

STUDIO MOLECOLARE PER UNA VALUTAZIONE DELL'INQUINAMENTO AMBIENTALE E DEL RISCHIO PER IL CONSUMATORE.



[Università degli Studi di Foggia](#)

Abstract

I molluschi bivalvi costituiscono 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 accumulare microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo. Questa abilità costituisce motivo di notevole preoccupazione soprattutto quando i molluschi sono ingeriti crudi o poco cotti.

L'attuale normativa italiana prevede la ricerca di tossine algali, coliformi, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e metalli. Tuttavia, un'enorme quantità di feci provenienti dall'uomo e dagli animali, contenente anche protozoi parassiti di interesse zoonosico, viene riversata, attraverso reflui zootecnici e urbani o tramite le acque di dilavamento, nei fiumi. Questi, confluendo verso le acque costiere possono contaminare il mare e quindi i molluschi bivalvi.

Tra le diverse specie di microrganismi parassitari, *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* assumono oggi notevole interesse in considerazione del loro possibile ruolo zoonosico; sulla base delle più recenti acquisizioni è stato infatti dimostrato che alcuni genotipi delle tre specie possono essere condivisi dagli animali e dall'uomo.

In altre zone costiere del mondo, isolati di *Giardia* e *Cryptosporidium*, anche zoonosici sono stati isolati in alcuni esemplari di molluschi (ostriche, cozze, vongole, noci di mare, ecc), mentre isolati di *Toxoplasma*, presenti in mammiferi marini, non sono stati mai rilevati nei molluschi in natura. In Italia, la recente preliminare segnalazione, da parte dell'UR 1, di cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* in un campione di vongole della costa abruzzese e di coccidi riportabili a *Toxoplasma* nei molluschi dell'alto Adriatico, costituiscono un importantissimo dato per l'avvio di indagini finalizzate a monitorare in maniera approfondita nel nostro paese.

Il presente progetto intende valutare la presenza di *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* in diverse specie di molluschi autoctoni marini e lagunari allevati in banchi naturali e/o artificiali presenti lungo le coste italiane e di notevole interesse economico. Tale studio longitudinale, prevederà l'applicazione di metodologie di ricerca standardizzate e univoche, che tengano

conto di metodiche molecolari molto sensibili. Infine, ai fini di una corretta valutazione dell'origine degli isolati (animali e/o umani) e del reale rischio zoonosico la ricerca prevederà sia la caratterizzazione molecolare degli isolati sia la capacità infettante degli stessi.

Gli obiettivi prefissati saranno raggiungibili solo tramite l'adozione tra le UU.RR. 1, 2 e 3 di metodi di indagine omogenei e la collaborazione e stretta interazione con l'UR 4, secondo uno schema operativo che prevede: a. isolamento di *Giardia* e *Cryptosporidium* lungo la costa emiliana (*Tapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis* e *Chamelea gallina*) (UR 3), abruzzese (*C. gallina*) e pugliese (*Mytilus galloprovincialis* e *Cerastoderma glaucum*) (UR 1), tirrenica toscano-laziale (*C. gallina*, *M.galloprovincialis* e *Donax trunculus*) (UR2). 2. Ricerca di isolati di *Toxoplasma* (UR 4) nei campioni di molluschi raccolti dalle Unità di Ricerca (UU.RR. 1,2 e 3) e 3. Valutazione su base statistica del potere infettante delle oo/cisti di *Giardia* e di *Cryptosporidium* isolate dalle UU.RR. 1, 2 e 3 (UR 4). 4. caratterizzazione molecolare di *Cryptosporidium* e *Giardia* (UU.RR. 1, 2 e 3) e caratterizzazione molecolare di *Toxoplasma* (UR 4). 2. elaborazione statistica dei dati raccolti dalle UU.RR 1, 2 e 3 (UR 4).

