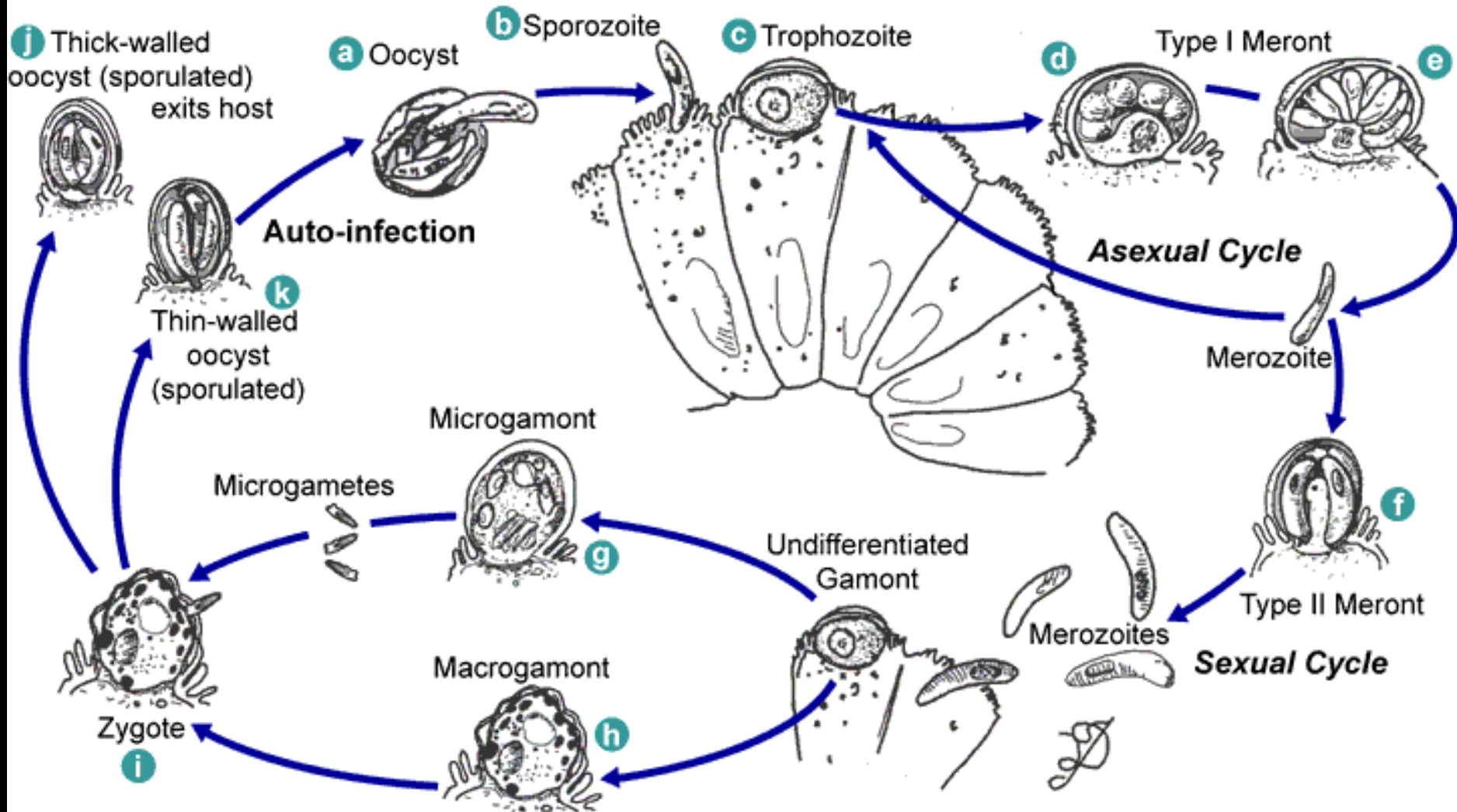


Malattie da protozoi "idrodiffusi"

Giardiosi e Criptosporidiosi



Cryptosporidium parvum



A differenza degli altri coccidi:

- non penetra all'interno delle cellule
- gli sporozoiti invadono il bordo dei microvilli degli enterociti (vescicola parasitofora)
- schizonti (4-8 merozoiti)
- sporulazione avviene nell'intestino dell'ospite
- possibile l'autoinfestazione

CRIPTOSPORIDIOSI

Patogenesi

Non si verifica la rottura della cellula

✓ alterazioni dell'ileo ben evidenti

- riduzione delle dimensioni dei villi
- rigonfiamento e fusione dei villi colpiti
- alterazioni della funzionalità



Cryptosporidium spp.

<i>C. parvum</i> genotipo bovino (C)	mammiferi, uccelli
<i>C. parvum</i> genotipo umano (H)	mammiferi
<i>C. wrairi</i>	mammiferi
<i>C. meleagridis</i>	mammiferi, uccelli
<i>C. felis</i>	mammiferi
<i>C. canis</i>	mammiferi
<i>C. saurophilum</i>	rettili
<i>C. baileyi</i>	uccelli
<i>C. muris</i>	mammiferi
<i>C. andersoni</i>	mammiferi
<i>C. blagburni</i>	uccelli
<i>C. serpentis</i>	rettili
<i>C. nasorum</i>	pesci

immunocompromessi suscettibili a diverse specie e genotipi

Prevalenza nell'uomo	1-4% (Europa- USA)
con gastroenterite	3-20% (Asia, Africa, Australia)
Sieroprevalenza	25-35%
	95% (Sud America)

- incubazione di circa 7 gg
- durata infezione 7-14 gg
- media oocisti 10^6 /g di feci
- 6×10^9 oocisti/infezione
- durata escrezione oocisti:
 - 2 sett. (nell'82% dei casi)
 - 3 sett. (42%)
 - 1 mese (21%)
- Sviluppo di parziale resistenza alle reinfezioni

ID₅₀ per uomo:

(Teunis *et al*, 1996)

132 oocisti

Relazione tra probabilità d'infezione (Pi) e dose infettante

$$P_i = 1 - e^{-r \times \text{dose}}$$

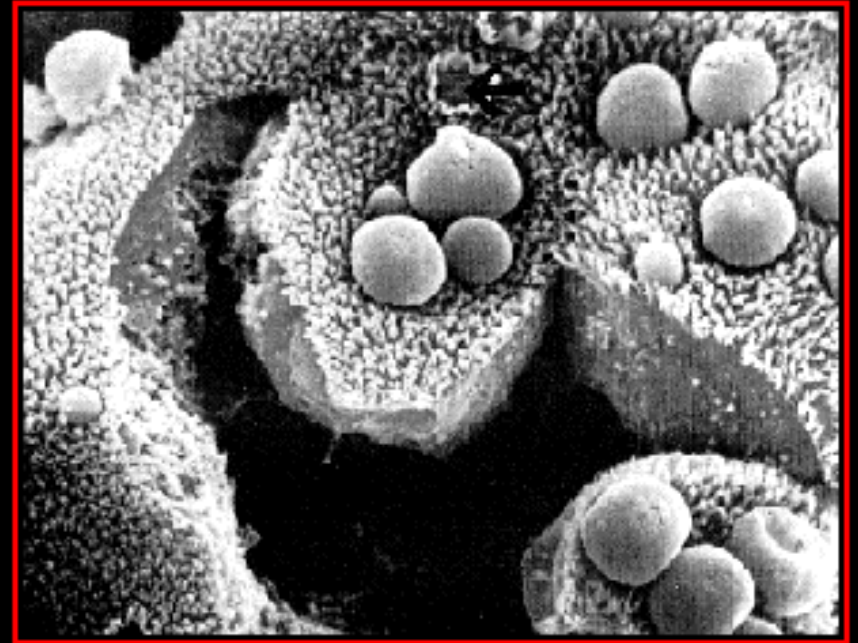
(r = parametro dose-risposta specifico per ogni ceppo di *C. parvum*)

30 oocisti = **20%** Pi

1000 oocisti = **100%** Pi

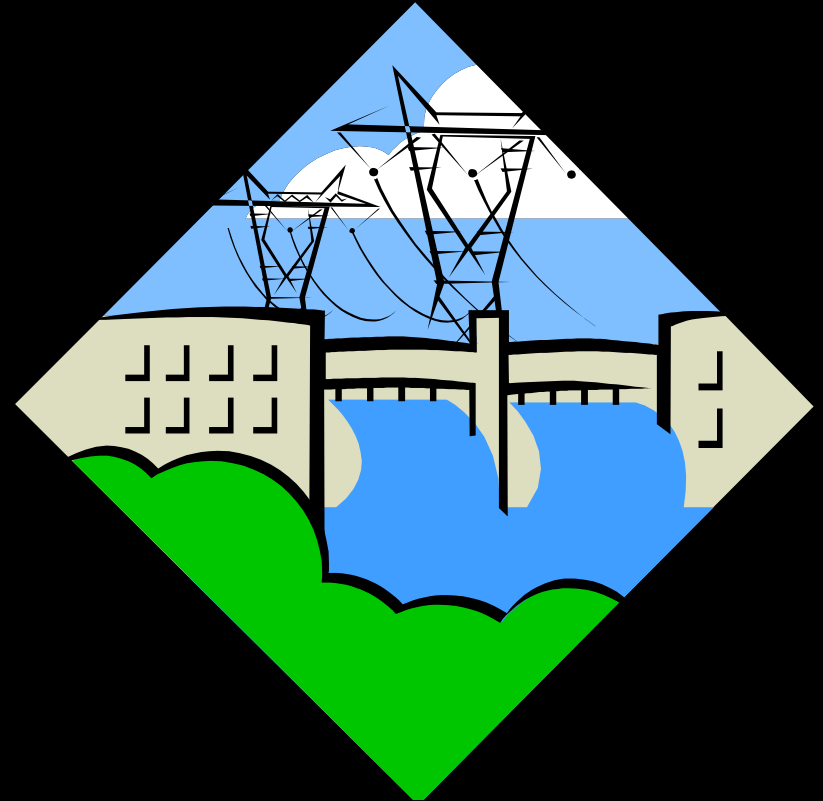
resistenza delle oocisti

- alla clorazione
delle acque potabili,
piscine
- relativa acido-resistenza (sidro di mele)



fonti di infezione

- acqua
- cibo
- contatto diretto con individuo malato



fonti di infezione: acqua potabile



- probabilmente la più frequente
- tutti gli anni focolai negli USA
- il più famoso quello del South Milwaukee con più di 400.000 infettati nel 1993

fonti di infezione: acqua potabile



- contaminazione delle fonti da piogge forti o scioglimento della neve
- contaminazione dei pozzi con acque di scolo
- inadeguato trattamento
- problemi nel sistema di distribuzione

fonti di infezione: acque ricreative

- anche in acque clorate adeguatamente
- contaminazione da bambini o individui incontinenti



fonti di infezione: alimenti

- sidro fresco
- latte mal pastorizzato
- insalata di pollo
- cipolle crude
- vegetali e frutta manipolata da cuoco infetto
- volatili da cortile
- ostriche e altri molluschi

fonti di infezione: contatto diretto

- uomo-uomo
- da animale (specie vitello, focolaio famoso che ha coinvolto studenti di veterinaria)
- cani, gatti e tacchini (pochi casi)

An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. Am Coll Health. 2003 Mar;51(5):213-5.

