per il gene *Tpi***

**Line 1-12: Molecular weight marker 100 bp**

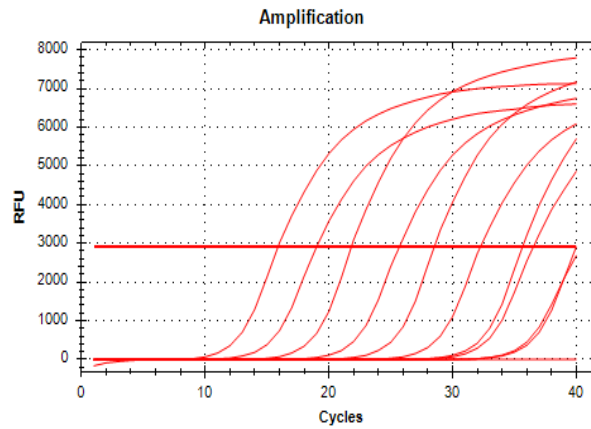
**Line 2: Controllo negativo**

**Line 3-9: Campioni negativi**

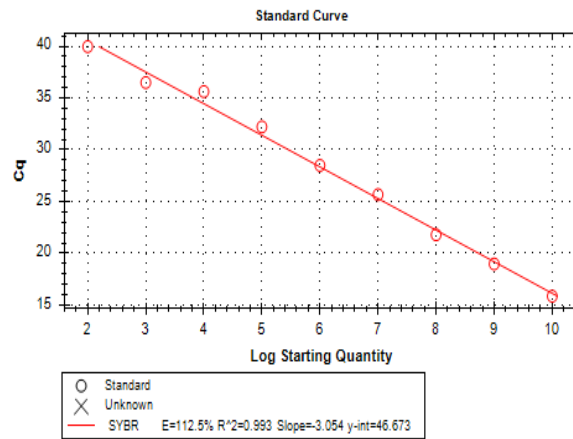
**Line 10: Controllo positivo prima amplificazione**

**Line 11: Controllo positivo seconda amplificazione**

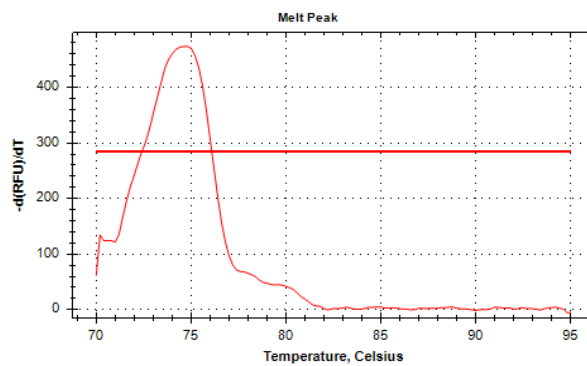
## Real Time PCR di *Cryptosporidium*



**Fig.18** curva di amplificazione

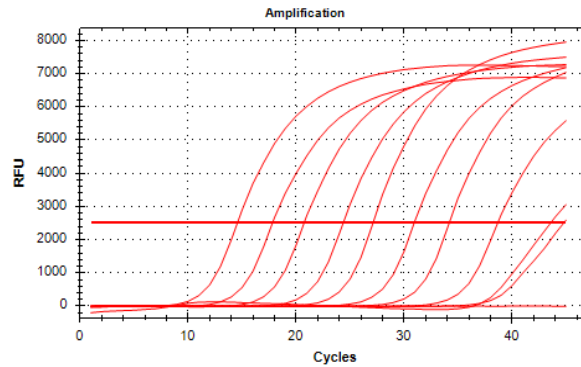


**Fig.19** curva standard

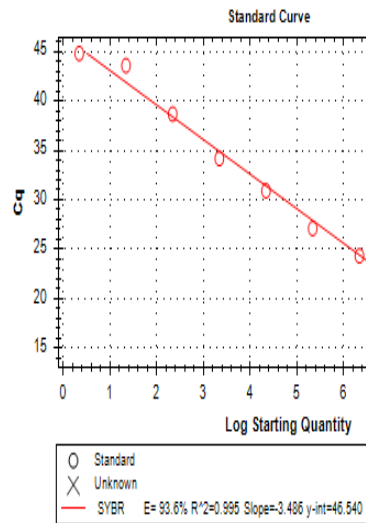


**Fig.20** analisi di melting

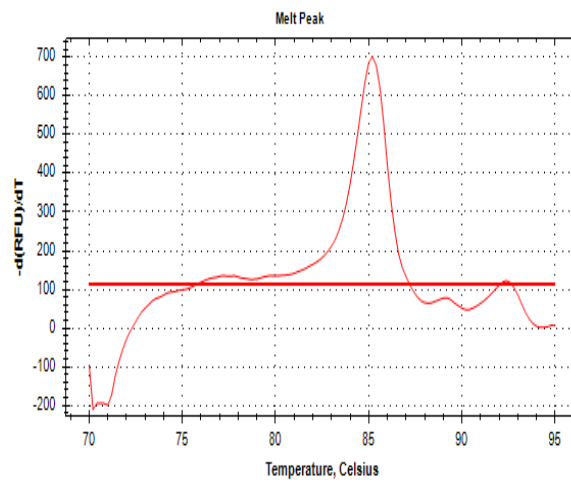
## Real Time PCR di Giardia



**Fig.21** curva di amplificazione



**Fig.22** curva standard



**Fig.23** analisi di melting

## Real Time PCR di *Toxoplasma*

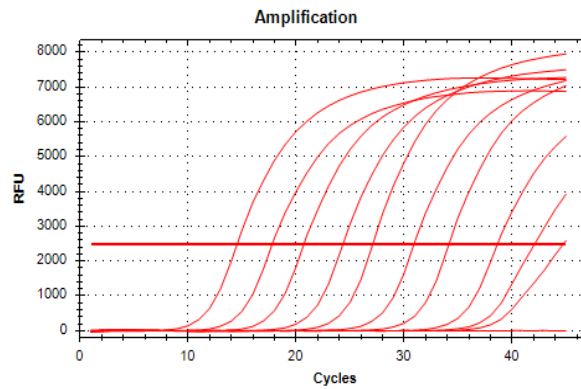


Fig.24 curva di amplificazione

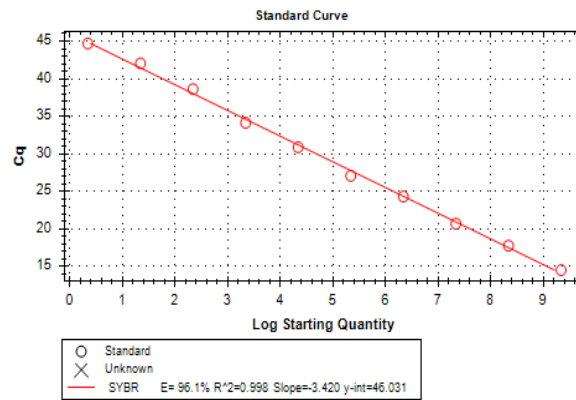


Fig.25 curva standard

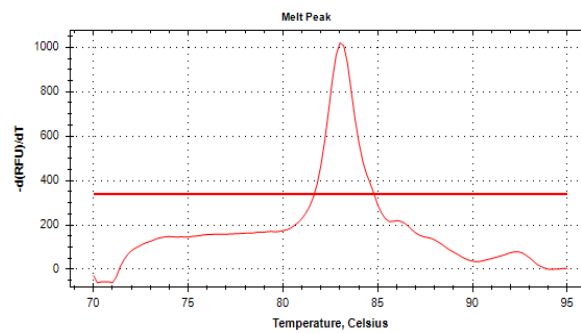


Fig.26 analisi di melting

# TABELLE



**Tabella 1** Localizzazione geografica delle zone di produzione dei mitili

<b>N. campioni</b>	<b>Localizzazione</b>	<b>Zone di produzione</b>
<b>22</b>	<b>Nord – Est</b>	Laguna di Porto Pozzo
		Cala Saccaia
		Isola del Cavallo
		Foci del Padrongianus
		Seno Cocciani
<b>8</b>	<b>Centro – Est</b>	Mezzocammino
		Stagno di Tortoli
		Stagno Feraxi
		Stagno Colostrai
<b>23</b>	<b>Sud – Est</b>	Stagno S. Giovanni
		Laguna di S. Gilla
<b>11</b>	<b>Centro - Ovest</b>	Torregrande
		Corru Mannu
		Capo S. Marco

**Tabella 2.** Campioni positivi al test Real Time PCR per *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii* in relazione alla provenienza

Provenienza campioni	<i>Cryptosporidium parvum</i>		<i>Giardia duodenalis</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%
<b>Monitoraggio</b>	8	72,2	4	57,1	8	66,6
<b>Controllo ufficiale</b>	3	27,2	3	42,8	4	43,3