La ricerca di questi protozoi parassiti di interesse zoonosico fornirebbe interessanti informazioni sulla contaminazione fecale da reflui urbani e/o zootecnici e l'efficienza degli impianti di depurazione presenti. Inoltre l'analisi molecolare degli isolati consentirebbe sia di identificare le fonti di infezione e gli animali che, fungendo da serbatoi dei protozoi possono rappresentare un rischio per la salute umana. <<<

Coordinatore Scientifico del Programma di Ricerca
Annunziata GIANGASPERO Università degli Studi di FOGGIA
Obiettivo del Programma di Ricerca

Scopo di questo programma è ricercare e genotipizzare alcune specie di protozoi di interesse zoonosico in molluschi autoctoni marini e lagunari di notevole interesse commerciale allevati o presenti in natura lungo le coste italiane e di valutare il rischio per il consumatore.

In particolare, ci si propone di:

1. Monitorare la presenza di protozoi di interesse zoonosico (*Giardia*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma*) in specie di molluschi marini: *Tapes philippinarum* (vongole veraci), *Mytilus galloprovincialis* (cozze) e *Chamelea gallina* (vongola comune) e *Donax trunculus* (telline) della costa adriatica emiliana, abruzzese e pugliese e tirrenica toscano-laziale e lagunari (*Cerastoderma glaucum* (cuore) della laguna di Varano).

A differenza di quanto già acquisito in numerose aree costiere degli Stati Uniti, in Europa, le ricerche sulla presenza di *Giardia* e *Cryptosporidium* nei molluschi, sono limitate alle coste della Spagna e dell'Irlanda, mentre non sono disponibili dati sulla presenza in natura di *Toxoplasma* in questi organismi marini. In Italia, la recente preliminare segnalazione, da parte dell'UR 1, di cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* in un campione di vongole della costa abruzzese (Traversa et al., 2004; Giangaspero et al., 2005), e di coccidi riportabili a *Toxoplasma* nei molluschi dell'alto Adriatico (Losio et al., 2004), costituisce un'importante base per l'avvio di indagini finalizzate a monitorare in maniera più sistematica, continuativa e approfondita (12 mesi), la presenza di questi protozoi in diverse specie di molluschi di notevole interesse economico: *Tapes philippinarum* (Emilia Romagna), *Chamelea gallina* (Emilia Romagna e Abruzzo), *Mytilus galloprovincialis* (Emilia R., Puglia e Lazio), *Donax trunculus* (Toscana e Lazio) e *Cerastoderma glaucum* (Puglia).

2. Utilizzare metodologie di ricerca standardizzate e univoche, sia classiche (IF) sia molecolari sensibili (semi-nested PCR; RT-PCR).

Come è noto, un limite notevole alla interpretazione e comparazione dei risultati ottenuti in parassitologia è legato all'impiego di tecniche diverse da parte dei diversi laboratori. Nel presente progetto di ricerca, il campionamento effettuato su base statistica e cadenzato, l'impiego di metodiche standardizzate e univoche e infine l'analisi statistica dei risultati ottenuti, risulta assolutamente innovativo relativamente alla tematica affrontata, nel panorama internazionale, e consente una valutazione e comparazione dei risultati ottenuti, su ampia scala.

La tecnica di immunofluorescenza (IF) viene considerata a livello mondiale la tecnica di screening più valida per la sua elevata sensibilità; tuttavia, a causa della ridotta specificità (Graczyk et al., 1998) tale metodica deve essere affiancata da tecniche molecolari, meglio se molto sensibili, quali la semi-nested PCR messa a punto recentemente dall'UR 1 (Molini et al, dati non pubblicati).

3. Genotipizzazione degli isolati dei protozoi mediante l'allestimento di PCR, sequenziamento e caratterizzazione molecolare con l'impiego degli stessi geni target su tutta l'area oggetto di indagine.

- Saranno utilizzati geni considerati tra i migliori target genetici per l'identificazione e la genotipizzazione delle 3 specie di protozoi, sia perché facilmente amplificabili sia perché consentono di differenziare i diversi genotipi dei protozoi oggetto di esame, (Cryptosporidium: 1 gene; Toxoplasma: 1 gene) e Assemblaggi (Giardia: 2 geni), in particolare le specie di maggiore rilevanza zoonosica.

La scelta di tali geni è il risultato dell'esperienza e di studi assai recenti svolti, in diverse specie animali e nell'uomo dalle UR 1, 2 e 4 (Berilli et al., 2004; Capelli et al., 2003; Traversa et al., 2004; Giangaspero et al., 2005; Paoletti et al., 2004 e Paoletti et al., dati non pubblicati).