Preiser G, Preiser L, Madeo L.

Delhi College, the State University of New York, Delhi, USA.

The authors describe an **outbreak of cryptosporidiosis among students working with calves** as part of their veterinary science technology program. After an off-campus provider identified an index case, school authorities requested cryptosporidium (crypto) as part of the stool ova and parasite examination of all students presenting to the college health center with significant gastroenteritis. Thirteen students submitted stool specimens that were examined for crypto; 7 were positive, and all were from veterinary science students. **One of the calves used in the program also tested positive for crypto.** All of the students were immunocompetent and recovered uneventfully. The outbreak was contained by strictly enforcing infectious-disease precautions in the calf barn. **The authors recommend considering crypto as a cause of gastroenteritis, especially among farm-animal workers,** and urge strict infectious disease precautions for those who attend to livestock.

PMID: 12822713 [PubMed - indexed for MEDLINE]

bambini e malnutrizione

- sembra che i bambini malnutriti abbiano una > possibilità di sviluppare diarrea persistente
- > P fra 3-36 mesi (25%)
- isolati *C. parvum* ed anche *C. meleagridis*

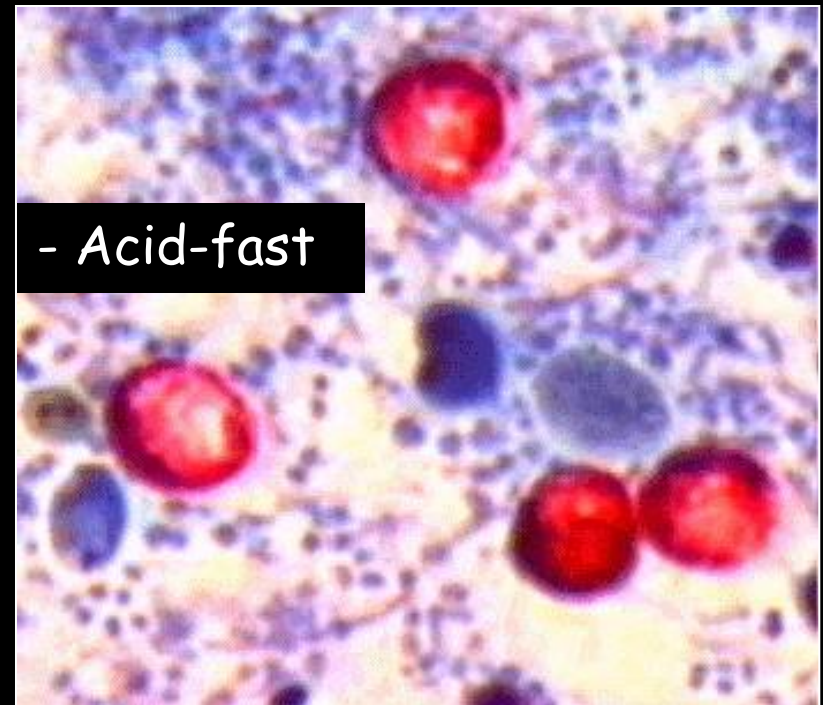
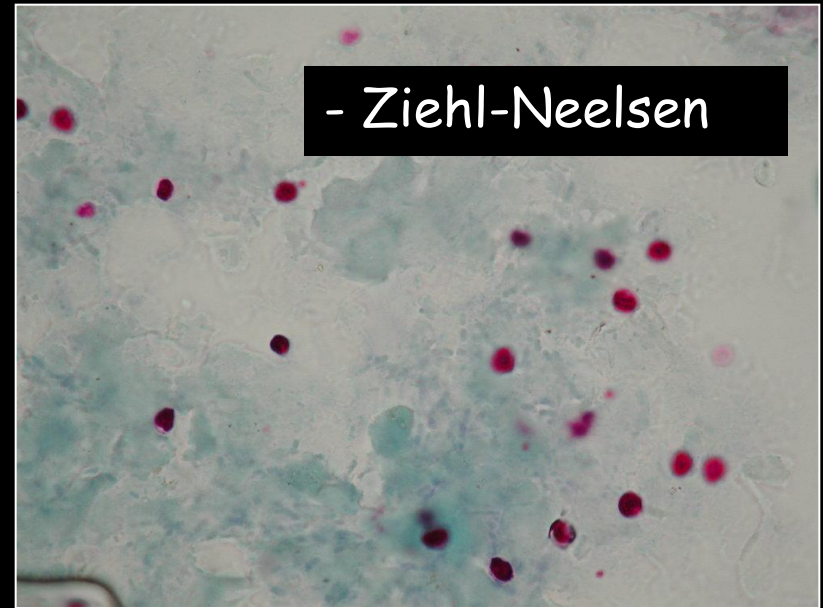
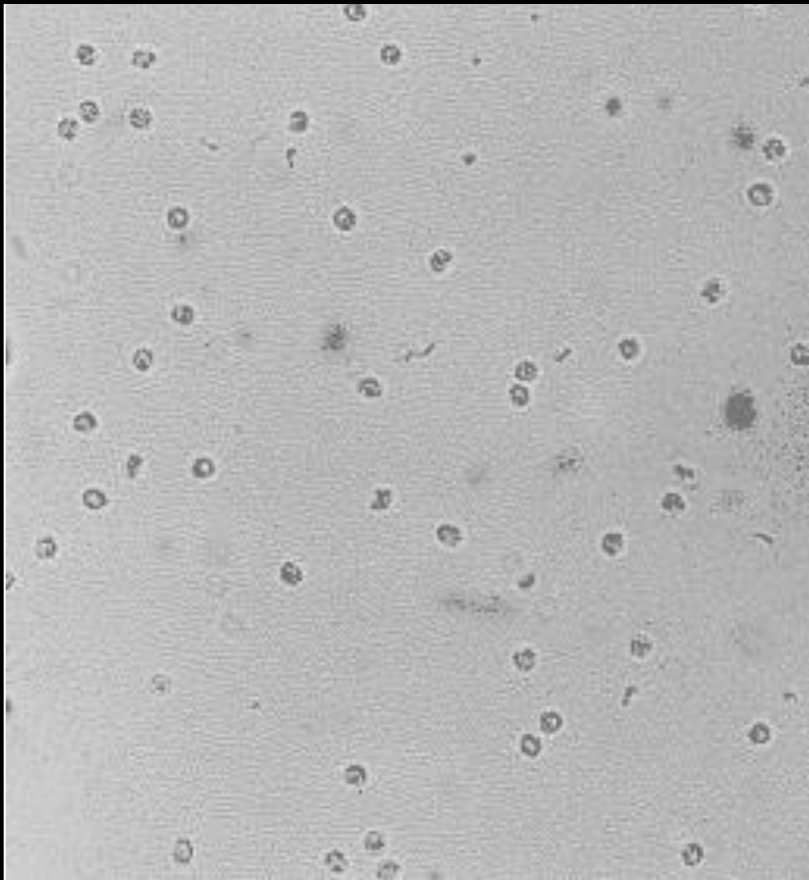
- uno dei principali responsabili di diarrea neonatale nel vitello
- comune nelle pecore, suini e capre
- ritrovato nel cane, gatto ed equino dove non sembra causare diarrea
- animali selvatici contribuiscono a contaminare l'ambiente

CRIPTOSPORIDIOSI

Diagnosi

Esame coprologico

- flottazione
- esame a fresco con carbol-fucsina



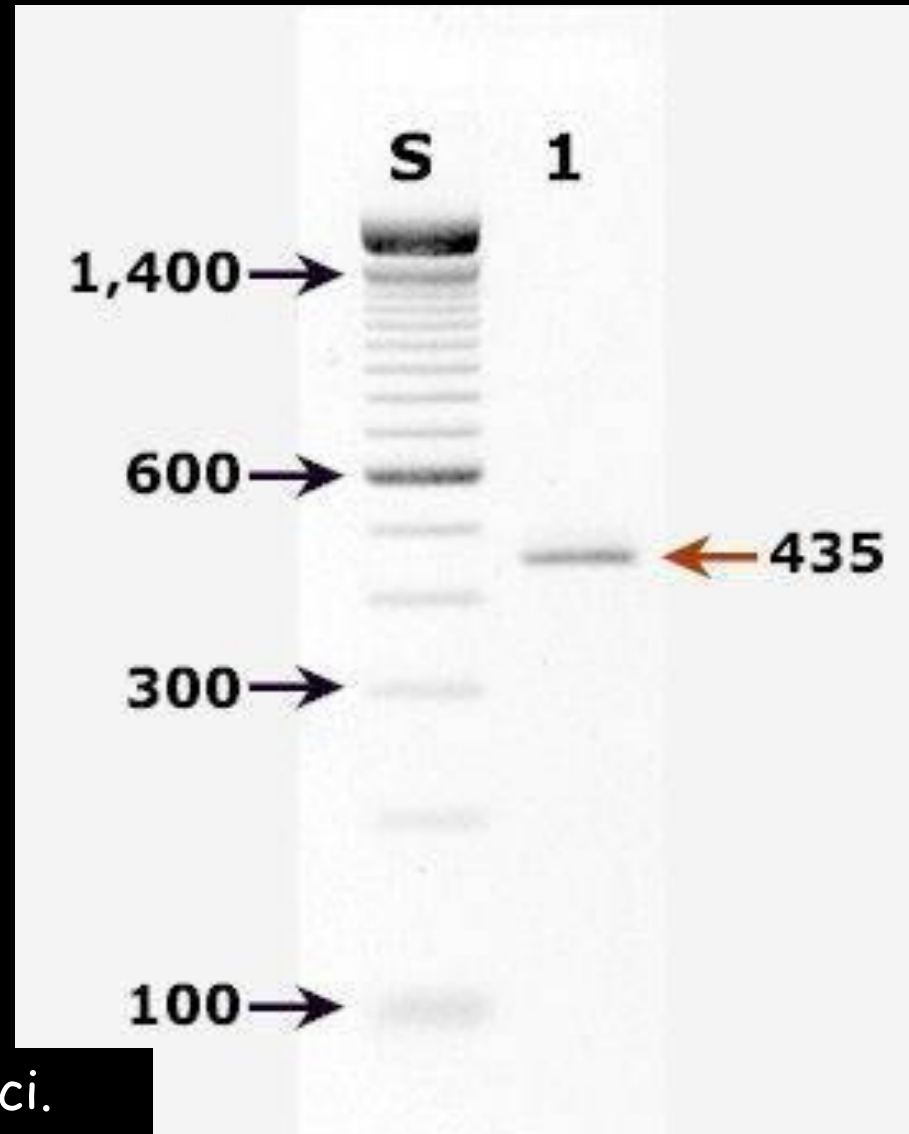
Ricerca coproantigeni

immunofluorescenza



PCR

sensibilità 6 oocisti per g di feci.



Cryptosporidium
parvum

Giardia lamblia

- degli oltre 150 farmaci antimicrobici provati negli animali e nell'uomo, nessuno ha dato risultati soddisfacenti
- in parte per la scarsa conoscenza della biologia cellulare e molecolare di questo parassita

- paromomicina, siero iperimmune riducono i sintomi

nitazoxanide?