**Tabella 3.** Pool positivi al test Real Time PCR per *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii* in relazione alla provenienza

Provenienza campioni	<i>Cryptosporidium parvum</i>		<i>Giardia duodenalis</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%
<b>Monitoraggio</b>	8	5,5	5	3,4	11	7,6
<b>Controllo ufficiale</b>	3	13,6	3	13,6	6	27,3

**Tabella 4** Pool di branchie e epatopancreas positivi al test Real Time PCR per *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii* prelevati nell'ambito del Piano di monitoraggio, in relazione alla localizzazione geografica delle zone di produzione

Localizzazione zone di produzione	<i>Cryptosporidium parvum</i>		<i>Giardia duodenalis</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%
Nord – Est	1	2,2	4	9	4	9
Centro – Est	2	12,5				
Sud – Est	3	6,5			2	4,3
Sud			1	6,2		
Centro - Ovest	2	9			5	22,7

**Tabella 5** Pool positivi al test Real Time PCR per *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii* in relazione al tessuto esaminato

Tipologia tessuto mitili	<i>Cryptosporidium parvum</i>		<i>Giardia duodenalis</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%
<b>Branchie</b>	5	5,8	4	2,3	8	9,4
<b>Ghiandola digestiva (epatopancreas)</b>	6	7	4	2,3	9	10,5
<b>Branchie + ghiandola digestiva</b>			1	1,1	5	5,8

## BIBLIOGRAFIA

1. Renon P. (2000). I prodotti della pesca. Agriteam, Regione Lombardia, Direzione generale Agricoltura, Vol. I e II.
2. Cattaneo P. e Bernardi C. (2010). “Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi”. *Food in*, 1:4-8.
3. Orban E., Di Lena G., Casini I., Gambelli L., Marzetti A. and Caproni R. (2002). “Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chem.*, 77:57-65.
4. Frega N.G., Mozzon M., Pacetti D. (2002). “Composizione degli acidi grassi in pesci e molluschi edibili del mare Adriatico”. *Riv. Ital. delle sostanze grasse*, LXXIX: 301-305.
5. Jay J.M., Loessner M.J. and Golden D.A. (2009). “Microbiologia degli alimenti”. Cap. 5:127-128 Ed. Springer.
6. Giangaspero A., Papini R., Marangi M. and Gasser R.B. (2014). “*Cryptosporidium parvum* genotype Ila and *Giardia duodenalis* assemblage A in *Mytilus galloprovincialis* on sale at local food markets”. *International Journal of Food Microbiology* 171:62-67.

7. Guèguen M., Amiard J.C., Arnich N., Badot P.M., Claisse D., Guèrin T. and Vernoux J.P. (2011) “Shellfish and residual chemical contaminants: hazards, monitoring, and health risk assessment along French coasts. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 213:55-111.
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010). The state of world fisheries and aquaculture. P.1-218. FAO, Rome Available at: [www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf](http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf). Accessed December 2012.
9. Lèvesque B.C., Barthe B.R., Dixon L.J., Parrington D., Martin B., Doidge J.F., Proulx F. and Murphy D. (2010). “Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: a pilot study. *Can. J. Microbiol.* 56: 968-977.
10. Collins M.V., Flick G.J., Smith S.A., Fayer R., Croonenberghs R., O’Keefe S., and Lindsay D.S. (2005). “The effect of high-pressure processing on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally exposed Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 52:500-504.
11. Da Fonseca I.P., Ramos P.S., Ruano F.A., Duarte A.P., Costa J.C, Almeida A.C., Falcao M.I. and Fazendeiro M.I. (2006). “Efficacy of commercial cleansing procedures in eliminating *Cryptosporidium parvum* oocysts from bivalves”. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (Suppl.1): S49-S51.

12. Gómez-Causo H., Méndez-Hermida F., Castro-Hermida J.A. and Ares-Mazàs E. (2006). “*Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs”. *J. Food Prot.* 69:185-190.
13. Erickson M.C. and Ortega Y.R. (2006). “Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental system”. *J. Food Prot.* 69:2786-2808.
14. Lindsay D.S., Collins M.V., Mitchell S.M., Cole R.A., Flick G.J., Wetch C.N., Lindquist A. and Dubey J.P. (2003). “Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater”. *J. Eukaryot Microbiol.* 50 (Suppl.): 687-688.
15. Dubey J.P. (1998) “*Toxoplasma gondii* oocysts survival under defined temperatures”. *J. Parasitol.* 84: 862-865.
16. Fayer R., Graczyk T.K., Lewis E.J., Trout J.M. and Farley C.A. (1998). “Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts seawater and eastern oysters (*Crossostrea virginica*) in the Chesapeake Bay”. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1070-1074.
17. Fayer R., Lewis E.J., Trout J.M., Graczyk T.K., Jenkins M.C., Higgins L., Xiao L. and Lal A.A. (1999). “*Cryptosporidium parvum* oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay”. *Emerg. Infect. Dis.* 5:706-710.
18. Fayer R., Trout J.M., Lewis E.J., Xiao L., Lal A., Jenkins M.C. and Graczyk T.K. (2002). “Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay”. *Parasitol. Res.* 88:998-1003.

19. Fayer R., Trout J.M., Lewis E.J., Santin M., Zhou L., Lal A.A. and Xiao L. (2003). "Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*". *Parasitol. Res.* 89:141-145.
20. Guiguet Leal D.A., Aparecida Pereira M., Bueno Franco R.M., Branco N. and Cantusio Neto R. (2008) "First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brasil". *Journal of Water and Health* /XX.
21. Freire-Santos F., Oteiza-Lòpez A.M., Vergara-Castiblanco C.A., Ares-Mazàs E., Alvarez-Suàrez E. and Garcia-Martìn O. (2000). "Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption". *J. Parasitol.* 86:853-854.
22. Gòmez-Couso H., Freire-Santos F., Amar C.F.L., Williamson K.A., Ares-Mazàs M.E. and McLauchlin J. (2004). "Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR". *Int. J. Food Microbiol.* 91:279-288.
23. Gòmez-Couso H., Mèndez-Hermida F., Castro-Hermida J.A. and Ares-Mazàs E. (2005). " Occurrence of *Giardia* cysts in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) destined for human consumption". *J. Food Prot.* 68:1702-1705.
24. Melo P.C., Teodosio J., Reis J., Duarte A., Costa J.C. and Fonseca I. (2006). "*Cryptosporidium* spp. In freshwater bivalves Portugal". *J. Eukariot. Microbiol.* 53(Suppl.1): S28-S29.

25. Schets F.M., Van den Berg H.H.J.L., Engels G.B., Lodder W.J. and de Roda Husman A.M. (2007). “*Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from Oosterschelde, The Netherlands”. *Int. J. Food Microbiol.* 113:189-194.
26. Robertson L.J. and Gjerde B.(2008). “Development and use of a pepsin digestion method for analysis of shellfish for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts”. *J. Food Prot.* 71:959-966.
27. Doering P.H. and Oviatt C.A. (1986). “Application of filtration rate models to field population of bivalves: an assessment using experimental mesocosms”. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 31:265-275.
28. Salanki J., Farkas A., Kamardina T. and Rozsa K.S. (2003). “Molluscs in biological monitoring of water quality”. *Toxicol. Lett.* 140-141:403-410.
29. Graczyk T.K., Fayer R., Lewis E.J., Trout J.M. and Farley C.A. (1999). “*Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay”. *Parasitol. Res.* 85:518-521.
30. Jorgensen C.B. (1975). “Comparative physiology of suspension feeding”. *Annu. Rev. Physiol.* 37:57-79.
31. Li X., Guyot K., Dei-Cas E., Mallard J.P., Ballet J.J. and Brasseur P. (2006). “*Cryptosporidium* oocysts in mussel (*Mytilus edulis*) from Normandy (France)”. *Int. J. Food Microbiol.* 108:321-325.



32. Fayer R., Farley C.A., Lewis E.J., Trout J.M. and Graczyk T.K. (1997). "Potential role of the Eastern oysters, *Crassostrea virginica*, in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*". *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2086-2088.
33. Ryan U., Fayer R. and Xiao L. (2014). "*Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs". *Parasitology*, 141 (13). Pp. 1667-1685.
34. Morgan U.M., Xiao L., Fayer R., Lal A.A. and Thompson R.C.A. (1999). "Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus". *International Journal for Parasitology*, vol. 29, no. 11, pp. 1733-1751.
35. Leoni F., Gallimore C.I., Green J. and McLauchlin J. (2006). "Characterisation of small double stranded RNA molecule in *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium meleagridis*". *Parasitology International*, vol. 55, no.4, pp. 299-306.
36. Xiao L., Bern C., Limor J. et al. (2001). "Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru". *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 183, no. 3, pp. 492-497.
37. Ditrich O., Palkovic L., Stërba J., Prokopic J., Loudová J. and Giboda M. (1991). "The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man". *Parasitology Research*, vol. 77, no. 1, pp. 44-47.