- L'impiego, nel caso di Giardia, di due geni, invece di uno, risulta metodologicamente innovativo poiché consente di ottenere risultati più attendibili e valutarne la coerenza.

- La tipizzazione molecolare di molti isolati e su un ampio territorio, quale quello considerato nel presente progetto, risulta anch'essa innovativa e consente di superare i limiti diagnostici ed epidemiologici rilevati in letteratura.

L'analisi molecolare degli isolati eventualmente rilevati nei molluschi consentirebbe di fotografare la situazione di gran parte del territorio italiano e aggiungerebbe interessanti informazioni per la comprensione del potenziale rischio zoonosico legato al consumo dei molluschi crudi o poco cotti. Questa abitudine, insieme alla cattura e vendita, spesso illegale, di questi prodotti è assai comune particolarmente nelle regioni centro-meridionali del nostro paese.

4. Valutazione del grado di inquinamento costiero.

L'acquisizione dei dati relativi al punto 1 consente indirettamente di valutare:

- il grado di inquinamento ambientale delle coste (contaminazione fecale da reflui urbani e/o zootecnici);
- l'efficienza degli impianti di depurazione nei territori considerati;
- la capacità delle diverse specie di molluschi, peculiari di ciascun territorio, come indicatori biologici per il monitoraggio di organismi di interesse antropozoonosico nelle acque dei territori indagati.

5. Valutazione della capacità infettante degli isolati.

La conoscenza della infettività degli isolati in animali da laboratorio, grazie alle competenze e alle strutture di ricerca messe a disposizione dall'Università di Padova e dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (UR 4) e le metodologie utilizzate già standardizzate (Freire-Santos et al., 2001), costituisce un valore aggiunto alla presente ricerca: infatti l'acquisizione di tale dato si ritiene molto importante ai fini della comprensione della epidemiologia, della reale stima del rischio per il consumatore e del controllo delle infezioni nelle diverse zone oggetto di indagine.

CONSIDERAZIONI GENERALI

- Il raggiungimento dell'obiettivo consente di ottenere un quadro significativo della situazione epidemiologica su un ampio territorio della costa italiana, tuttavia l'organizzazione della ricerca prevede un percorso a tappe autonome, permettendo di raggiungere nelle diverse fasi, risultati significativi e indipendenti nelle diverse aree indagate.

- La stretta collaborazione, le affinità e l'integrazione esistente tra le diverse Unità facenti parte del presente progetto di Ricerca, è dimostrata dalle specifiche competenze delle singole Unità nei seguenti campi:

- patologie parassitarie delle specie ittiche (UU.RR. 2 e 3);
- epidemiologia di protozoi di interesse zoonosico in diverse specie animali (UU.RR. 1, 2, 3 e 4) e in specie ittiche (UU.RR. 2 e 3);
- applicazione delle tecniche di biologia molecolare (UU.RR. 1, 2, 3 e 4);
- analisi statistica (UR 4).

CONCLUSIONI

Gli obiettivi prefissati saranno raggiungibili solo tramite l'adozione tra le UU.RR. 1, 2 e 3 di metodi di indagine omogenei in grado di produrre dati comparabili fra loro e la collaborazione, l'interscambio e la stretta interazione con l'UR 4, secondo il seguente schema:

a. isolamento e identificazione di *Giardia* e *Cryptosporidium* in specie di molluschi peculiari del territorio: UR 3: costa emiliana (*Tapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis* e *Chamelea gallina*); UR 1: costa abruzzese (*C. gallina*) e costa pugliese in (*Mytilus galloprovincialis* e *Cerastoderma glaucum*); UR 2: costa tirrenica tosco-laziale (*M.galloprovincialis* e *Donax trunculus*).