Profilassi

Uomo

- sistemi di sedimentazione e filtrazione delle acque associati alla disinfezione
- eliminazione sanitaria delle feci umane e uso di letame "maturo" nei campi
- non bere acqua del rubinetto in aree dove non è garantita

Animali

- colostro
- colostro iperimmune di vacca utilizzato anche in medicina umana
- vitelli in ambienti separati per le prime 2-3 settimane di vita



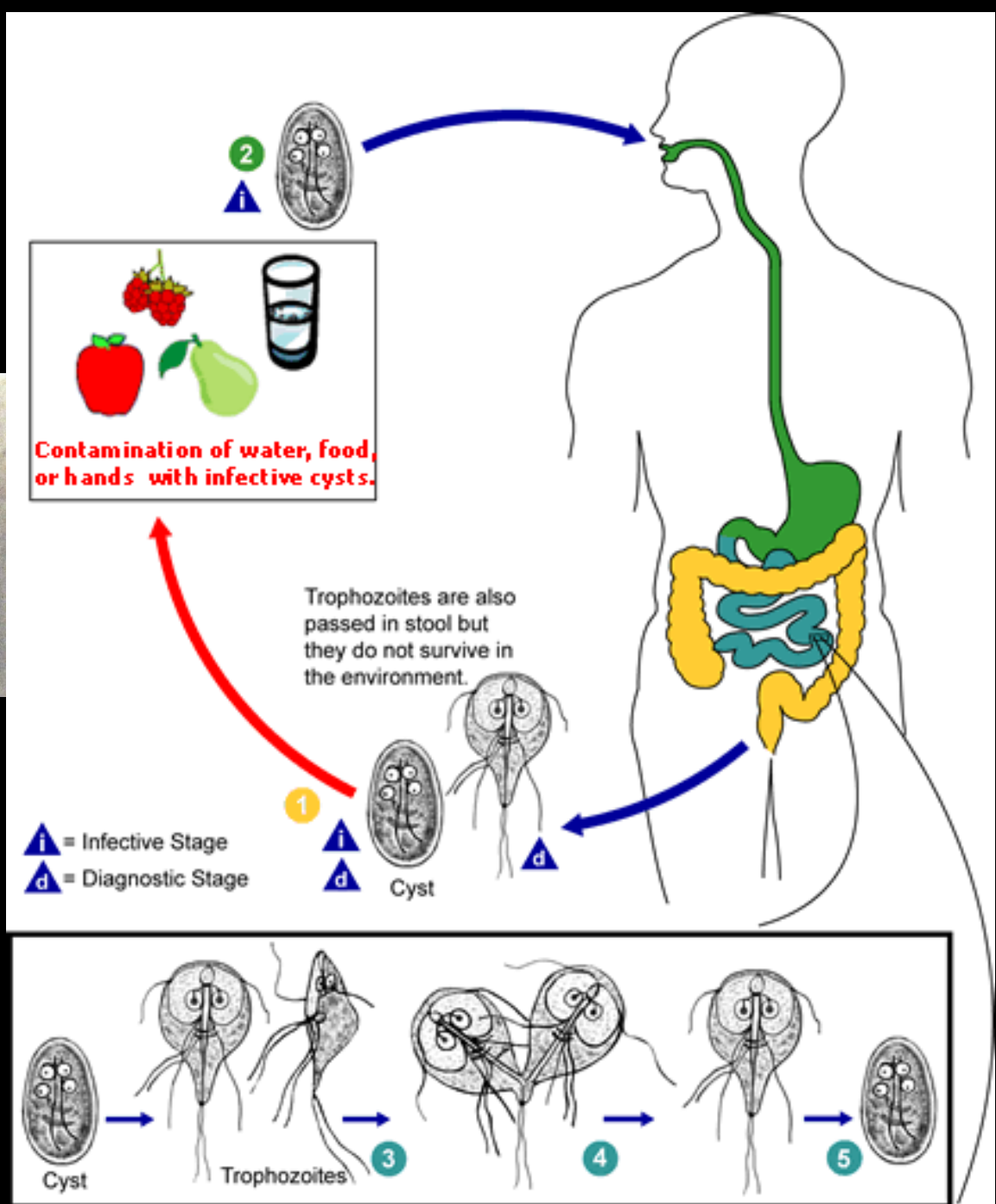
- trattamento delle acque
 - la via più sicura è il calore: 72°C per 1'
 - filtrazione (maglia < 1 micron)

Giardiosi

Sostenuta da
protozoo flagellato
che parassita
l'intestino tenue...



...dell'uomo e di più
di 40 specie di
animali domestici
e selvatici



GIARDIOSI

Giardia spp.

Trofozoita 9-21 x 5-15 μ



8 flagelli (6 emergenti dal corpo)

disco adesivo

2 nuclei

GIARDIOSI

cisti 7-10 μ

forma ovalare, 4 nuclei



Giardia spp.

SPECIE	OSPITI	DIMENSIONI TROFOZOITA (μM)
<i>G. duodenalis</i> (sin. <i>G. intestinalis</i> , <i>G. lamblia</i>)	uomo, numerosi animali domestici e selvatici	12-15 x 6-8
<i>G. agilis</i>	anfibi	20-29 x 4-5
<i>G. muris</i>	roditori	9-12 x 5-7
<i>G. psittaci</i>	uccelli	14 x 6
<i>G. ardeae</i>	uccelli	10 x 6.5
<i>G. microti</i>	roditori	

Giardia duodenalis

Assemblaggi

Ospiti

- A** **Uomini**, castori, gatti, lemuri, pecore, vitelli, cani, cincillà, alpaca, cavalli, maiali, bovini
- B** **Uomini**, castori, porcellini d'india, cani, scimmie
- C** Cani
- D** Cani
- E** Vacche, pecore, alpaca, capre, maiali
- F** Gatti
- G** Ratti

Nell'uomo:

- periodo di prepatenza 12-19 gg
- sintomi appaiono da 1 a 75 giorni dopo l'infezione, ma in genere fra 6-15 gg
- durata dell'infezione 2-4 settimane
- infezione cronica nel 30-50% dei soggetti, con diarrea intermittente

- ID₅₀ per l'uomo: **25-100 cisti**; anche **10** (Rendtorff, 1954)
- Alcuni pazienti possono eliminare **900.000.000 di cisti/giorno!!**
(6 × 10⁹ oocisti/infezione)
- importanza di portatori asintomatici: **16-86%** degli infetti (Farthing, 1994)

Importanza

- diffusione cosmopolita
- una delle cause più frequenti di diarrea umana ed animale di natura non-virale
- una delle cause più comuni della diarrea del viaggiatore
- uno dei maggiori patogeni parassitari enterici HIV + associati

Importanza

- in USA più 100 focolai umani causati dalla contaminazione delle acque
- anche in Australia, Canada, Nuova Zelanda, Svezia, Germania e UK

... per clorazione insufficiente, filtrazioni inadeguate, contaminazioni con scarichi, ...

Diffusione

1. -Aree in via di sviluppo-
prevalenza: 200 milioni (sintomatici)
incidenza: 500.000 nuovi casi/anno
2. - Paesi industrializzati -
infezione ri-emergente (bambini)
la più comune infezione parassitaria

GIARDIOSI

Categorie a rischio

- bambini
- turisti
- immunodepressi
- canoisti
- tutti coloro che non hanno accesso a fonti di acqua potabile (livello socio-economico)



Cause di diarrea nei bambini in Italia

- Rotavirus (23.6%)
- *Salmonella* (19.2%)
- *Campylobacter* (7.9%)
- *E. coli*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium* e *Giardia* in un numero limitato di casi

In Italia nell'uomo in generale

- tasso d'infezione stimato di circa l'8%
- lavoratori (n=160) presso mense controllati per circa 4 anni:
 - 1,9%-5,6%
 - molti pazienti hanno mostrato ricadute ed infezioni ricorrenti anche dopo terapia

Categorie a rischio

HIV-sieropositivi (in ambiente endemico)

- fra le infezioni intestinali:
 - *Cryptosporidium parvum* (10.8%)
 - *Giardia duodenalis* (8.3%)
 - *Cyclospora cayetanensis* (3.3%)
 - *Blastocystis hominis* (3.3%)
 - *Isospora belli* (2.5%)
 - *Enterocytozoon bieneusi* (2.5%)
 - *Entamoeba histolytica/dispar*

GIARDIOSI

Categorie a rischio: HIV-infetti (in Italia)

	con diarrea	asintomatici
<i>Cryptosporidium parvum</i>	21.54%	3.37%
<i>Giardia duodenalis</i>	6.15%	2.25%
Microsporidi	9.23%	1.12%
<i>Blastocystis hominis</i>	10.77%	10.11%
<i>Isospora belli</i>	1.54%	-

Brandonisio et al,
1999

Negli animali

- in USA % d'infezione nei vitelli delle aziende da latte fino al 100% in certi casi
- nei cani e nei gatti prevalenze variabili, ma in certi paesi (Australia) *Giardia* è oggi il parassita intestinale più comune
- associata alla giovane età e alle condizioni di affollamento

GIARDIOSI

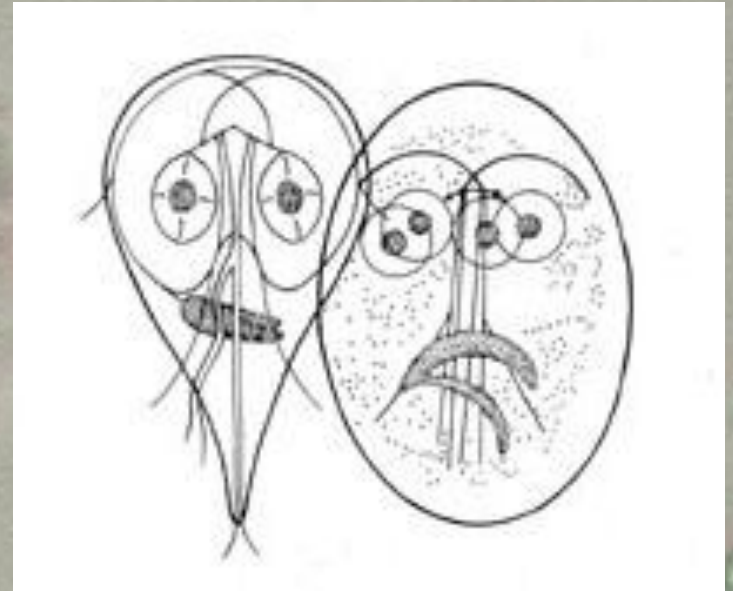
Cani in Veneto

Provenienza	cani (n)	Parassiti positivi (prevalenza)				
		<i>Giardia</i>	<i>Isospora</i>	<i>T.vulpis</i>	<i>T.canis</i>	<i>D.canin.</i>
cani di proprietà	58	10 (17.2%)	6 (10.3%)	2 (3.4%)	3 (5.2%)	1 (1.7%)
canile	58	11 (19%)	3 (5.2%)	36 (62.1%)*	5	1 (1.7%)
totale	116	21 (18.1%)	9 (7.8%)	38 (32.8%)	8 (6.9%)	2 (1.7%)