38. Abrahamsen M.S., Templeton T.J., Enomoto S., Abrahante J.E., Zhu G., Lancto C.A., Deng M., Liu C., Widmer G., Tzipori S., Buck G.A., Xu P., Bankier A.T., Dear P.H., Konfortov B.A., Spriggs H.F., Iyer L., Anantharaman V., Aravind L. and Kapur V. (2004). “Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*”. *Science* 304:441-445.
39. Berilli F., Caffara M., Capelli G., Di Cave D., Fioravanti M., Frangipane di Regalbono A., Giangaspero A. (2008) “Protozoi di interesse zoonosico in molluschi bivalvi: *quale rischio per il consumatore?*”. Risultati del Progetto: “Protozoi di interesse zoonosico in molluschi bivalvi marini e lagunari: studio molecolare per una valutazione dell’inquinamento ambientale e del rischio per il consumatore” University of Bologna ed., Ozzano Emilia, Italy.
40. Smith H.V., Cacciò S.M., Cook N., Nichols R.A.B. and Tait A. (2007). “*Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses”. *Veterinary Parasitology* vol. 149, no. 1-2, pp. 29:40.
41. Jokipii L. and Jokipii A.M.M. (1986). “Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis”. *The New England Journal of Medicine*, vol. 315, no. 26, pp. 1643-1647.
42. Chappell C.L., Okhuysen P.C., Sterling C.R. and DuPont H.L. (1996). “*Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocysts excretion patterns in healthy volunteers”. *The Journal of Infectious Disease*, vol. 173, no.1, pp. 232-236.

43. M.Hsu B, Huang C. and Pan J.R. (2001). "Filtration behaviors of *Giardia* and *Cryptosporidium*- ionic strength and pH effects". *Water Research*, vol.35, no. 16, pp.3777-3782.
44. Reinoso R., Becares E. and Smith H.V. (2008). "Effects of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts". *Journal of Applied Microbiology*, vol.104, no. 4, pp. 980-986.
45. Shields J.M., Hill V.R., Arrowood M.J. and Beach M.J. (2008). "Inactivation of *Cryptosporidium parvum* under chlorinated recreational water conditions". *Journal of Water and Health*, vol.104, no. 4, pp. 513-520.
46. LeChevallier M.W., Norton W.D. and Lee R.G. (1991). "Occurrence of *Giardia* e *Cryptosporidium spp.* In surface water supplies". *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2610-2616.
47. LeChevallier M.W., Norton W.D. and Lee R.G. (1991). "*Giardia* e *Cryptosporidium spp.* In filtered water supplies". *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2617-2621.
48. Berkelman R.L. (1994). "Emerging infectious diseases in the United States,1993". *J. Infect. Dis.* 170:272-277.
49. Herwaldt B.L., Craun G.F., Stokes S.L. and Juranek D.D. (1992). "Outbreaks of waterborne disease in the United States: 1989-90". *J. Am. Water Works Assoc.* 84:129-135.

50. Moore A.C., Herwaldt B.L., Craun G.F., Calderon R.L., Highsmith A.K. and Juranek D.D. (1993). "Surveillance for waterborne disease outbreaks- United States, 1991-1992". *Morbid. Mortal. Weekly. Rep.* 42:1-22.
51. Castro-Hermida J.A., Gonzales-Warleta M. and Mezo M. (2014). "Cryptosporidium spp. And Giardia duodenalis as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: The need for safe drinking water". *International J. of Hygiene and Environmental Health.*
52. Karanis P., Pieniazek N.J., Griffin D.W., Misener L. and Rose J.B. (1995). "Development of a PCR protocol for sensitive detection of Cryptosporidium in water samples". *Applied and Environmental Microbiology* 61:3849-3855.
53. Carraro E., Fea E., Salva S. and Gilli G. (2000). "Impact of a wastewater treatment plant on Crptosporidium oocysts and Giardia cysts occurring in surface water". *Water Sci Technol* 41:31-37.
54. Briancesco R. and Bonadonna L. (2005). "An Italian study on Cryptosporidium and Giardia in wastewater, fresh water ant treated water". *Environ Monit Assess* 104:445-457.
55. Di Benedetto M.A., Di Piazza F., Maida C.M., Firenze A. and Oliveri R. (2005). "Occurrence of Giardia and Cryptosporidium in wastewater, surface water and ground water samples in Palermo (Sicily)". *Ann Ig* 17:367-375.

56. Lonigro A., Pollice A., Spinelli R., Berilli F., Di Cave D., D’Orazi C., Cavallo P. and Brandonisio O. (2006). “*Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation”. *Appl Environ Microbiol* 72:7916-7918.
57. Giangaspero A., Cirillo R., Lacasella V., Lonigro A., Marangi M., Cavallo P., Berilli F., Di Cave D. and Brandonisio O. (2009). “*Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a lagoon in Souther Italy”. *Parasitol. Int.* 58: 12-17.
58. Bonadonna L., Briancesco R., Magini V., Orsini M. and Romano-Spica V. (2004). “A preliminary investigation on the occurrence of protozoa in swimming pools in Italy”. *Ann Ig* 16:709-719.
59. Olivieri R., Di Piazza F., Marsala B., Cerame G., Firenze A. and Di Benedetto M.A. (2006). “Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in swimming pools in the province of Palermo, Italy”. *Ann Ig* 18:367-374.
60. McAnulty J.M., Fleming D.W. and Gonzalez A.H. (1994). “A community-wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool”. *JAMA* 272:1597-1600.
61. Brandonisio O., Fumarola L., Spinelli R., Donadio F., Montemurro P. and Portincasa F. (2004). “*Giardia* and *Cryptosporidium* spp. : rassegna critica e monitoraggio in acque superficiali e reflue”. *Ig Mod* 122:137-160.

62. Ong C.S., Chow S., So P.P.L. et al. (2005). "Identification of two different *Cryptosporidiosis hominis* subtypes from cases in the 2001 waterborne cryptosporidiosis outbreak in North Battleford, Saskatchewan", in *Proceedings of the 11<sup>th</sup> Canadian National Conference and the 2<sup>nd</sup> Policy Forum on Drinking Water, Calgary, Canada, April 2004*, pp. 628-638, Canadian Water and Wastewater Association, Ottawa, Canada 2005.
63. Roy S.L., DeLong S.M., Stenzel S.A. et al. (2004). "Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 76, pp. 2944-2951.
64. Islam M., Morgan J., Doyle M.P. et al. (2004). "Persistence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water". *Foodborne Pathogens Dis.* 1:27-35.
65. Rzezutka A., Nichols R.A.B., Connelly L., Kaupke A., Kozyra I., Cook N., Birrell S. and Smith H.V. (2010). "*Cryptosporidium* oocysts on fresh produce from areas of high livestock production in Poland". *Int. J. of Food Microbiology* 139: 96-101.
66. Millard P.S., Gensheimer K.F., Addiss D.G. et al. (1994). "An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider". *Journal of the American Medical Association*, vol. 272, no. 20, pp. 1592-1596.

67. Blackburn B.G., Mazurek J.M., Hlavsa M. et al . (2006). “Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider”. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, no. 4, pp. 684-686.
68. Lynch M., Painter J., Woodruff R. and Braden C. (2006). “Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1998-2002”. *Morbidity and Mortality Weekly report*, vol. 55, no. 10, pp. 1-42.
69. Giangaspero A., Molini U., Iorio R., Traversa D., Paoletti B. and Giansante C. (2005). “*Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy”. *Prev. Vet. Med.*69:203-212.
70. Giansante C. (1997). “Mappa delle acque marine sedi di banchi naturali di *Chamelea gallina* 1996-1997. Report of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise” “G.Caporale”, pp.30-36.
71. Molini U., Iorio R., Traversa D., Paoletti B., Giansante C. and Giangaspero A. (2004). “Evidence of the presence of *Giardia spp.* and *Cryptosporidium spp.* In clams (*Chamelea gallina*) of the Abruzzo coast”. *Ittiopatologia*, vol.1, pp. 34-40.
72. Molini U., Traversa D., Ceschia G. et al. (2007). “Temporal occurrence of *Cryptosporidium* in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Northern Adriatic Italian Lagoons”. *Journal of Food Protection*, vol. 70, no. 2, pp. 494-4.
73. Tedde T., Piras G., **Salza S.**, Nives R.M., Sanna G., Tola S., Culurgioni S., Piras C., Merella P., Garippa G. and Virgilio S. (2013). “Investigation into

*Cryptosporidium* and *Giardia* in bivalve mollusks farmed in Sardinia region and destined for human consumption”. *Italian Journal of Food Safety*; vol. 2:e26.

74. Culurgioni J., Sanna G., Virgilio S., Piras G., Tedde T., **Salza S.**, Rosa M.N., Tola S., Piras M.C., Garippa G. and Merella P. (2012). “*Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in edible bivalves: results of one-years monitoring on three sites in Sardinia”.