b. ricerca di isolati di *Toxoplasma* (UR 4) nei campioni di molluschi raccolti dalle Unità di Ricerca (UU.RR. 1,2 e 3);

c. caratterizzazione molecolare di *Cryptosporidium* e *Giardia* (UU.RR. 1, 2 e 3) e caratterizzazione molecolare di *Toxoplasma* (UR 4);

d. valutazione su base statistica del potere infettante delle (oo)cisti di *Giardia* e di *Cryptosporidium* (UR 4);

e. elaborazione statistica dei dati raccolti (UR 4). <<<

Durata

24 mesi

Base di partenza scientifica nazionale o internazionale

Nel panorama internazionale e nazionale, le ricerche sulla presenza di protozoi di interesse zoonosico – e tra questi *Giardia* e *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* - in diverse specie di animali, domestici, selvatici e da reddito, compreso i molluschi bivalvi, si fonda su una tradizione di studi che negli ultimi anni, anche per l'avvento delle più moderne tecnologie molecolari, sta vivendo nell'ambito della comunità scientifica internazionale un momento di grande interesse. Le UU.RR facenti parti di questo progetto di ricerca, rientrano tra i protagonisti del dibattito, nella più recente stagione di studi.

I MOLLUSCHI

I molluschi bivalvi costituiscono in tutto il mondo, Italia compresa, una delle principali risorse alimentari. Nell'ambito dell'acquacoltura italiana, i molluschi bivalvi rappresentano le specie più allevate (circa 150.000 ton) e oltre il 10% (circa 70.000 ton) dei prodotti della pesca (Mattei e Pellizzato, 1997).

Lungo la costa adriatica, partendo dall'Alto Adriatico verso il Basso Adriatico, sono presenti diverse specie, di notevole interesse commerciale, allevate in banchi industriali e/o naturali tra 2 e 10 metri dalla costa. A partire dall'Alto Adriatico, ritroviamo le vongole *Tapes philippinarum* (62.000 tonnellate) e *Chamelea gallina* (45.000 tonnellate) mentre scendendo verso il litorale pugliese si intensifica la produzione di cozze *Mytilus galloprovincialis* (90.000 tonnellate) (Lucchetti 2003; Prioli 2001) e la presenza del cuore *Cerastoderma glaucum* in ambiente lagunare (Trotta e Cordisco, 1998; Price and Pearce, 1997). Lungo la costa del Tirreno centrale, le specie più diffuse sono la tellina (*Donax trunculus*), il canalicchio (*Ensis siliqua minor*) e la vongola (*Chamelea gallina*) (circa 5000 tonnellate lungo tutto il tirreno) (Lucchetti 2003); attualmente a causa della quasi totale scomparsa del canalicchio, la produzione del Tirreno si è concentrata sulle vongole e sulle telline.

I molluschi bivalvi hanno la capacità di filtrare elevati volumi di acqua, e tale abilità rende tali organismi in grado di accumulare sostanze tossiche biotiche ed abiotiche e microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo sia per la loro natura di "filtratori" a scopo trofico che per la loro distribuzione preferenziale in areali spesso fortemente contaminati. Questa abilità costituisce motivo di notevole preoccupazione soprattutto quando i molluschi sono ingeriti crudi o poco cotti. Questa abitudine, insieme alla cattura e vendita, spesso illegale, di questi prodotti è assai comune nelle regioni centro-meridionali del nostro paese.

L'attuale normativa italiana (Dlgs 30 dicembre 1992 n. 530) prevede azioni di sorveglianza ufficiale dirette al controllo della qualità e salubrità delle specie di molluschi. Gli studi sullo stato igienico delle acque e la ricerca di microrganismi nei molluschi è focalizzata essenzialmente

sulla ricerca di tossine algali, coliformi, *Escherichia coli*, indicatori di patogeni fecali, *Salmonella* spp. e metalli.

Oltre a batteri patogeni, alghe tossiche, biotossine e sostanze di natura inorganica, un'enorme (anche se poco visibile) quantità di feci provenienti dall'uomo, dagli animali da compagnia, da animali domestici e selvatici, contenente anche protozoi parassiti di interesse zoonosico, viene riversata, attraverso reflui zootecnici e urbani o dalle acque di dilavamento, nei fiumi; questi, confluendo verso le acque costiere possono contaminare il mare soprattutto quando gli impianti di depurazioni non sono efficienti o, come accade in alcune aree costiere italiane, non sono disponibili.