GIARDIOSI

Diagnosi

- esame coprologico
- ricerca copro-antigeni
- PCR
- biopsia duodenale
- ricerca nelle acque



GIARDIOSI

ESAME COPROLOGICO

Messa in evidenza dei trofozoiti e delle cisti (casi acuti) nelle feci, o solo delle cisti (casi cronici) tramite:

- esame coprologico diretto
- dopo concentrazione
- colorazione con Lugol

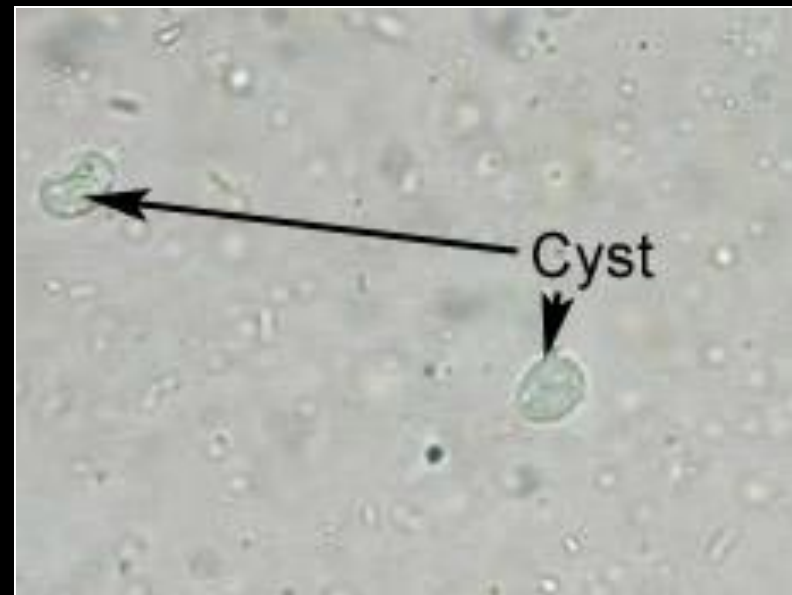
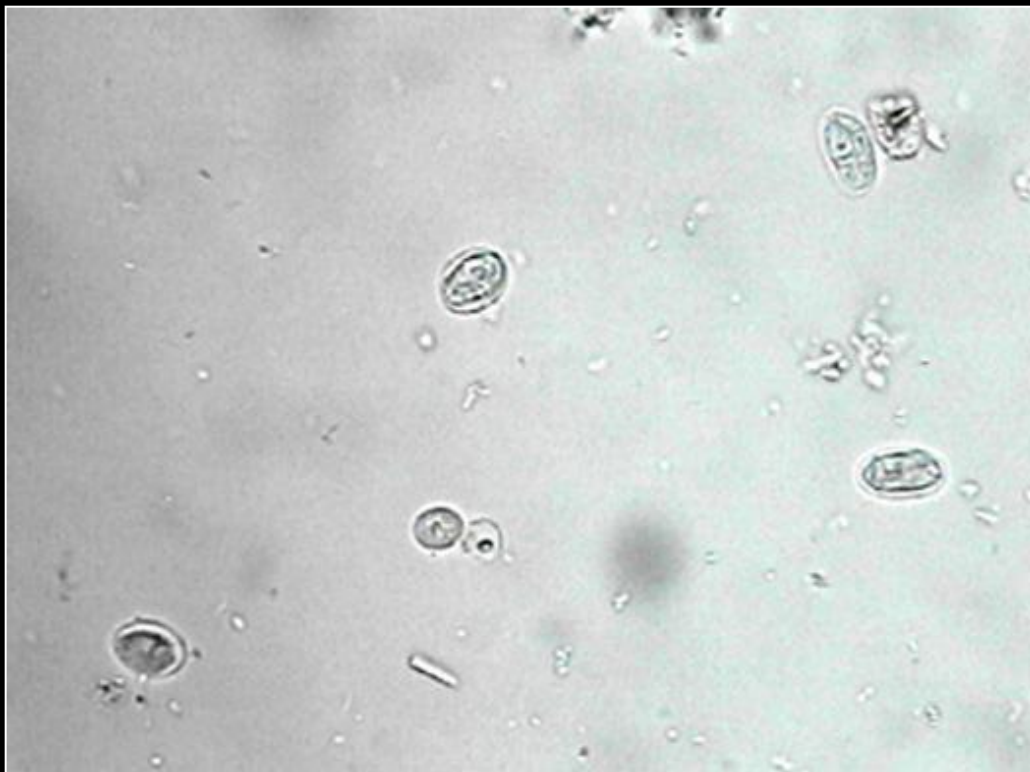
esami ripetuti 3 volte a giorni alterni



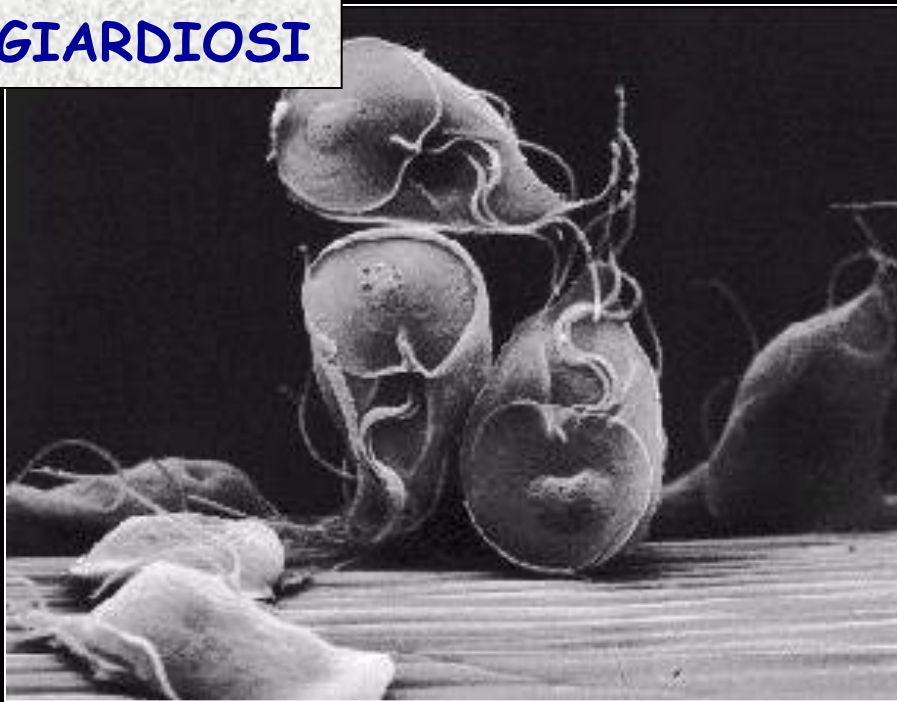
- vantaggi:
 - procedura veloce e facile
 - poco costoso
- svantaggi:
 - poco sensibile (basse cariche)
 - dipende da capacità operatore
 - lungo da leggere

GIARDIOSI

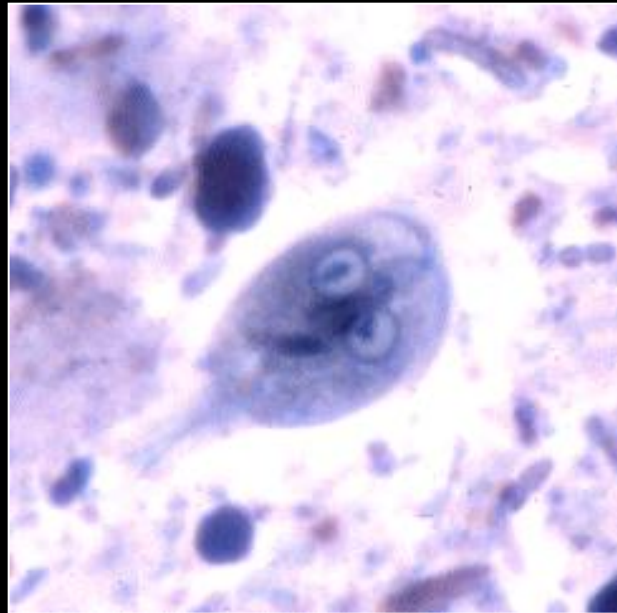
CISTI



GIARDIOSI



TROFOZOITI



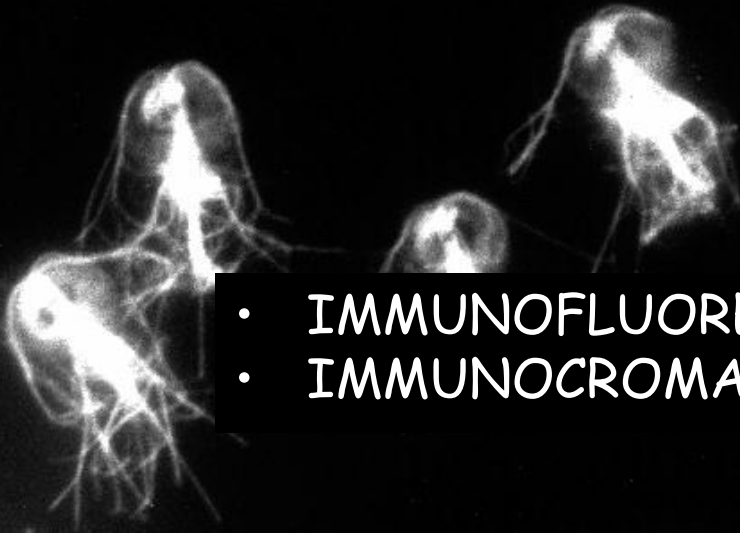
GIARDIOSI

RICERCA COPROANTIGENI (GSA-65)

- ELISA

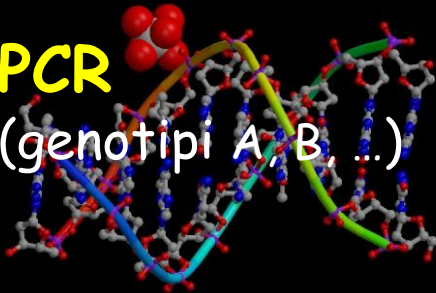


(kit con *Cryptosporidium*)



- IMMUNOFLUORESCENZA
- IMMUNOCROMATOGRAFIA

PCR
(genotipi A, B, ...)



**RICERCA E
QUANTIFICAZIONE
CISTI NELLE ACQUE**



Giardia duodenalis

Terapia

- Derivati nitroimidazolici (**metronidazolo**)
- Derivati aminoacridinici (**chinacrina, quinacrina**)
- Derivati nitrofuranici (**furazolidone**)
- Derivati Benzimidazolici (**albendazolo, fenbendazolo, oxfendazolo, mebendazolo**)
- Derivati dell'imidazolo (**tinidazolo**)

Giardia duodenalis profilassi

eliminazione sanitaria delle feci umane e uso di letame "maturo" nei campi

sistemi di sedimentazione e filtrazione delle acque associati alla disinfezione

non bere acqua del rubinetto in aree dove non è garantita

vaccino ad uso veterinario disponibile (lisato proteico di trofozoiti) in U.S.A. per cani e gatti



Vet Parasitol. 2000 Apr 28;89(3):209-18. **Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiasis on cyst excretion, clinical signs and production.** O'Handley RM, Cockwill C, Jelinski M, McAllister TA, Olson ME. Gastrointestinal Research Group, University of Calgary, Canada.