XXVII Congresso Nazionale di Parassitologia (SOIPA) – Alghero 26-29 Giugno 2012.

75. Azevedo C. (1989). “Ultrastructural observations of *Cryptosporidium* sp. Parasite of *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia)”. *J. of Invertebr. Pathol.* 54: 289-298.

76. Gomez-Causo H., Freire-Santos F., Martinez-Urtaza J., Garcia-Martin O. and Ares-Mazas M.E. (2003). “Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards”. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 97-105.

77. Chalmers R.M., Sturdee A.P., Mellors P., Nicholson V., Lawlor F., Kenni F & Timpson P. (1997). “*Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report”. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25:380-384.

78. Gomez-Bautista M., Ortega-Mora L.M., Tabares E., Lopez-Rodas V. & Costas E. (2000). “Detection of infectious *cryptosporidium parvum* oocysts in mussels



(*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*)”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (5): 1866-1870.

79. Miller W.A., Miller M.A., Gardner I.A. et al. (2005). “New genotypes and factors associated with *Cryptosporidium* detection in mussel (*Mytilus* spp.) along the California coast”. *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 10, pp. 1103-1113.
80. Xunde Li, Guyot K., Dei-Cas E., Mallard J.P., Ballet J.J. and Brasseur P. (2006). “*Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France)”. *International Journal of Food Microbiology* 108: 321-325.
81. Savioli L., Smith H. and Thompson A. (2006). “*Giardia* e *Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative”. *Trends in Parasitology*, vol. 22, no. 5, pp. 203-208.
82. Neglected Disease Initiative of the World Health Organization, [http://www.who.int/neglected\\_diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/en/).
83. Mosier D.A. and Oberst R.D. (2000). “Cryptosporidiosis: a global challenge”. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 916, pp. 102-111.
84. Berkman D.S., Lescano A.G., Gilman R.H., Lopez S.L. and Black M.M. (2002). “Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study”. *The Lancet*, vo. 359, no. 9306, pp. 564-571.

85. Haque R., Mondal D., Karim A et al. (2009). “Prospective case-control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh”. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 48, no. 9, pp. 1191-1197.
86. Geurden T., Levecke B., Cacciò S.M. et al. (2009). “Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium”. *Parasitology*, vol. 136, no. 10, pp. 1161-1168.
87. Cacciò S.M., Thompson R.C.A., McLauchlin J., and Smith H.V. (2005). “Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology”. *Trends in Parasitology*, vol. 21, no. 9, pp. 430-437.
88. Cama V.A., Bern C., Roberts J. et al. (2008). “*Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Perú”. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, no. 10, pp. 1567-1574.
89. Peng M.M., Meshnick S.R., Cunliffe N.A. et al. (2003). “Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi”. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 50, supplement, pp. 557-559.
90. Gatei W., Wamae C.N., Mbae C. et al. (2006). “Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya”. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 75, no. 1, pp. 78-82.

91. Ajjampur S.S.R., Gladstone B.P., Selvapandian D., Muliyl J.P., Ward H. and Kang G. (2007). “Molecular and spatial epidemiology of cryptosporidiosis in children in a semiurban community in South India”. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 3, pp. 915-920.
92. Raccurt C.P., Brasseur P., Verdier R.I. et al. (2006). “Human cryptosporidiosis and *Cryptosporidium spp.* In Haiti”. *Tropical Medicine International Health*, vol. 11, no. 6, pp.929-934.
93. Bushen O.Y., Kohli A., Pinkerton R.C. et al. (2007). “Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*”. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 101, no. 4, pp. 378-384.
94. Chalmers R.M., Elwin K., Thomas A.L., Guy E.C. and Mason B. (2009). “Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003”. *Eurosurveillance*, vol. 14, no. 2, Article ID 19086.
95. Cama V.A., Ross J.M., Crawford S. et al. (2007). “Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons”. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 196, no. 5, pp. 684-691.
96. Matos O., Alves M., Xiao L., Cama V. and Antunes F. (2004). “*Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal”. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 10, no. 12, pp. 2256-2257.

97. Hung C.C., Tsaihong J.C., Lee Y.T. et al. (2007). "Prevalence of intestinal infection due to *Cryptosporidium* species among Taiwanese patients with human immunodeficiency virus infection". *Journal of the Formosan Medical Association*, vol. 106, no. 1, pp. 31-35.
98. Meamar A.R., Guyot K., Certad G. et al. (2007). "Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from human and animals in Iran". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 3, pp. 1033-1035.
99. Feng Y., Li N., Duan L. and Xiao L. (2009). "*Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 153-157.
100. Moretti M.V., Fiorio M., Antonelli S., Baldelli F., Stagni G. and Pauluzzi S. (1988). "Study on the presence of *Cryptosporidium* in Umbria". *Boll Ist Sieroter Milan* 67:226-231.
101. Brandonisio O., Marangi A., Panaro M.A., Marzio R., Natalicchio M.I., Zizzadoro P. and De Santis U. (1996). "Prevalence of *Cryptosporidium* in children with enteritis in southern Italy". *Eur J Epidemiol* 12:187-190.
102. Magi B., Canocchi V., Tordini G., Cellesi C. and Barberi A. (2006). "*Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques". *Parasitol Res.* 98:150-152.

103. Brandonisio O., Maggi P., Panaro M.A., Lisi S., Andriola A., Acquafredda A. and Angarano G. (1999). “Intestinal protozoa in HIV-infected patients in Apulia, South Italy”. *Epidemiol Infect* 123:457-462.
104. Gomez Morales M.A., Pozio E. and Croppo G.P.(1992). “Serodiagnosis of cryptosporidiosis in Italian HIV-positive patients by means of an oocyst soluble antigen in an ELISA”. *J Infect* 25:229-236.
105. Frost F.J., Muller T.B., Calderon R.L. and Craun G.F. (2004). “Analysis of serological responses to *Cryptosporidium* antigen among NHANES III participants”. *Ann Epidemiol* 14:473-478.
106. Giangaspero A., Iorio R., Paoletti B., Traversa D. and Capelli G. (2006). “Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy”. *Parasitol Res* 99:297-299.
107. Robertson I.D., Irwin P.J., Lymbery A.J., and Thompson R.C.A. (2000). “The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses”. *International Journal for Parasitology* 30:1369-1377.
108. Palmer C.S., Traub R.J., Robertson I.D., Devlin G., Ress R. and Thompson R.C. (2008). “Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats”. *Veterinary Parasitology* 154:142-147.

109. Xiao L., Fayer R., Ryan U. and Upton S.J. (2004). “*Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health”. 17, 72-97.
110. Paoletti B., Otranto D., Weigl S., Giangaspero A., Di Cesare A. and Traversa D. (2011). “Prevalence and genetic characterization of *Giardia* e *Cryptosporidium* in cats from Italy”. *Research in Veterinary Science* 91:397-399.
111. Canestri-Trotti G., Gramenzi F., Foglini A. and Tognato G. (1992). “Prima segnalazione di protozoa del genere *Cryptosporidium* in vitelli in Italia”. *Atti Soc Ital Buiat* 14:289-292.
112. Genchi G., Hermon I., Sangalli G. e Traldi G. (1994). “La criptosporidiosi, fattore determinante nella diarrea neonatale”. *Praxis Vet* 5:5-8.
113. Grana L., Lalle M., Habluetzel A., Silvestri S., Traldi G., Tonanti D., Pozio E. and Cacciò S.M. (2006). “Distribution of zoonotic and animal specific genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves of cattle farms in the Marche region”. *Parassitologia* 48:208.
114. Coklin T., Farber J., Parrington L. and Dixon B. (2007). “Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. In dairy cattle in Ontario, Canada”. *Veterinary Parasitology* 150:297-305.

115. Veronesi F., Diaferia M. and Piergili Fioretti D. (2006). “Epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in foals of central Italy”. *Parassitologia* 48:275.
116. Canestri –Trotti G., Pampiglione S. e Visconti S. (1984). “*Cryptosporidium* sp. e *Isospora suis* nel suino in Italia”. *Parassitologia* 26:299-304.
117. Manfredi M.T., Preti R., Lalle M., Tonanzi D., Pozio E. and Cacciò S.M. (2006). “*Cryptosporidium* spp. infections in pigs from industrial farms of northern Italy: prevalence and genotyping”. *Parassitologia* 48:269.
118. Piergili-Fioretti D., Moretti A. and Sacconi G. (1991). “Intestinal cryptosporidiosis of roaster and boiler chicken flocks in central Italy”. *Acta Med Vet* 37:149-157.
119. Fayer R. (2004). “*Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite”. *Vet. Parasitol.* 126: 37-56.
120. Xiao L., Morgan U.M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulanw W., Thompson R.C., Fayer R. and Lal A.A. (1999). “Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species”. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3386-3391.
121. Gomez-Causo H., Mendez-Hermida F., Ares-Mazas E. (2007). “First report of *Cryptosporidium parvum* “ferret” genotype in American mink (*Mustela vison* Shreber 1777)”. *Parasitology Reserch* 100, 877-879.