In questo contesto, i microrganismi, filtrati e concentrati dai molluschi bivalvi e ingeriti dall'uomo, possono essere responsabili di episodi di morbilità e mortalità.

I PROTOZOI

Tra le diverse specie di microrganismi parassitari, la cui presenza è strettamente connessa alla fecalizzazione ambientale, *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* costituiscono le specie più importanti. Questi protozoi sono organismi parassitari dell'uomo e degli animali tra i più comuni e meglio conosciuti, anche se per molti aspetti, ancora poco compresi. Negli ultimi dieci anni, infatti, l'interesse da parte della comunità scientifica nei confronti di questi protozoi, agenti responsabili di patologia negli animali e nell'uomo, è aumentato notevolmente anche a causa delle sempre più numerose segnalazioni di focolai nei paesi industrializzati. Le forme cistiche di *Giardia* e oocistiche di *Cryptosporidium* sono un'importante causa di diarrea particolarmente nei soggetti (animali e umani) giovani e/o immunocompromessi. L'infezione si realizza attraverso sia l'ingestione di acqua e/o cibo contaminati sia il contatto diretto oro-fecale. Le oocisti di *Toxoplasma gondii* sono trasmesse dai gatti a centinaia di specie di vertebrati a sangue caldo, compreso l'uomo. La diffusione di questo protozoo è cosmopolita e i focolai umani sono associati al consumo di carni crude o poco cotte (ingestione di cisti), ma anche di verdure contaminate da oocisti sporulate; la contaminazione dei vegetali può avvenire per deposizione fecale diretta da parte dei gatti infetti o dall'utilizzo in agricoltura di acque di superficie contaminate.

Studi molecolari e aspetti zoonosici

La genotipizzazione degli isolati è di fondamentale importanza per identificare le fonti di infezione e gli animali che possono fungere da serbatoi di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e che pertanto possono rappresentare un rischio per la salute umana. Nel caso di *Giardia*, sulla base delle più recenti acquisizioni è stato infatti dimostrato che alcuni genotipi di *Giardia duodenalis* (A e B) possono essere condivisi dagli animali e dall'uomo. In particolare l'assemblaggio AI si ritrova oltre che nell'uomo anche negli animali da reddito, cani, gatti e altri animali; l'assemblaggio AII soltanto nell'uomo (Thompson, 2000). L'assemblaggio B, che comprende due sottogruppi, riconosce l'assemblaggio III e IV, di cui quest'ultimo appare essere specifico dell'uomo. Altri assemblaggi sono geneticamente uniformi e sembrano confinati esclusivamente ad ospiti animali: C e D (cane), E (animali da reddito), F (gatto), G (ratto) (Thompson, 2004). Per quanto riguarda *Cryptosporidium*, diverse specie infettano l'uomo oltre a *Cryptosporidium hominis*, riconosciuto oggi come specie specifico dell'uomo: *Cryptosporidium parvum* (genotipo II) *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium muris* e altri genotipi, noti come "genotipo porcino" e "genotipo del

cervo" (Xiao et al.,2004).

Dal punto di vista metodologico, nel caso di *Cryptosporidium* spp., tra i diversi geni che sono stati studiati, il 18S dell'RNA ribosomiale (rRNA) e il COWP sono considerati i migliori target genetici per l'identificazione e la genotipizzazione di questo protozoo. (Xiao et al., 2000a; 2000b). Per la genotipizzazione di *Giardia* spp. sono stati invece utilizzati, tra gli altri, il 18S dell'RNA ribosomiale (rRNA), il *gdh*, il *tpi*, la β -giardina; l' *ssrRNA* permette di distinguere i maggiori assemblaggi genetici (A-G) mentre il *gdh* e il *tpi* riescono a discriminare i diversi sottotipi genetici all'interno di ciascun assemblaggio anche se le sequenze genetiche sono relativamente ben conservate (Monis et al., 2003).

Per quanto riguarda *Toxoplasma*, specifici markers genetici hanno confermato l'esistenza di una popolazione di *Toxoplasma* clonale con 3 genotipi dominanti (Howe e Sibley, 1995): il tipo I e II, che si isolano dall'uomo infetto per via congenita ed in pazienti con AIDS (tipo II), ed il tipo III, che si isola frequentemente dagli animali (Howe e Sibley, 1995; Fayer et al.,2004).