In this 90-day study, **60 male Holstein dairy calves were experimentally infected with *Giardia duodenalis*.** Calves were randomly blocked by weight into **treatment (N=30) and placebo (N=30)** groups. Beginning on study Day 0, calves in the treatment group were administered an oral dose of **5mg/kg of fenbendazole once daily for three consecutive days.** Calves in the placebo group received a daily oral treatment of 5 ml of saline for 3 days. These treatments were repeated on Days 30 and 60 of the study. Fecal samples were collected from calves once per week and examined for the presence of *Giardia* cysts. Calves were monitored daily for clinical signs of intestinal disease and all episodes of diarrhea recorded. Calves were weighed once per week and total feed intake, on a dry matter basis, was calculated daily. Following each treatment, the number of calves shedding *Giardia* cysts in the fenbendazole group was reduced ($p < 0.001$) compared to the saline group. Also, calves in the fenbendazole group had fewer cysts ($p < 0.05$) detected in their feces following treatment compared with calves that received saline. Within 2 weeks post treatment, the number of infected animals and fecal *Giardia* cysts returned to placebo levels. This pattern of reinfection was consistent after every treatment period. Calves receiving fenbendazole had fewer total days with diarrhea ($p < 0.01$) and the average number of days each calf had diarrhea was reduced ($p < 0.05$), compared to the placebo group. There were no differences in mean body weight, average daily gain, or feed intake between the treatment or placebo groups. This study demonstrates that **fenbendazole is an effective treatment for giardiasis, resulting in a clinical benefit and reducing the number of infective cysts shed by calves.** However, this treatment regime had no impact on production parameters and reinfection occurred rapidly in these calves.

Vet Parasitol. 1997 Mar;68(4):375-81. **Giardia and Cryptosporidium in Canadian farm animals.** Olson ME, Thorlakson CL, Deselliers L, Morck DW, McAllister TA. Gastrointestinal Research Group, University of Calgary, Alta, Canada. molson@acs.ucalgary.ca

Giardia intestinalis and *Cryptosporidium* spp. are commonly identified intestinal pathogens in humans and animals. In light of the clinical disease, production losses and zoonotic potential of both *Giardia* and *Cryptosporidium* infections, a study was undertaken to investigate the prevalence of these parasites in cattle, sheep, pigs and horses in Canadian farms at different geographical locations. A total of 104 cattle, 89 sheep, 236 pigs and 35 horses were sampled from 15 different Canadian geographical locations. Fecal samples were examined after concentration and immunofluorescent staining. *Giardia* and *Cryptosporidium* were present in cattle and sheep in six out of six sites sampled. In cattle the overall prevalence was 29% for *Giardia* and 20% for *Cryptosporidium*. *Giardia* was identified in 38% of sheep while 23% of sheep were positive for *Cryptosporidium*. *Giardia* and *Cryptosporidium* were identified in four out of six hog operations with an overall prevalence of 9% for *Giardia* and 11% for *Cryptosporidium*. All horse sampling locations (4/4) were positive for *Giardia* with 20% of animals infected. *Cryptosporidium* was identified in three out of four sampling sites with a prevalence of 17%. The prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* was greater in calves and lambs compared to adults. This study demonstrates that both *Giardia* and *Cryptosporidium* appear to be prevalent in farm livestock. PMID: 9106959 [PubMed - indexed for MEDLINE]

J Dairy Sci. 1995 May; 78(5):1068-72.

Cryptosporidium muris: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy.

Esteban E, Anderson BC.

University of California at Davis, School of Veterinary Medicine,
Tulare 93274, USA.

A total of 1746 individual fecal samples were obtained from milking cows during three separate visits to a drylot dairy farm. In addition, 1240 fecal samples were also obtained from cows in four additional farms. *Cryptosporidium muris* was prevalent in all five herds sampled. Cows that were sampled more than once invariably remained in the same shedding category. Cows shedding *C. muris* oocysts produced significantly less milk (approximately 3.2 kg/d). After corrections for the effects of age, parity, pen, and DIM in a logistic regression model, mean daily milk production was significantly associated with shedding status.

PMID: 7622718 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Am J Vet Res. 1995 Nov;56(11):1470-4. **Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model.** Olson ME, McAllister TA, Deselliers L, Morck DW, Cheng KJ, Buret AG, Ceri H. Gastrointestinal Research Group, University of Calgary, Alberta, Canada.

OBJECTIVE--To examine the effects of giardiasis on production and carcass quality, using growing lambs as a domestic ruminant model. **DESIGN**--Randomized block. **ANIMALS**--Giardia-free lambs: 23 in infected group, 24 in control group. **PROCEDURE**--Six-week-old, specific-pathogen-free lambs were infected with *Giardia* trophozoites; control lambs received saline solution. Clinical signs of infection, body weight, and feed intake were determined for 10 weeks. Carcass weight and quality were determined at slaughter weight of 45 kg. **RESULTS**--*Giardia* infection persisted from weeks 7 to 16. For 5 weeks after challenge exposure, abnormal feces were more frequently observed in infected lambs. *Giardia* infection was associated with a decrease in rate of weight gain and impairment in feed efficiency. Time to reach slaughter weight was extended in infected lambs, and the carcass weight of *Giardia*-infected lambs was lower than that of control lambs. **CONCLUSION**--*Giardiasis* has a negative effect on domestic ruminant production. **CLINICAL RELEVANCE**--*Giardiasis* in domestic ruminants is an economically important disease, thus necessitating control or elimination of the infection.

PMID: 8585658 [PubMed - indexed for MEDLINE]

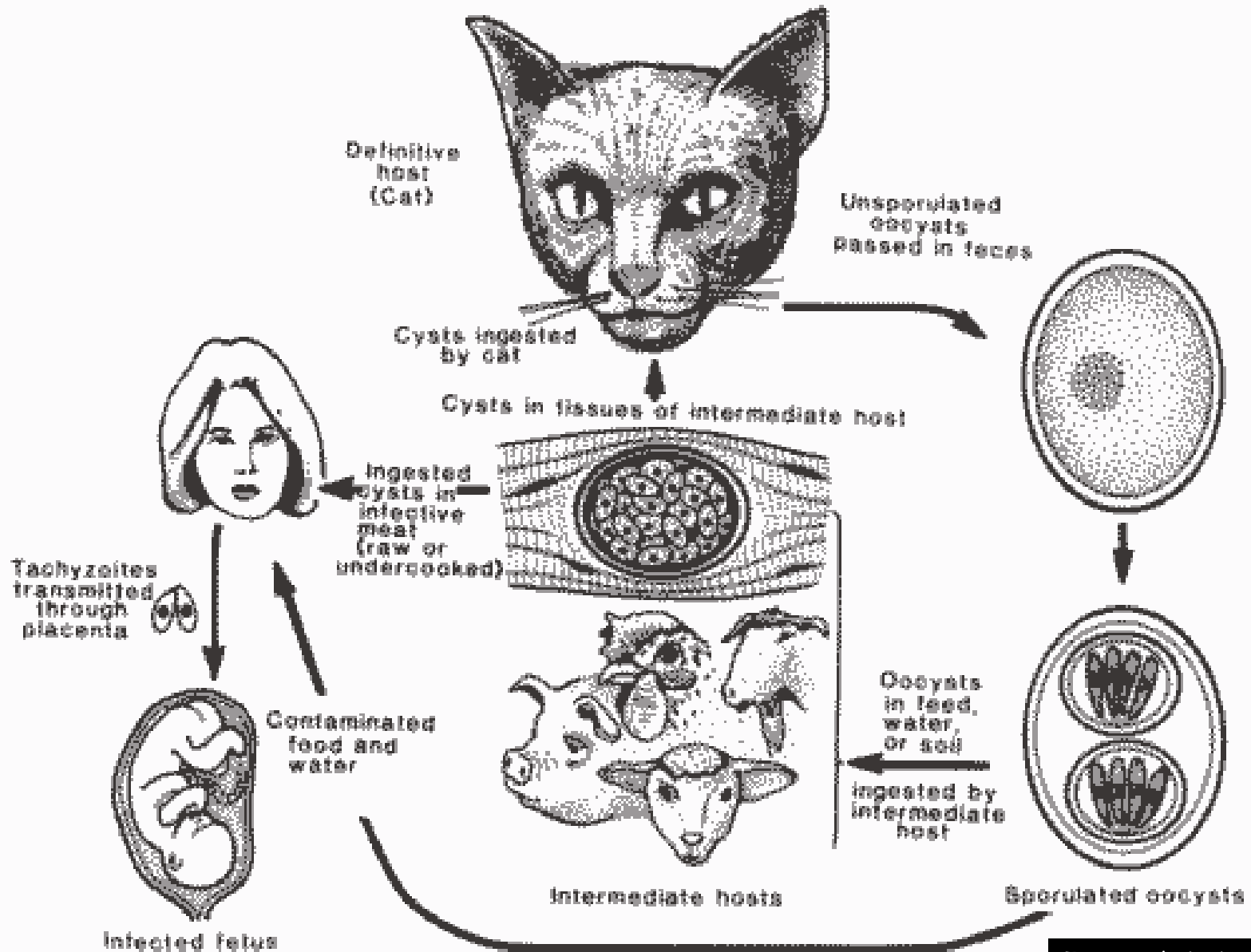


Table 1 Range of prevalence (in percentages) of *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* in different host species in Italy

Host	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>
Humans	0.9–6.15	0.84–11
Dogs	3.6–80	3.3
Cats	5.6–15.8	–
Cattle	66.6 ^a	58.3 ^a
Sheep	1.5	–
Water	30 ^a	24.4 ^a
buffaloes	18.1	14.7
Horse	13	8
Pigs	–	10.3–19.8
Poultry	–	26
Fallow deer	11.5	–