122. Meamer A.R., Guyot K., Certad G., Dei-Cas E., Mohraz M., Mohebbali M., Mohammad M., Mehbod A.A., Rezaie S. and Rezaian M. (2007). “Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran”, *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1033-1035.
123. Bajer A., Bednarska M., Caccio S.M., Wolska-Kusnierz B., Heropolitanska-Pliszka E., Bernatowska E., Wielopolska M., Paziewska A., Welc-Faleciak R. and Sinski E. (2008). “Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human clinical cases in Poland”. *Parasitology Research* 103, 37-42.
124. Duranti A., Caccio S.M., Pozio E., Di Egidio A., Curtis M., Battisti A. and Scaramozzino P. (2008). “Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in cattle”. *Zoonoses and Public health, in press*.
125. Paziewska A., Bednarska M., Nieweglowski H., Karbowiak G. and Bajer A. (2007). “Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia spp.* In selected species of protected and game mammals from North-Eastern Poland”. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 14, 265-270.
126. Traversa D., Iorio R., Otranto D., Modry D. and Slapeta J. (2008). “Genetic characterisation, phylogeny and zoonotic implications”. *Molecular and Cellular Probes* 22, 122-128.
127. Sulaiman I.M., Hira P.R., Zhou L., Al-Ali F.M., Al-Shelahi F.A., Shweiki H.M., Iqbal J., Khalid N. and Xiao L. (2005). “Unique endemicity of



cryptosporidiosis in children in Kuwait”. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 2805-2809.

128. O’Connor R.M., Wanyiri J.W., Cevallos A.M., Priest J.W. and Ward H.D. (2007). “*Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15”. *Molecular and Biochemical Parasitology* 156, 80-83.
129. Gatei W., Hart C.A., Gilman R.H., Das P., Cama V. and Xiao L. (2006). “Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*”. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53, S43-S48.
130. Leoni F., Mallon M.E., Smith H.V., Tait A. and McLauchlin J. (2007). “Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum* from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* from sporadic cases in livestock in the UK”. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3286-3294.
131. Wielinga P.R., de Vries A., van der Goot T.H., Mank T., Mars M.H., Kortbeek L.M. and van der Giessen J.W. (2008). “Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in the Netherlands”. *International Journal for Parasitology* 38, 809-817.
132. Quilez J., Torres E., Chalmers R.M., Hadfield S.J., Del Cacho E. and Sanchez-Acedo C. (2008). “Genotype and subtype characterization of *Cryptosporidium* in lambs and goat kids in Spain”. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6026-6031.

133. Alves M., Xiao L., Sulaiman I., Lal A.A., Matos O. and Antunes F. (2003). “Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal”. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2744-2747.
134. Xiao L., Feng Y. (2008). “Zoonotic cryptosporidiosis”. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 52, 309-323.
135. Ngouanesavanh T., Guyot K., Certad G., Fichoux Y.L., Chartier C., Verdier R.-I., Cailliez J.-C., Camus D., Dei-Cas E. and Banuls A.-L. (2006). “*Cryptosporidium* population genetics: Evidence of clonality in isolates from France and Haiti”. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53, S33-S36.
136. Tanriverdi S., Markovics A., Arslan M.O., Itik A., Shkap V. and Widmer G. (2006). “Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations”. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2507-2513.
137. Tanriverdi S. and Widmer G. (2006). “Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis*”. *Infection, Genetics and Evolution* 6, 113-122.
138. Morrison L.J., Mallon M.E., Smith H.V., Macleod A., Xiao L. and Tait A. (2008). “The population structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Scotland: A complex picture”. *Infection, Genetics and Evolution* 8, 121-129.

139. Cama V.A., Arrowood M.J., Ortega Y.R. and Xiao L. (2006). “Molecular characterization of the *Cryptosporidium parvum* iowa isolate kept in different laboratories”. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53: S40-S44.
140. Gatei W., Das P., Dutta P., Sen A., Cama V., Lal A.A. and Xiao L. (2007). “Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India”. *Infection, Genetics and Evolution* 7, 197-205.
141. Gatei W., Barrett D., Lindo J.F., Eldemire-Shearer D., Cama V. and Xiao L. (2008). “Unique *Cryptosporidium* population in HIV-Infected person, Jamaica”. *Emerging Infectious Disease* 14, 841-843.
142. Glaberman S., Moore J.E., Lowery C.J., Chalmers R.M., Sulaiman I., Elwin K., Rooney P.J., Millar B.C., Dooley J.S., Lal A.A. and Xiao L. (2002). “Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland”. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 631-633.
143. Stantic-Pavlinic M., Xiao L., Glaberman S., Lal A.A., Orazen T., Rataj-Verglez A., Logar J. and Berce I. (2003). “Cryptosporidiosis associated with animal contacts”. *Wien. Klin. Wochenschr* 115, 125-127.
144. Chalmers R.M., Ferguson C., Caccio S., Gasser R.B., Abs El-Osta Y.G., Heijnen L., Xiao L., Elwin K., Hadfield S., Sinclair M. and Stevens M. (2005). “Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species”. *Int. J. Parasitol.* 35, 397-410.

145. Alves M., Xiao L., Antunes F. and Matos O. (2006). "Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal". *Parasitol. Res.* 99, 287-292.
146. Thompson H.P., Dooley J.S., Kenny J., McCoy M., Lowery C.J., Moore J.E. and Xiao L. (2007). "Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland". *Parasitol. Res.* 100, 619-624.
147. Xiao L., Zhou L., Santin M., Yang W. and Fayer R. (2007). "Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern USA". *Parasitol. Res.* 100, 701-706.
148. Wu Z., Nagano I., Boonmars T., Nakata T. and Takahashi Y. (2003). "Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses". *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4720-4726.
149. Masic Z. and Abe N. (2006). "Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 Kda glycoprotein gene sequences". *Parasitology* 134, 351-358.
150. Plutzer J. and Karanis P. (2007). "Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary". *Vet. Parasitol.* 146, 357-362.
151. Peng M.M., Wilson M.L., Holland R.E., Meshnick S.R., Lal A.A. and Xiao L. (2003). "Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan:

implications for understanding the transmission dynamics”. *Parasitol. Res.* 90, 175-180.

152. Trotz-Williams L.A., Martin D.S., Gatei W., Cama V., Peregrine A.S., Martin S.W., Nydam D.V., Jamieson F. and Xiao L. (2006). “Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario”. *Parasitol. Res.* 99, 346-352.
153. Hunter P.R., Hadfield S.J., Wilkinson D., Lake I.R., Harrison F.C. and Chalmers R.M. (2007). “Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk”. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 82-88.
154. Mallon M., MacLeod A., Wastling J., Smith H., Reilly B. and Tait A. (2003). “Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*”. *J. Mol. Evol.* 56, 407-417.
155. Mallon M.E., MacLeod A., Wastling J., Smith H. and Tait A. (2003). “Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* type 2: population genetics and sub-structuring”. *Infect. Genet. Evol.* 3, 207-218.
156. Grinberg A., Lopez-Villalobos N., Pomroy W., Widmer G., Smith H. and Tait A. (2008). “Host-shaped segregation of the *Cryptosporidium parvum* multilocus genotype repertoire”. *Epidemiol. Infect.* 136, 273-278.
157. Peng M.M., Meshnick S.R., Cunliffe N.A., Thindwa B.D., Hart C.A., Broadhead R.L. and Xiao L. (2003). “Molecular epidemiology of

- cryptosporidiosis in children in Malawi”. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50 (suppl.), 557-559.
158. Xiao L. and Ryan U.M. (2004). “Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology”. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17, 483-490.
159. Leav B.A., Mackay M.R., Anyanwu A. et al. (2002). “Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa”. *Infection and Immunity*, vol. 70, no.7, pp.3881-3890.
160. Xiao L., Bern C., Sulaiman I.M. and Lal A.A. (2004). “Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. In: Thompson, R.C.A., Armson A., Ryan U.M. (Eds), *Cryptosporidium: From Molecules to Disease*”. *Elsevier, Amsterdam*, pp. 121-146.
161. Akiyoshi D.E., Tumwine J.K., Bakeera-Kitaka S. and Tzipori S. (2006). “Subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from children in Uganda”. *J. Parasitol.* 92, 1097-1100.
162. Morse T.D., Nichols R.A., Grimason A.M., Campbell B.M., TEMBO K.C. and Smith H.V. (2007). “Incidence of cryptosporidiosis species in pediatric patients in Malawi”. *Epidemiol. Infect.* 135, 1307-1315.
163. Felice F.P. (1952). “Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat”. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 57: 53-146.