A causa dell'elevato grado di fecalizzazione ambientale, forme infettanti di *Giardia* e *Cryptosporidium* sono state rilevate in acque potabili, in fiumi, in laghi, in acque reflue, e focolai di infezioni causati da questi protozoi e collegati al consumo di acqua, sono riportati in letteratura in diverse aree geografiche del mondo (Fayer et al.,2003; 2004).

E' noto che possono essere eliminati fino a 10.000.000 alla settimana cisti di *Giardia* per grammo di feci (Smith e Grimason, 2003) e che i vitelli giovani possono eliminare fino a 100.000.000 oocisti di *Cryptosporidium* per grammo di feci (Kemp et al.,1995). La dose media infettante è compresa tra 25 e 100 cisti ma alcuni volontari si sono infettati con appena 10 cisti (Smith e Grimason, 2003); la concentrazione minima di oocisti di *Cryptosporidium* in grado di infettare un soggetto immunocompetente adulto è inferiore a 30 oocisti (Dillingham et al., 2002).

Casi di criptosporidiosi e giardiosi nell'uomo e negli animali sono riportati in diverse regioni europee (Fayer et al.,2004), Italia compresa. L'infezione da *Cryptosporidium* nel nostro Paese è stata rilevata particolarmente nelle regioni meridionali in bambini e pazienti HIV-positivi (Frost et al., 2000; 2002; Brandonisio et al., 1993; 1996; Caprioli et al., 1996; Brandonisio et al., 1999). Sebbene le prevalenze registrate siano basse, il 75% dei donatori di sangue in Italia presenta anticorpi anti-*Cryptosporidium* (Taburrini e Pozio, 1999). La prevalenza della giardiosi umana in Italia registra ampie oscillazioni, tuttavia, i dati più recenti indicano una prevalenza compresa tra 6,5 (Brandonisio, 1999; Angarano et al.,1997) e 2% (Capelli et al.,2003). Molto interessante è la segnalazione di un focolaio di giardiosi da consumo di acqua da bere contaminata che ha coinvolto una cinquantina di bambini presenti in una scuola e riportato, recentemente, nella città di Pescara (Ballone et al., 2001).

Per quanto riguarda gli animali, in Italia, recenti indagini epidemiologiche hanno rilevato la presenza di *Giardia* con diverse prevalenze, nei cani (Giangaspero et al., 2002; Capelli et al.,2003; Paoletti et al., 2004; Berilli et al.,2004), nelle pecore (Giangaspero et al.,2005, nei bovini (Berilli et al., 2004; Lalle et al.,2005) e in acque reflue della città di Roma (Cacciò et al., 2003). Inoltre *Cryptosporidium* è stato recentemente isolato nei cani (Paoletti et al., dati non pubblicati). Dal punto di vista epidemiologico molecolare è interessante il rilievo in questi isolati di ceppi zoonosici (Berilli et al., 2004; Paoletti et al., 2004; Giangaspero et al., 2004; 2005; Lalle et al.,2005; Paoletti et al., dati non pubblicati).

Circa 10-12 milioni di oocisti di *Toxoplasma* possono essere eliminate per 7-21 giorni (Dubey, 2004); tuttavia non è conosciuta la dose infettante minima per l'uomo. La toxoplasmosi è diffusa in tutto il mondo. In Europa, Italia compresa, il 50-80% della popolazione possiede anticorpi