^aPrevalence on farms

Toxoplasma gondii



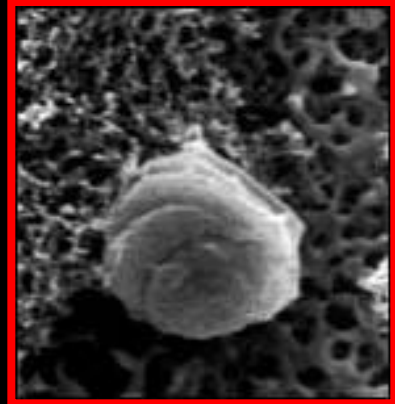
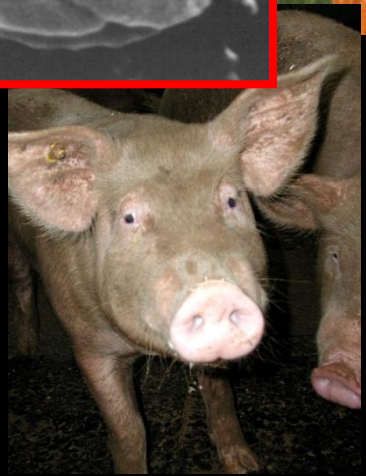
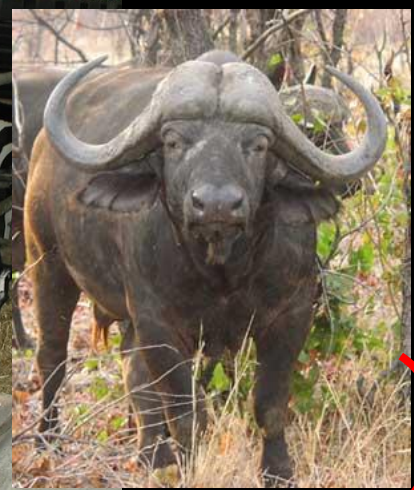
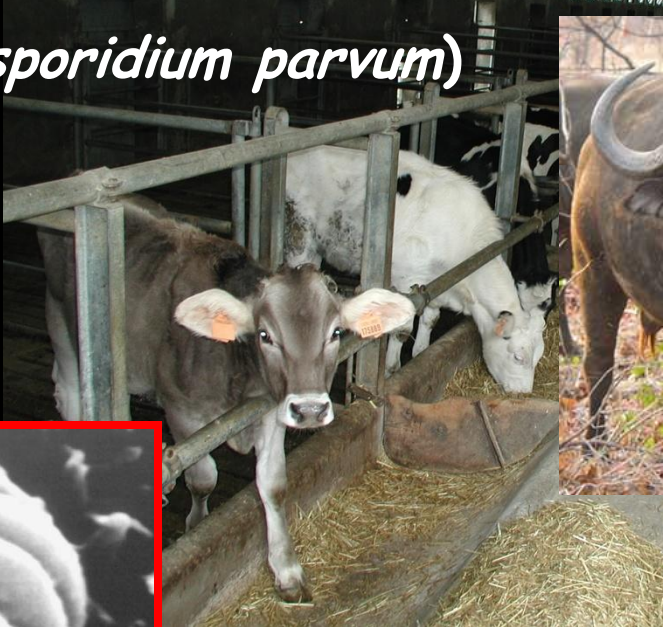
Toxoplasma gondii

NEL GATTO

1 CISTI sufficiente x infettare gatto

50% dei gatti ha avuto contatto
con *Toxoplasma* (Kijstra *et al.*, 2006)

Criptosporidiosi (*Cryptosporidium parvum*)



Giardiosi (*Giardia duodenalis*)



Toxoplasmosi (*Toxoplasma gondii*)



Contaminazione ambientale da cisti di *Giardia duodenalis*...una stima...?



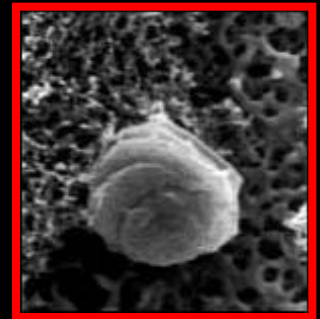
Ospiti	Popolazione (n.)	Positivi ^(a) (n.)	Cisti/ospite/giorno (n.)	Totale cisti/giorno (miliardi)
Uomini	59.000.000	531.000	100.000.000 ^(b)	53.100
Cani (proprietà)	5.800.000	208.800	?	?
Gatti	6.600.000	369.600	?	?
Bovini	6.300.000	? ^(c)	?	?
Bufali	250.000	45.250	?	?
Cavalli	200.000	26.000	?	?

^(a) Considerando i valori minimi di prevalenza riportati da Giangaspero *et al*, 2007

^(b) Alcuni individui possono eliminare fino a 900.000.000 cisti/giorno

^(c) disponibili solo positività per azienda

Contaminazione ambientale da oocisti di *Cryptosporidium parvum*...una stima...?



Ospiti	Popolazione (n.)	Positivi ^(a) (n.)	Cisti/ospite/giorno (n.)	Totale cisti/giorno (miliardi)
Uomini	59.000.000	495.600	100.000.000	49.560
Cani (proprietà)	5.800.000	191.400	?	?
Bovini	6.300.000	? ^(b)	?	?
Bufali	250.000	36.750	?	?
Suini	9.300.000	957.900	?	?
Cavalli	200.000	16.000	?	?

^(a) Considerando i valori minimi di prevalenza riportati da Giangaspero *et al*, 2007

^(b) disponibili solo positività per azienda

Contaminazione ambientale da (oo)cisti emesse dall'uomo...una stima...?

Cisti di *Giardia*: 53.100 miliardi

~176.000.000/km²

(~900.000/abitante)

Oocisti di *Cryptosporidium*: 49.560 miliardi

~164.000.000/km²

(~840.000/abitante)

+ "contributo" di altre specie ospite...!!! Ad es:

Nei bovini: $6,67 \times 10^{16}$ (oo)cisti di *Giardia e*

Cryptosporidium/anno/animale (Robertson, 2007)



Contaminazione ambientale da oocisti di *Toxoplasma gondii*...una stima...?

Difficile, ma...



1 CISTI sufficiente x infettare gatto

50% dei gatti ha avuto contatto
con *Toxoplasma* (Kijstra *et al.*, 2006)

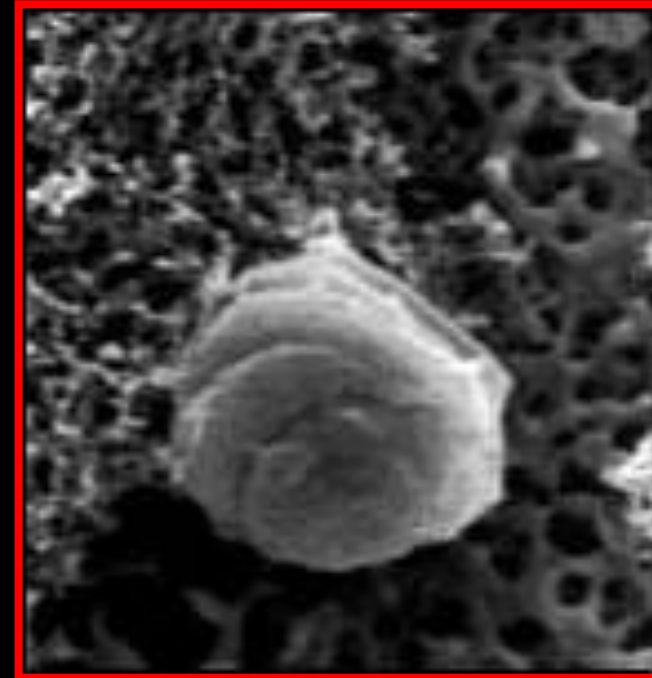
1 gatto elimina fino a 100 milioni di oocisti/giorno

Resistenza oocisti

- Nell'acqua: da **3-6 mesi** (temp. ambiente) a **più di 1 anno** (a +4°C), anche in acqua di mare
- alla clorazione delle acque potabili, piscine
- **5'** a 60°C, **5"** a 72°C
- **24 ore** a -20°C
- relativa acido-resistenza (sidro di mele)

Più efficaci:

- Ammoniaca
- Associazioni cloro+monocloramine, ozono+monocloramine
- Ozono + UV



Resistenza cisti:

- 2 mesi in acqua a 4-8°C
- 4 gg. a 37°C
- soluzione salina 2%

Meno resistenti di *Cryptosporidium* a:

- cloro
- ozono.

Resistenza oocisti:

- vitali per 2 anni in soluzione acquosa di acido solforico al 2% o di bicromato di potassio al 2,5% a +4°C;
- all'ipoclorito di sodio e all'ozono
- > 6 mesi in acqua marina
- inattivate da radiazioni ultraviolette e gamma.

Art 2 Dlgs 152/1999:

Acque reflue domestiche: da insediamenti residenziali e servizi derivanti dal metabolismo umano

Acque reflue industriali: da attività commerciali o di produzione di beni

Acque reflue urbane: miscuglio acque reflue domestiche, industriali, meteoriche di dilavamento

Allevamento di animali: scarico di deiezioni e acque di lavaggio definito

"produttivo" - secondo Dlgs 152/1999 → scarico industriale

In via eccezionale (**Art 38 Dlgs 152/1999**) assimilabile alle acque domestiche se:

- equilibrio tra PV e superficie agricola;
- condizioni del sottosuolo che evitino la contaminazione di falda;
- effettiva richiesta d'uso di concimazione



Distribuzione

Giardia e Cryptosporidium in acque di falda



Table 3 *Giardia* and *Cryptosporidium* in groundwater in Italy

Region	Years	Number of samples	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>		References
			Positive samples (%)	Mean cyst N/L±SD	Positive samples (%)	Mean oocyst N/L	
Lazio	2001–2002	14	0	0	0	0	Briancesco and Bonadonna 2005
Apulia	2004–2005	18	2 (11.1)	0.28±0.31	0	0	Lonigro et al. 2006
Sicily	2003–2004	14	2 (14.3)	0.33±0.25	1 (7.1)	1.5	Di Benedetto et al. 2005

Giangaspero *et al.*, 2007

Table 2 *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface water in Italy

Region	Years	Type of water	Number of samples	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>		References
				Positive samples (%)	Mean cyst N/L±SD	Positive samples (%)	Mean oocyst N/L±SD	
Piedmont	1997	River	22	22 (100)	1.16±0.78	22 (100)	0.19±0.08	Carraro et al. 2000
Lazio	2001–2002	River	10	10 (100)	80±90	10 (100)	5±4	Briancesco and Bonadonna 2005
Sicily	2003–2004	River	7	7 (100)	465±413	7 (100)	9.86±6.79	Di Benedetto et al. 2005
Sicily	2003–2004	Watersheds	10	1 (10)	0.12±0.36	1 (10)	0.23±0.73	Di Benedetto et al. 2005
Lazio	2001–2002	Watersheds	4	2 (50)	0.006±0.009	0	0	Briancesco and Bonadonna 2005
Apulia	2000–2001	Watersheds	27	0	0	4 (14.8)	0.13±0.07	Brandonisio et al. 2004
Apulia	2001–2002	Watercourse	7	3 (42.9)	0.01±0.02	0	0	Briancesco and Bonadonna 2005
Tuscany	2003–2004	Watercourse	16	14 (87.5)	2.05	10 (62.5)	0.19	Sacco et al. 2006
Lazio	2001–2002	Lakes	3	1 (33.3)	0.28	N.I.	N.I.	Di Cave et al. 2005