164. Garcia L.S. and Bruckner D.A. (1993). “Diagnostic medical parasitology”. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.
165. Svärd S.G., Hagblom P. and Palm J.E.D. (2002). “*Giardia lamblia* – a model organism of eukaryotic cell differentiation”. *FEMS Microbiol. Lett.* 218:3-7.
166. Genchi C., Pozio E. (2004). “DE CARNERI Parassitologia generale e umana” Tredicesima edizione. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
167. Meyer E.A. and Jarroll E.L. (1980). “Giardiasi”. *American Journal of Epidemiology* 111: 1-12.
168. Karanis P., Kourenti C. and Smith H. (2007). “Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lesson learnt”. *Journal of Water and Health*, vol. 5, no. 1, pp.1-38.
169. LeClerc H., Schwartzbrod L. and Dei-Cas E. (2002). “Microbial agents associated with waterborne disease”. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 371-409.
170. Cacciò S.M., De Giacomo M., Aulicino F.A. and Pozio E. (2003). “*Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy”. *Appl Environ Microbiol* 69:3393-3398.
171. Fayer R., Dubey J.P. and Lindsay D.S. (2004). “Zoonotic protozoa: from land to sea”. *Trends Parasitol.* 20 (11): 531-536.

172. Shets F.M., van Wijnem J.H., Schijven J.F., Schoon H. and de Roda Husman A.M. (2008). “Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these water”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 7, pp. 2069-2078.
173. Lobo M.L., Xiao L., Antunes F. and Matos O. (2009). “Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal”. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 48, no.6, pp.732-737.
174. Robertson L.J., Hermansen L. and Gjerde B.K. (2006). “Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway”. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5297-5303.
175. Roach P.D., Olson M.E., Whitley G. and Wallis P.M. (1993). “Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada”. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 67-73.
176. Dawson D. (2005). “Foodborne protozoan parasites”. *International Journal of Food Microbiology* 103: 207-227.
177. Flanagan P.A. (1992). “*Giardia*: a review”. *Epidemiology and Infection* 109: 23-33.



178. Furness B.W., Beach M.J. and Roberts J.M. (2000). “Giardiasis surveillance – United States, 1992-1997. Morbidity and Mortality Weekly Report”. *CDC Surveillance* 49 (7), 1-13 (Summer 2000).
179. Dykes A.C., Juranek D.D., Lorenz R.A., Sinclair S., Jakubowski W. and Davies R. (1980). “Municipal waterborne giardiasis: an epidemiologic investigation. Beavers implicated as a possible reservoir”. *Ann. Intern. Med.* 92: 165-170.
180. Porter J.D., Gaffney C., Heymann D. and Parkin W. (1990). “Foodborne outbreak of *Giardia lamblia*”. *American Journal of Public Health* 80 (10): 1259-1260.
181. Mintz E.D., Hudson-Wragg M., Mshar P., Cartter M.L. and Hadler J.L. (1993). “Foodborne giardiasis in a corporate office setting”. *Journal of Infectious Diseases* 167 (1): 250-253.
182. Butt A.A., Aldridge K.E. and Sanders C.V. (2004). “Infections related to the digestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety”. *The Lancet Infectious Disease* Vol.4, May 2004.
183. Amahmid O., Asmama S. and Bouhoum K. (1990). “The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs”. *International Journal of Food Microbiology* 49:19-26.

184. Beuchat L.R. (1996). "Pathogenic microorganism associated with fresh produce". *Journal of Food Protection* 59: 204-216.
185. Ortega Y.R., Roxas C.R., Gilman R.H., Miller N.J., Cabrera L., Taquiri C. and Sterling C.R. (1997). "Isolation of *Cryptosporidium* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Perù". *American Journal of Public Health* 80 (10): 1259-1260.
186. Gòmez-Causo H., Mendez-Hermida F., Castro-Hermida J.A. and Ares-Mazas E. (2005). "*Giardia* in shellfish-farming areas: Detection in mussels, river water and waste waters". *Veterinary Parasitology* 133: 13-18.
187. Gòmez-Causo H., Mendez-Hermida F., Castro-Hermida J.A. and Ares-Mazas E. (2006). "*Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs". *Journal of Food protection* 69: 185-190.
188. Graczyk T.K., Conn D.B., Marcogliese D.J., Graczyk H. and De Lafontaine Y. (2003). "Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*)". *Parasitology Research* 89: 107-112.
189. Schets F., van der Berg H.H.J.L. , Engels G.B., Lodder W.J. and de Roda Husman A.M (2007). "*Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands". *International Journal of Food Microbiology* 113: 189-194.

190. Pucci R., Marino R. and Ilardi I. (1967). "Giardiasis in childhood". *Arch Ital Sci Med Trop Parassitol* 48: 135-144.
191. De Riu G.C., Vitale A. and Margarita G. (1967). "On the distribution of *Lambliia intestinalis* in a population group in the province of Caserta". *Ig Mod* 60: 270-275.
192. Libanore M., Bicocchi R., Rossi M.R., Montanari P., Sighinolfi L., Macario F. and Ghinelli F. (1991). "Incidence of giardiasis in adults patients with acute enteritis". *Minerva Med* 82: 375-380.
193. Caprioli A., Pezzella C., Morelli R., Giammanco A., Arista S., Crotti D., Facchini M., Guglielmetti P., Piersimoni C. and Luzzi I. (1996). "Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy". *Pediatr. Infect, Dis. J.* 15: 876-883.
194. Scotti S., Pettoello Mantovani M., Polito G., Carlomagno F., Coppola A. and Di Martino L. (1996). "*Giardia duodenalis* infections in pediatrics: our series". *Infez. Med.* 4: 35-40.
195. Ballone E., Fazii P., Riario Sforza G., Scassa E., Di Nicola M., Ippolito N., Di Mascio C. and Schioppa F. (2001). "Survey on giardiasis propagation in Pescara". *Ann Ig* 13: 11-120.

196. Capelli G., Paoletti B., Iorio R., Frangipane Di Regalbano A., Pietrobelli M., Bianciardi P. and Giangaspero A. (2003). "Prevalence of *Giardia spp.* In dogs and humans in Northern and Central Italy". *Parasitol. Res.* 90: 154-155.
197. Crotti D., D'Annibale M.L., Fonzo G., Lalle M., Cacciò S.M. and Pozio E. (2005). "*Dietamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy". *Parasite* 12: 165-170.
198. Giacometti A., Cirioni O., Balducci M., Drenaggi D., Quarta M., De Federicis M., Ruggeri O., Colapinto D., Ripani G. and Scalise G. (1997). "Epidemiologic features of intestinal parasitic infections in Italian mental institutions". *Eur J Epidemiol* 13: 825-830.
199. Gatti S., Cevini C., Ijaoba B., Bruno A., Bernuzzi A.M., de Lio P., Monco A. and Scaglia M. (2000). "Intestinal parasitic infections in an institution for the mentally retarded". *Ann Trop. Med. Parasitol.* 94: 453-460.
200. Giacometti A., Cirioni O., Fortuna M., Drenaggi D., Veccia S., D'Errico M.M. and Scalise G. (2000). "Giardiasis: a parasitic disease of continued topicality. Study of prevalence among a selected adult population". *Infez. Med.* 8:82-86.
201. Smith H.V., Cacciò S.M., Tait A., McLauchlin J., Thompson R.C.A. (2006). "Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans". *Trends Parasitol.* 22 (4): 160-167.

202. Bryan R.T., Pinner R.W. and Berkelman R.L. (1994). "Emerging infectious diseases in the United States". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 740:346-361.
203. Fraser D. (1994). "Epidemiology of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* infections in childhood". *Isr. J. Med. Sci.* 30:356-361.
204. Hlavsa M.C., Watson J.C. and Beach M.J. (2005). "Giardiasis surveillance - USA, 1998-2002". *Morbid. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ.* 54: 9-16.
205. Wolfe M.S. (1992). "Giardiasis". *Clin. Microbiol. Rev.* 5:93-100.
206. Farthing M.J.G. (1994). "Giardiasis as a disease". In: Thompson R.C.A., Reynoldson J.A., Lymbery A.L. (Eds.), *Giardia: from Molecules to Disease*, CAB International, Wallingford, Oxon UK, p. 15-39.
207. Katz D.E., Heisey-Grove D., Beach M., Dicker R.C. and Matyas B.T. (2005). "Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission". *Epidemiol. Infect.* 134 (5):935-941.
208. Xiao L. and Fayer R. (2008). "Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission". *International Journal for Parasitology* 38: 1239-1255.
209. Hunt C.L., Ionas G. and Brown T.J. (2000). "Prevalence and strain differentiation of *Giardia intestinalis* in calves in the Manawatu and Waikato regions of North Island, New Zealand". *Vet. Parasitol.* 91: 7-13.