anti-Toxoplasma (Dubey e Beattle, 1988; Jones et al., 2001). Focolai di toxoplasmosi, causati dall'assunzione di acqua infetta, sono stati riportati in paesi del sud America e in Canada (Beneson et al., 1982). In ambito italiano, la presenza di Toxoplasma è stata recentemente segnalata con metodiche biomolecolari in ortaggi pronti al consumo (Zanni et al., 2004). La capacità di resistenza delle cisti di Giardia non è nota in natura, ma la presenza di infezioni in mammiferi marini suggerisce che questa specie può essere resistente almeno all'esposizione alla salinità marina (Fayer, 2004). E' noto invece che le oocisti di *C. parvum* possono sopravvivere nell'acqua per lunghi periodi a temperature comprese tra 0 e 20°C (Fayer et al., 1998) e in acqua di mare artificiale, diverse specie, compreso *Mytilus galloprovincialis* per oltre 1 anno (Tamburrini e Pozio, 1999) anche a causa delle loro ridotte dimensioni e del basso tasso di sedimentazione (0.5 µm/s) (Fayer et al., 1997; Freire-Santos et al., 2000). Per quanto riguarda Toxoplasma, nell'uomo si presume che sia sufficiente la contaminazione anche con una sola oocisti (Dubey, 2004). Le oocisti infettanti di *T. gondii* sono resistenti nell'ambiente, potendo sopravvivere per almeno 18 mesi nel terreno (Frenkel et al., 1975) e nelle acque marine per parecchi mesi, anche quando esposte ad ampie variazioni di temperatura e salinità (Lindsay et al., 2003).

GIARDIA, CRYPTOSPORIDIUM E TOXOPLASMA NEI MOLLUSCHI

Per limitarci al panorama europeo, *Cryptosporidium* spp. è stato isolato in esemplari di *Ruditapes decussatus* in Portogallo (Azevedo et al., 1989), e in specie di ostriche, cozze, vongole e noci di mare nella Spagna nord-occidentale (Gomez-Couso et al., 2003), in esemplari di *Mytilus edulis* in Irlanda (Chalmers et al., 1997) e di *Mytilus galloprovincialis* nella Spagna nord-occidentale da Freire-Santos et al. (2000) e Gomez-Bautista et al. (2000). Relativamente agli aspetti molecolari e zoonosici è stato osservato che esemplari di cozze della Spagna albergavano genotipi zoonosici di *Cryptosporidium* (genotipo bovino o genotipo 2).

Per quel che riguarda l'Italia, assai recentemente, in un saggio preliminare, oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di Giardia sono state rilevate in esemplari di *C. gallina* raccolti nella costa adriatica abruzzese (Traversa et al., 2004; Giangaspero et al., 2005).

Toxoplasma gondii non è stato sinora mai segnalato in acque costiere, tuttavia attraverso metodiche molecolari è stata isolata recentemente in mammiferi marini (Miller et al., 2004) e a seguito di infezioni sperimentali in mitili, nell'ambito delle quali la presenza di questo protozoo è stata registrata per oltre 21 giorni (Arkush et al., 2003). In ambito italiano, molto interessante è il rilievo di organismi riportabili a Toxoplasma recentemente segnalata nei molluschi dell'alto Adriatico (Losio et al., 2004). Tale dato è da approfondire, poiché il mancato sequenziamento del parassita lascia il dubbio che potesse trattarsi di parassiti correlati (ad es. del genere *Sarcocystis*).

INFETTIVITA' DEI PROTOZOI

Negli ultimi anni, le tecniche biomolecolari si sono rivelate di fondamentale importanza: esse hanno, infatti, consentito il miglioramento della sensibilità delle metodiche e la determinazione delle specie e dei genotipi presenti. Tuttavia, queste metodiche hanno il limite di non poter accertare con sicurezza se i protozoi presenti sono vivi e vitali e quindi in grado di mantenere il loro potere infettante. Alcune metodiche forniscono utili indicazioni sulla vitalità dei protozoi, come ad esempio la valutazione dell'integrità e del contenuto delle cisti in immunofluorescenza e, fra le metodiche biomolecolari, la Reverse-Transcriptase PCR che mette in evidenza l'RNA messaggero, il quale è presente in forma integra solo in cellule vitali (Cacciò, 2004). Tuttavia,

una volta valutata la vitalità del protozoo, non possiamo ancora stabilire se questo ha mantenuto il suo potere infettante. L'unica prova in grado di eliminare tale dubbio è l'infezione sperimentale, con i protozoi isolati, di animali di laboratorio e la successiva dimostrazione dell'avvenuta infezione. Prove dirette in questo senso sono effettuate con ottimi risultati anche nei protozoi parassiti oggetto della presente indagine (Fayer et al.,2004).