N/L number of oo/cysts per liter; N.I. Not investigated

Table 4 *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater in Italy

Region	Type of wastewater	Number of samples	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>		References
			Positive samples (%)	Mean/Range cyst N/L	Positive samples (%)	Mean/Range oocyst N/L	
Piedmont	Raw sewage	3	3 (100)	54	3 (100)	4.5	Carraro et al. 2000
Lombardy Campania	Raw sewage	16	16 (100)	2,100–42,000	3 (18.75)	107	Cacciò et al. 2003
Sardinia Sicily	Raw sewage	10	10 (100)	800–7,000	10 (100)	0.4–30	Brianco and Bonadonna 2005
Lazio	Raw sewage	5	5 (100)	3,500–34,000	N.I.	N.I.	Di Cave et al. 2005
Sicily	Primary effluent	8	8 (100)	108,000	8 (100)	702	Di Benedetto et al. 2005
Sicily	Secondary effluent ^a	8	8 (100)	6,160	7 (87.5)	56.9	Di Benedetto et al. 2005
Apulia	Secondary effluent ^a	4	4 (100)	1,800	2 (50)	56	Lonigo et al. 2006
Apulia	Tertiary effluent ^b	4	4 (100)	253	4 (100)	0.26	Brandonisio et al. 2000
Apulia	Tertiary effluent ^c	4	4 (100)	6.65	4 (100)	0.23	Brandonisio et al. 2000
Piedmont	Tertiary effluent ^d	11	11 (100)	1.4	11 (100)	0.21	Carraro et al. 2000
Apulia	Chlorinated effluent	14	11 (78.6)	37.5	3 (21.4)	0.29	Brandonisio et al. 2004
Lazio	Chlorinated effluent	6	6 (100)	60	6 (100)	30	Brianco and Bonadonna 2005
Lazio	Chlorinated effluent	2	2 (100)	31–670	N.I.	N.I.	Di Cave et al. 2005
Apulia	Chlorinated effluent	11	9 (81.82)	98.85	4 (36.4)	6.99	Brandonisio et al. 2007
Lazio	UV-treated effluents	3	3 (100)	72.33	N.I.	N.I.	Di Cave et al. 2005
Apulia	UV-treated effluent	10	7 (70)	37.8	1 (10)	2.67	Brandonisio et al. 2007

N.I. Not investigated

^a Activated sludge

^b Chemical flocculation

^c Chemical flocculation followed by slow sand filtration

^d Chemical dephosphorization and multilayer filtration

Presenza di cisti di Giardia in impianti di trattamento di acque reflue in Italia



Simone M. Cacciò,¹ Marzia De Giacomo,¹ Francesca A. Aulicino,² and Edoardo Pozio^{1*}
Laboratory of Parasitology,¹ Laboratory of Environmental Hygiene, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy²

La riduzione della quantità di acqua piovana in alcune regioni italiane e l'aumento del consumo umano ha causato globalmente una carenza di acqua. **Il riciclo dell'acqua di scarico trattata è stato suggerito per alcune attività domestiche, industriali e agricole.** E' stata ripetutamente sottolineata l'importanza dell'analisi dei criteri microbiologici e parassitologici nell'acqua riciclata... Abbiamo condotto un'indagine in **quattro impianti di trattamento di acque reflue in Italia campionando acqua reflua ad ogni stadio del processo di trattamento nel periodo di un anno.** La presenza dei parassiti è stata valutata mediante immunofluorescenza con anticorpi monoclonali. Mentre le **oocisti di Cryptosporidium** sono state osservate in rari casi, le **cisti di Giardia** sono state rinvenute in tutti i campioni durante l'anno con picchi in autunno ed inverno. **L'efficienza complessiva di rimozione delle cisti negli impianti variava dall' 87,0 % al 98,4 %.** L'efficienza di rimozione del numero delle cisti è stata **statisticamente più elevata quando il trattamento secondario consisteva nell'ossidazione attiva con O₂ e sedimentazione invece che nei fanghi attivi e sedimentazione (94,5 % contro 72,1-88,0% P = 0.05).** Per caratterizzare le cisti a livello molecolare il gene β -giardin è stato amplificato con PCR ed i prodotti sono stati sequenziali o analizzati con enzimi di restrizione. **Le cisti sono state tipizzate come A o B**

(CDC - Parasitic disease information - Giardiasis)

Giardia spp. nell'acqua "potabile"

Centers for Disease Control & Prevention
National Center for Infectious Diseases
Division of Parasitic Diseases



- in USA più di 100 focolai umani causati dalla contaminazione delle acque
- anche in Australia, Canada, Nuova Zelanda, Svezia, Germania e UK

... per clorazione insufficiente, filtrazioni inadeguate, contaminazioni con scarichi, ...

Cryptosporidium spp. nell'acqua "potabile"

Nel 1993 Epidemia a

Milwaukee-USA:

403.000 infetti

x inefficienza sistema filtrazione

(MacKenzie *et al*, 1994)



Nel 1995, in Italia:

52 infetti

**x contaminazione di un serbatoio
(analisi sul sedimento)**

(Pozio *et al*, 1997)



Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water

William R Bowie, Ariene S King, Denise H Werker, Judith L Isaac-Renton, Allison Bell, Steven B Eng, Stephen A Marion, for the BC Toxoplasma Investigation Team*

Summary

Background Outbreaks of toxoplasmosis are recognised infrequently. In March, 1995, a sudden increase of serologically diagnosed cases of acute toxoplasmosis was noted in the Greater Victoria area of British Columbia, Canada. Concurrently, but independently, seven cases of acute toxoplasma retinitis were diagnosed against a background of no cases in the previous 5 years.

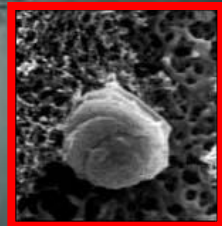
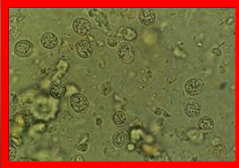
Methods Cases were defined by serological testing, clinical presentation, and residence in Greater Victoria. A screening programme for women who were or had been pregnant was started. Geographical mapping of cases, and case-control studies of symptomatic cases and of women enrolled in the screening programme were done.

Introduction

Toxoplasmosis is endemic throughout most of the world, and can infect a large proportion of the adult population.^{1,2} It is frequently symptomless or mild, but if infection occurs during pregnancy it can have devastating consequences for the fetus.^{3,4} Early treatment of infected pregnant women and their offspring is effective in preventing disease or reducing its severity. Toxoplasmosis can also cause serious disease among immunodeficient people. The causative parasite is *Toxoplasma gondii*, and the definitive hosts are felines.⁵ Outbreaks of toxoplasmosis involving more than a single family or small group are infrequent.⁶⁻⁷ We describe a widespread outbreak of toxoplasmosis, the largest known to us, and the first to be linked to municipal water.

Methods

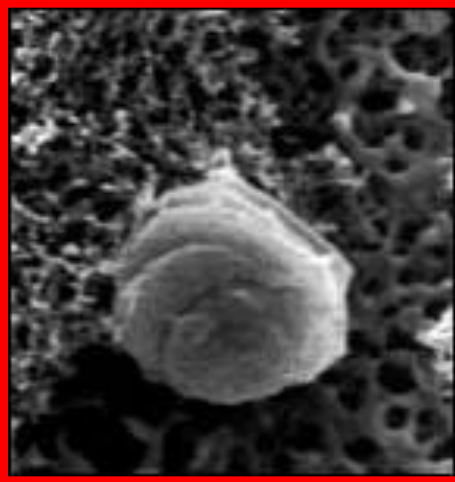
...nelle acque marine e lagunari?





Giardia

Più di **2 mesi** in soluzione salina
2%



Cryptosporidium

Anche **1 anno** in acque marine



Toxoplasma gondii

Anche **6 mesi** in acque marine

Potenziale D.I. in individui immunocompetenti?

Fino a 1.84×10^6 oocisti di *Cryptosporidium*/ml di emolinfa in una vongola

Trattamento di depurazione?

Cottura a vapore?

Azioni di sorveglianza ufficiale?



Segnalazioni nel mondo:

Specie di mollusco	Paese	Protozoo isolato
<i>Corbicula fulminea</i>	Stati Uniti	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Giardia duodenalis</i>
<i>Machoma balthica</i> <i>Machoma mitchelli</i>	Stati Uniti	<i>G. duodenalis</i>
Specie non identificate	Canada	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Dosinia exoleta</i> ; <i>Veneurupis pullastra</i> ; <i>V. rhomboideus</i> <i>Venus verrucosa</i>	Spagna	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Ruditapes decussatus</i> <i>Scrobicularia plana</i> <i>Donax</i> spp	Portogallo	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Ischadium recurvum</i>	Stati Uniti	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Stati Uniti	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Dreissena polymorpha</i>	Canada	<i>C. hominis</i>

Segnalazioni nel mondo:

Specie di mollusco	Paese	Protozoo isolato
<i>Corbicola japonica</i>	Giappone	<i>C. parvum</i>
<i>Mytilus edulis</i> <i>Dreissena polymorpha</i>	Irlanda del Nord	<i>C. parvum</i> <i>C. parvum, G. duodenalis</i>
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Spagna	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>C. parvum</i>
<i>Mytilus edulis</i>	Portogallo	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Mytilus edulis</i>	Francia	<i>C. parvum</i>
<i>Crassostrea virginica</i>	Stati Uniti	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>C. parvum, C. baylei</i>
<i>Ostrea edulis</i>	UK	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Ostrea edulis</i>	Spagna (Galizia)	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>G. duodenalis</i>
<i>Crassostrea edule</i>	Portogallo	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Crassostrea gigas</i>	Olanda	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Cerastoderma edulis</i>	Spagna	<i>Cryptosporidium</i> spp.

Segnalazioni in Italia:

Nessun dato disponibile fino al 2003



➤ *Giardia* e *Cryptosporidium* in *C. gallina* della costa adriatica abruzzese (Traversa *et al*, 2004; Giangaspero *et al*, 2005)

➤ *Cryptosporidium* in *T. philippinarum* della laguna di Venezia (Molini *et al*, 2007)

Segnalazioni in Italia:

Lago di Faro (ME)