210. Trout J.M., Santin M. and Fayer R. (2007). “Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows”. *Vet. Parasitol.* 140: 217-222.
211. Troub R., Wade S., Read C., Thompson A. and Mohammed H. (2005). “Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses”. *Vet. Parasitol.* 130: 317-321.
212. Tangtrongsup S. and Scorza V. (2010). “Update on the Diagnosis and Management of *Giardia spp.* Infections in Dogs and Cats”. *Topical Review* vol. 25, n. 2, August 2010.
213. Monis P.T., Andrews R.H., Mayrhofer G., Mackrill j., Kulda J., Isaac-Renton J.L. and Ey P.L. (1998). “Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia”. *Parasitology* 116: 7-19.
214. Read C.M., Monis P.T. and Thompson R.C. (2004). “Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP”. *Infect. Genet. Evol.* 4: 125-130.
215. Traub R.J., Monis P.T., Robertson I., Mencke N. and Thompson R.C. (2004). “Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community”. *Parasitology* 128: 253-262.

216. Berilli F., Di Cave D., De Liberato C., Franco A., Scaramozzino P. and Orecchia P. (2004). “ Genotype characterization of *Giardia duodenalis* isolated from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing”. *Veterinary Parasitology* 122: 193-199.
217. Papini R., Giuliani G., Gorini G. and Cardini G. (2007). “Survey of feline giardiasis by ELISA test in Italy”. *Veterinary Reserch Communication* 31: 297-303.
218. Bianciardi P., Papini R., Giuliani G. and Cardini G. (2004). “Prevalence of *Giardia* antigen in stool samples from dogs and cats”. *Revue de Medicine Veterinaire* 155: 417-421.
219. Abe N., Read C., Thompson R.C. and Iseki m. (2005). “Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret”. *J. Parasitol.* 91: 179-182.
220. Robertson L.J., Forberg T., Hermansen L., Hamnes I.S. and Gjerde B. (2007). “*Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR- RFLP and sequence analysis at two genes”. *J. Wildl. Dis.* 43: 576-585.
221. Lalle M., Frangipane di Regalbono A., Poppi L., Nobili G., Tonanzi D., Pozio E. and Caccio S.M. (2007). “A novel *Giardia duodenalis* assemblage A subtype in fallow deer”. *J. Parasitol.* 93: 426-428.

222. McCarthy S., Ng J., Gordon C., Miller R., Wyber A. and Ryan U.M. (2008). “Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in animals in irrigation catchments in the southwest of Australia”. *Exp. Parasitol.* 118: 596-599.
223. Sulaiman I.M., Fayer R., Bern C., Gilman R.H., Trout J.M., Schantz P.M., Das P., Lal A.A. and Xiao L. (2003). “Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*”. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1444-1452.
224. Gasser R.B. (1990). “Is giardiasis a zoonosis?”. *Austral. Vet. J.* 67: 456.
225. Healy G.R. (1990). “Giardiasis in perspective: the evidence of animals as a source of human *Giardia* infections”. In: *E.A. Meyer (Ed.), Giardiasis. Elsevier, New York*, p.305.
226. Thompson R.C.A., Reynoldson J.A. and Mendis A.H.W. (1993). “*Giardia* and giardiasis”. *Adv. Parasitol.* 32: 71.
227. Adam R.D. (1991). “The biology of *Giardia spp.*”. *Microbiol. Rev.* 55:706-732.
228. Baiguini A. (1994). “Infezioni alimentary da *Giardia spp.*”. *OD&V*, 15:23-26.
229. Hopkins R.M., Meloni P.B., Groth D.M., Wetherall D.J., Reynildson A.J. and Thompson R.C.A. (1997). “Ribosomal RNA sequencing reveals



differences between genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality”. *J. Parasitol* 83: 44-51.

230. Monis P.T., Andrews R.H., Mayrhofer G. and Ey P.L. (1999). “Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*”. *Mol.Biol. Evol.* 16: 1135-1144.
231. Monis P.T., Andrews R.H., Mayrhofer G. and Ey P.L. (2003). “Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin”. *Infect. Gen. Evol.* 3: 29-38.
232. Cacciò S.M., De Giacomo M. and Pozio E. (2002).” Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples”. *Int. J Parasitol* 32: 1023-1030.
233. Lalle M., Pozio E., Capelli G., Bruschi F., Crotti D. and Cacciò S.M. (2005). “Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes”. *Int. J Parasitol* 35: 207-213.
234. Cacciò S.M., Thompson R.C., McLauchlin J. and Smith H.V. (2005). “Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology”. *Trends Parasitol.* 21: 430-437.

235. Inpankaew T., Traub R., Thompson R.C. and Sukthana Y. (2007). “Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. Southeast Asian”. *J. Trop. Med. Public Health* 38: 247-255.
236. Traub R.J., Robertson I.D., Irwin P., Mencke N., Monis P. and Thompson R.C.A. (2003). “Humans, dogs and parasitic zoonoses-unravelling the relationships in a remote endemic community in northeast India using molecular tools”. *Parasitol. Res.* 90 (Suppl.3), S 156- S 157.
237. Volotao A.C., Costa-Macedo L.M., Haddad F.S., Brandao A., Peralta J.M. and Fernandes O. (2007). “Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis”. *Acta Trop.* 102: 10-19.
238. Human W.L. and Mank T.G. (2001). “Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology”. *Int. J. Parasitol.* 31: 822-826.
239. Levine N.D. (1977). “Taxonomy of *Toxoplasma*”. *J. Protozool.* 24: 36-41.
240. Grigg M.E., Bonnefoy S., Hehl A.B., Suzuki Y. and Boothroyd J.C. (2001). “Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries”. *Science* 294: 161-165.
241. Volkman S.K., Hartl D.L. (2003). “Parasitology. A game of cat and mouse”. *Science* 299: 353-354.

242. Angelici M.C., Giuliani C., Vimercati A., Pugliese M., Adorisio E., Tardoni S., Marcianti F., Masala G. and Tola S. (2008). “Genotyping of *Toxoplasma* isolates in Italy”. *Parasitologia* 50 (Suppl.1):73.
243. Hutchison WM.(1965). “Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*”. *Nature*206:961–2.
244. Tenter AM, Johnson AM. (1997). “Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian”. *Adv Parasitol.* 39:69–139.
245. Dubey, JP. and Beattie, CP. (1988).”Toxoplasmosis of animals and man”. Boca Raton, FL: CRC Press.
246. Dubey, JP. (1998). “Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis”. In: Palmer, S.R., Soulsby E.J.L., Simpson D.J.H. editors. *Zoonoses*. Oxford: Oxford University Press p. 579-97.
247. Ho-Yen, D.O. (1992). “Infection in the laboratory”. In: Ho-Yen D.O., Joss A.W.L., editors. *Human Toxoplasmosis*. Oxford: Oxford University Press p. 257-60.
248. Paul M. (1998). “Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis”. *Przegl Epidemiol.* 52:447–54.

249. Cook A.J., Gilbert R.E., Buffolano W., Zufferey J., Petersen E., Jenum P.A., Foulon W., Semprini A.E. and Dunn D.T. (2000). “Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicenter case-control study”. *European Reserch Network on Congenital Toxoplasmosis*. *BMJ* 321: 142-147.
250. Han K., Shin D.W., Lee T.Y. and Lee Y.H. (2008). “Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and risk factors associated with seropositivity of pregnant women in Korea”. *J. Parasitol.* 94: 963-965.
251. Hall S.M., Pandit A., Golwilkar A. and Williams T.S. (1999). “How do Jains get *Toxoplasma* infection?”. *Lancet* 354: 486-487.
252. Roghmann M.C., Faulkner C.T., Lefkowitz A., Patton S. and Zimmerman J. (1999). “Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland”. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 790-792.
253. Antoniou M., Tzouvali H., Sifakis S., Galanakis E., Georgopoulou E. and Tselentis Y. (2007). “Toxoplasmosis in pregnant women in Crete”. *Parasitologia* 49: 231-233.
254. Cavalcante G.T., Aguilar D.M., Camargo L.M., Labruna M.B., de Andrade H.F., Meireles L.R., Dubey J.P., Thulliez P., Dias R.A. and Gennari S.M. (2006). “Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brasil”. *J. Parasitol.* 92: 647-649.

255. Liu Q., Wei F., Gao S., Jiang L., Lian H., Yuan B., Yuan Z., Xia Z., Liu B., Xu X. and Zhu X.Q. (2009). “*Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China”. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 162-166.
256. Benenson M.W., Takafuji E.T., Lemon S.M., Greenup R.L. and Sulzer A.J. (1982). “Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with the ingestion of contaminated water”. *N. Engl. J. Med.* 307: 666-669.
257. Bowie W.R., King A.S., Werker D.H. et al. (1997). “ Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water”. *Lancet.* 350:173–7
258. Villena I., Aubert D., Gomis P., Ferte H., Ingland J.C., Denis-Bisiaux H., Dondon J.M., Pisano E., Ortis N. and Pinon J.M. (2004). “Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water”. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4035-4039.
259. Tender A.M. (2009). “*Toxoplasma gondii*: from animals to humans”. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 364-369.
260. Skinner L.J., Timperley A.C., Wightman D., Chatterton J.M.W. and Hoyen D.O. (1990). “Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowners family”. *Scand J. Infect. Dis.* 22: 359-361.
261. Fusco G., Rinaldi L., Guarino A., Proroga Y.T.R., Pesce A., Giuseppina D.M. and Gringoli G. (2007). “*Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy)”. *Vet. Parasitol.* 149: 271-274.

262. Tender A.M., Heckerroth A.R. and Weiss L.M. (2000). “*Toxoplasma gondii*: From animals to humans”. *Int. J. Parasitol.* 30: 1217-1258.
263. Paul M. (1998). “ Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis”. *Przegl Epidemiol.* 52:447–54.
264. Johnson A.M. (1997). “Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*”. *Parasitol. Today* 13: 393-397.
265. Dubey J.P. (1998). “Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion”. *Parasitology* 116: 43-50.
266. Dubey J.P., Kotula A.W., Sharar A., Andrews C.D. and Lindsay D.S. (1990). “Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork”. *J. Parasitol.* 76: 201-204.
267. Dubey J.P. (2000). “The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. In P Ambroise-Thomas, E Petersen, *Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control*, Springer, Paris, p. 271-275.
268. Dubey J.P. (1997). “Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C”. *J.Parasitol* 83: 946-949.

269. Navarro I.T., Vidotto O., Giraldi N. and Mitsuka R. (1992). “Resistència do *Toxoplasma gondii* ao cloreto de sódio e aos condimentos em linguica de suínos”. *Bol Oficina Sanit Panam* 112: 138-143.
270. Lundèn A. and Uggla A. (1992). “Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking”. *Int J Food Microbiol* 15: 357-363.
271. Kapparud G., Jenum P.A., StrayPedersen B., Melby K.K., Eskild A. and Eng J. (1996). “Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy – results of a prospective case-control study in Norway”. *Am. J. Epidemiol.* 144: 405 - 412.
272. Dumètre A. and Dardè M.L. (2003). “How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples?” *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 651-661.
273. Cole R.A., Lindsay D.S., Howe D.K., Roderick C.L., Dubey J.P., Thomas N.J. and Baeten L.A. (2000). “Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern otters (*Enhydra lutris nereis*)”. *J. Parasitol.* 86: 526-530.
274. Miller M.A., Sverlow K., Crosbie P.R., Barr B.C., Lowenstine L.J., Gulland F.M., Packham A. and Conrad P.A. (2001). “Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis”. *J. Parasitol.* 87: 816-822.

275. Arkush K., Miller M.A., Leutenegger C.M., Gardner I.A., Packham A.E., Heckerroth A.R., Tenter A.M., Barr B.C. and Conrad P.A. (2003). “Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocysts uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*)”. *Int. J. Parasitol.* 33: 1087-1097.
276. Lindsay S.S., Collins M.V., Mitchell M.M., Wetch C.N., Rosypal A.C., Flick G.J., Zajac A.M., Lindquist A. and Dubey J.P. (2004). “Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*)”. *J. Parasitol.* 90: 1054-1057.
277. Lindsay S.S., Phelps K.K., Smith S.A., Flick G., Sumner S.S. and Dubey J.P. (2001). “Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*)”. *J. Eukaryotic. Microbiol.* 48: 197S- 198S.
278. Aksoy U., Marangi M., Papini R., Ozkoc S., Bayram Delibas S. and Giangaspero A. (2014). “Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetenensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM)”. *Food Microbiology* 44: 128-135.
279. Putignani L., Mancinelli L., Del Chierico F., Menichella D., Adlerstein D., Angelici M.C., Marangi M., Berilli F., Caffara M., Frangipane di Regalbano D.A. and Giangaspero A. (2011). “Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent



- amplicon generation assay (FLAG)". *Experimental Parasitology* 127 (2): 409-417.
280. Ho-Yen D.O.(1992). "Clinical features". In: Ho-Yen, D.O., Joss A.W.L., editors. *Human Toxoplasmosis*. Oxford: Oxford University Press: p. 56-78.
281. Wilder H.C. (1952). "Toxoplasma chorioretinitis in adults" *AMA Arch Ophthalmol.* 48:127–36.
282. Perkins E.S. (1973). "Ocular toxoplasmosis". *Br J Ophthalmol.* 57:1–17.
283. Couvreur J, Thulliez P. (1996). "Toxoplasmose acquise à localisation oculaire ou neurologique: 49 cas". *Presse Med.* 25:438–42.
284. Luft, B.J. (1989). "Toxoplasma gondii. In: Walzer, PD.; Genta, RM., editors. *Parasitic infections in the compromised host*". New York: *Marcel Dekker* p. 179-279.
285. Ebbesen P. (2000). "Placenta physiology. In: Ambroise-Thomas, P.; Petersen, E., editors. *Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control*". Paris: *Springer-Verlag* p. 27-35.
286. Remington, J.S., Desmonts G. (1990). "Toxoplasmosis. In: Remington, JS.; Klein, JO., editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*". 3. Philadelphia: WB Saunders p. 89-195.

287. Dubey J.P. (2008). “The history of *Toxoplasma gondii* – The first 100 Years”.
- J. Eukaryot Microbiol* 55:467-475.
288. Cenci Goga B. (2009). “Toxoplasma negli animali, negli alimenti e nell’uomo.
- Una sfida per il medico veterinario”. *Prax Vet.* XXX: 7-15.
289. Sanger V.L. and Cole C.R. (1955). “Toxoplasmosis. VI. Isolation of Toxoplasma from milk, placentas, and newborn pigsof asymptomatic carrier sow”. *Am J. Vet. Res.* 16: 536-539.
290. Dubey J.P. and Jones J.L. (2008). “*Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States”. *Int. J. Parasitol.* 38: 1257-1278.
291. Dubey J.P., Hill D.E., Jones J.L., Hightower A.W., Kirkland E., Roberts J.M., Marcet P.L., Lehmann T., Vianna M.C., Miska K., Sreekumar C., Kwok O.C., Shen S.K. and Gamble H.R. (2005). “Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers”. *J. Parasitol.* 91:1082-1093.
292. Choi W.Y., Nam H.W., Kwak N.H., Huh W., Kim Y.R., Kang M.W., Cho S.Y. and Dubey J.P. (1997). “Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis”.
- J. Infect. Dis.* 175: 1280-1282.

293. Kijlstra A., Eissen O., Cornelissen A., Munniksma J., Eijck K. and Kortbeek I.T. (2004). “*Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems”. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*45:3165-3169.
294. Dubey J.P. and Beattie C.P. (1988). “*Toxoplasmosis of Animals and Man*”. Boca Raton FL.
295. Samra N.A., McCrindle C.M., Penzhorn B.L. and Cenci-Goga B.T. (2007). “Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in South Africa”. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 78: 116-120.
296. Robertson L.J. (2007). “The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review”. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 201-216.
297. Howe D.K. and Sibley L.D. (1995). “*Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease”. *J. Infect. Dis.* 172: 1561-1566.
298. Gangneux F. and Dardè M.L. (2012). “Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis”. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 264-296.
299. Sibley L.D. and Boothroyd J.C. (1992). “Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage”. *Nature* 359: 82-85.
300. Khan A., Su C., German M., Storch G.A., Clifford D.B. and Sibley D.L. (2005). “Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised

patients reveals high prevalence of Type I strains”. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5881-5887.

301. Costa J.M., Cabaret O., Moukoury S. and Bretagne S. (2011). “Genotyping of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* using high-resolution melting analysis of the repeated B1 gene”. *J. Microbiol Methods* 86: 357-363.
302. Burg J.L., Grover C.M., Pouletty P. and Boothroyd C. (1989). “ Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction”. *J. of Clinical Microbiology* vol. 27, No. 8, pp. 1787-1792.
303. Yu J., Lee S. and Park W. (2009). “Comparative Sensitivity of PCR Primers Sets for Detection of *Cryptosporidium parvum*”. *Korean J. Parasitol.* Vol. 47, No 3:293-297.
304. Mahbubani M.H., Bej A.K., Perlin M.H., Schaefer F.W. 3<sup>rd</sup>, Jakubowski W. and Atlas R.M. (1992). “Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes”. *J. Clin. Microbiol.* 30 (1): 74.
305. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

306. Hohweyer J., Dumetre A., Aubert D., Azas N. and Villena I. (2013). “Tools and Methods for Detecting and Characterizing *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Toxoplasma* Parasites in Marine Mollusks”. *J. of Food Protection*, Vo. 76, n. 9: 1649-1657.
307. Traversa D., Giangaspero A., Molini R., Iorio R., Paoletti B., Otranto D. and Giansante C. (2004). “Genotyping of *Cryptosporidium* from *Chamelea gallina* clams in Italy”. *Appl. Environ Microbiol.* 70: 4367-4370.