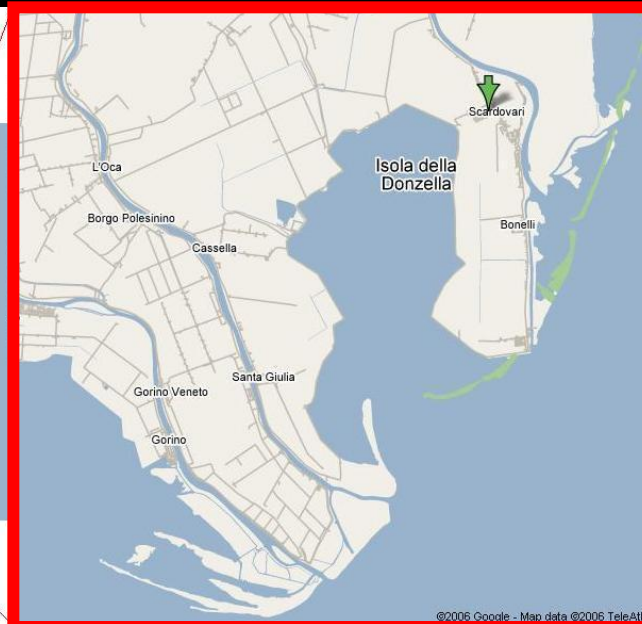
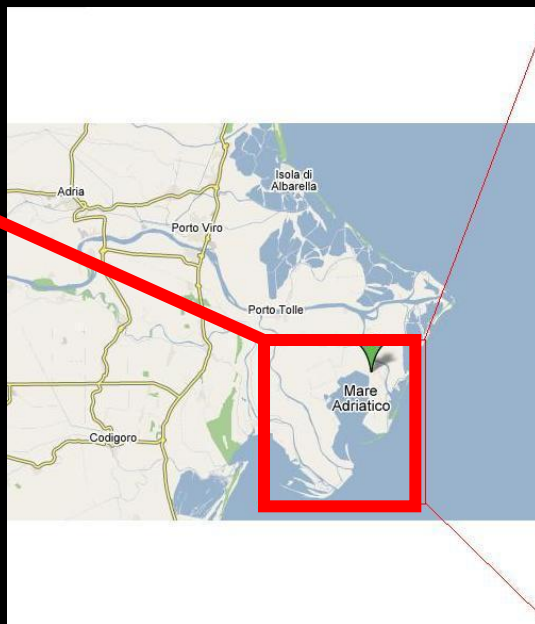
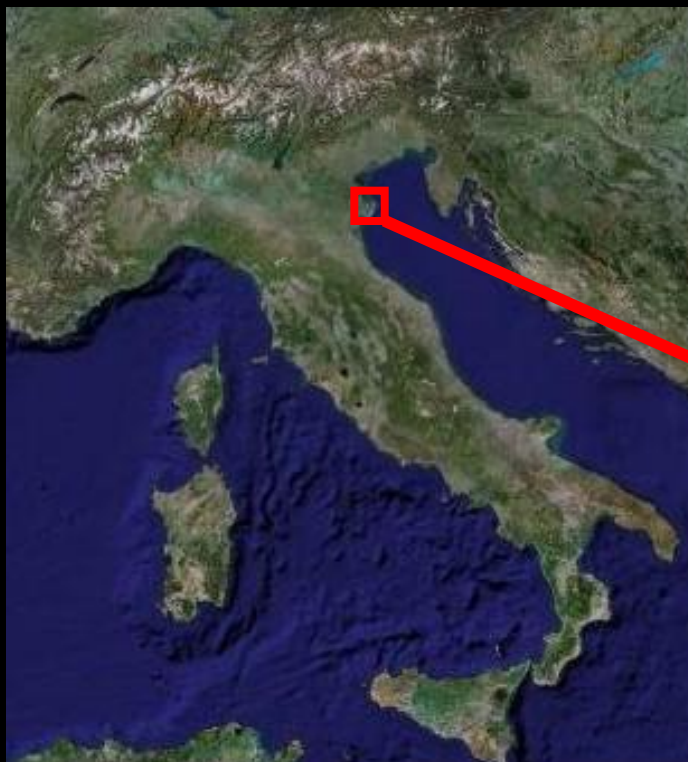
5820 Mytilus galloprovincialis

Cryptosporidium spp.
Giardia spp.



(Sorgi et al, 2006)

Sacca di Scardovari



Campionamenti mensili:
dicembre 2005 - agosto 2006
estate - autunno 2007

...pool di emolinfa e ghiandole digestive (30 molluschi/pool).



56 pool:
36 of *T. philippinarum*
20 of *M. galloprovincialis*

1080 *Tapes philippinarum*

600 *Mytilus galloprovincialis*



- IF diretta su emolinfa (MERIFLUOR®
Cryptosporidium/Giardia, Meridian Diagnostic, U.S.A.)
- PCR su emolinfa e/o ghiandole digestive
 - ***Giardia* – nested PCR**
primers scelti sulla base della sequenza del gene codificante per la piccola subunità ribosomale 16S (Hopkins *et al.*, 1997)
 - ***Cryptosporidium* – seminested PCR**
primers in grado di amplificare un frammento del dominio N-terminal del gene che codifica per *Cryptosporidium* spp. COWP (Traversa *et al.*, 2004)
- Tasso di Infezione Atteso: $E.I.R = 1 - \sqrt[k]{n/N}$

IF su emolinfa - Risultati

Pool	Specie	<i>Giardia</i> (cisti/ml)	<i>Cryptosporidium</i> (oocisti/ml)
1	<i>T. Philippinarum</i>	POSITIVO (1)	POSITIVO(4,3)
2	<i>T. Philippinarum</i>	POSITIVO(1)	POSITIVO(5)
3	<i>T. Philippinarum</i>	Negativo	POSITIVO(1)
4 -...6	<i>T. Philippinarum</i>	Negativo	Negativo
7	<i>T. philippinarum</i>	Negativo	POSITIVO(1)
8	<i>T. philippinarum</i>	Negativo	POSITIVO(2)
9 - ...36	<i>T. Philippinarum</i>	Negativo	Negativo
1	<i>M. galloprovincialis</i>	Negativo	POSITIVO(3)
2	<i>M. galloprovincialis</i>	POSITIVO(0,5)	POSITIVO(0,7)
3 - ...20	<i>M. galloprovincialis</i>	Negativo	Negativo

PCR *Giardia* - Risultati

Pool	Specie	IFA (emolinfa)	16S-rRNA (ghiandole digestive)
1	<i>T. Philippinarum</i>	POSITIVO	POSITIVO
2	<i>T. Philippinarum</i>	POSITIVO	POSITIVO
3	<i>T. Philippinarum</i>	Negativo	POSITIVO
4 - ...36	<i>T. Philippinarum</i>	Negativo	Negativo

← 175 bp

1	<i>M. galloprovincialis</i>	Negativo	POSITIVO
2	<i>M. galloprovincialis</i>	POSITIVO	POSITIVO
3 - ...20	<i>M. galloprovincialis</i>	Negativo	Negativo

PCR *Cryptosporidium* - Risultati

Tutti i campioni (emolinfa e/o ghiandole digestive) **NEGATIVI**

Tasso di infezione atteso *Giardia* (PCR)



0,34%



0,74%

- Confermata la presenza In molluschi di protozoi zoonosici *Giardia* e *Cryptosporidium*
- *Giardia*: maggior numero di positivi alla PCR che all'IF
- Oocisti di *Cryptosporidium* rilevate all'IF ma non alla PCR :
 - basso numero di oocisti ?
 - differenti matrici biologiche?

Segnalazioni in Italia:

**PROTOZOI DI INTERESSE ZONOSICO IN MOLLUSCHI BIVALVI
MARINI E LAGUNARI:**

**VALUTAZIONE DELL'INQUINAMENTO AMBIENTALE E DEL RISCHIO
PER IL CONSUMATORE**

Progetto MIUR (PRIN 2005 - 2007)

Unità di ricerca di
Foggia
Bologna
Roma
Padova

...perchè i molluschi lamellibranchi?



- Una delle principali risorse alimentari nel mondo

- ca. 180.000 t/anno

- 10% dei prodotti della pesca



Principali specie di interesse alimentare:

Mitylus galloprovincialis (cozza o mitile)



Litorale pugliese (115 mila tonnellate/anno)

Rudytapes philippinarum (vongola filippina)



Alto Adriatico (50 mila tonnellate/anno)

Chamelea gallina (vongola verace)



Alto adriatico (20 mila tonnellate/anno)

Donax Trunculus (tellina)



Tirreno centrale

Cerastoderma glaucum (cuore)



Litorale pugliese

Obiettivi

- ✓ **Monitorare molluschi marini e/o lagunari** della costa adriatica (romagnola, abruzzese e pugliese) e tirrenica (tosco-laziale)
- ✓ **Standardizzare tecniche diagnostiche** (IF e PCR)
- ✓ **Valutare il potere infettante** di *Giardia* e *Cryptosporidium* mediante infezioni sperimentali
- ✓ **Genotipizzare** *Giardia* (geni 18s e TP1) e *Cryptosporidium* (gene COWP)

Campionamenti

(gennaio 2006-luglio 2007)

M. & M.

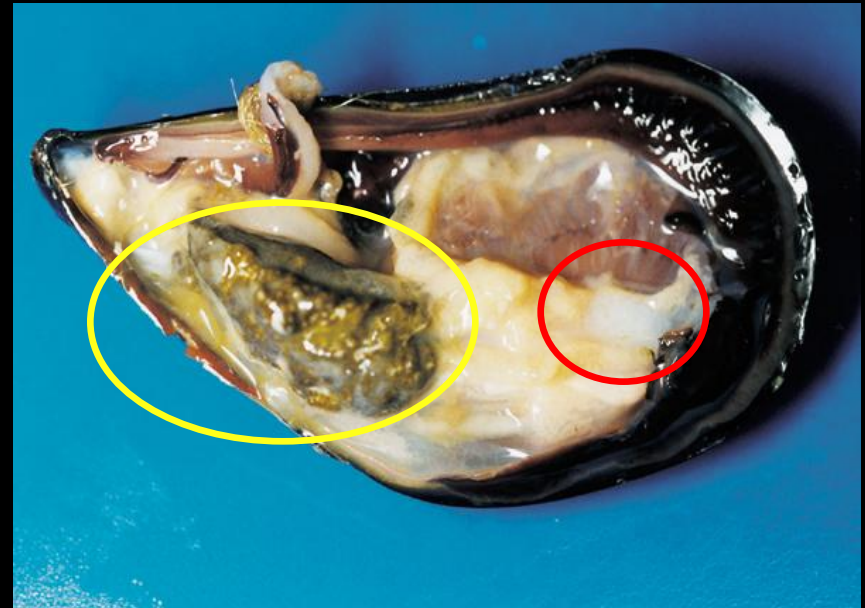


(UR 1,2,3)

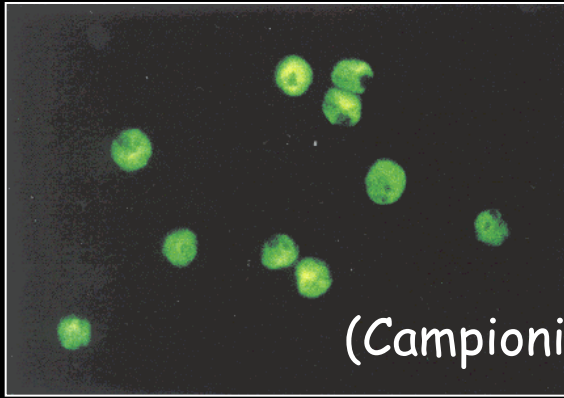
Prelievo emolinfa...



...ctenidi ed epatopancreas



Analisi de campioni (UR 1, 2, 3)

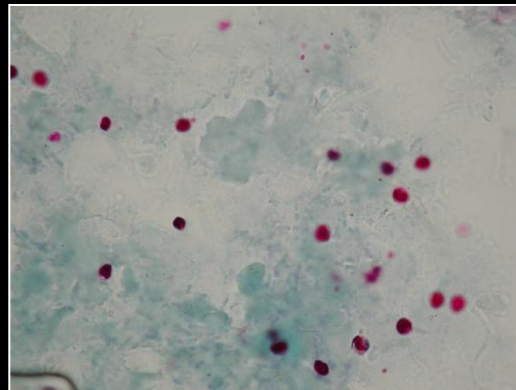


- **IF** su pool emolinfa (kit Merifluor® C/G)

(Campioni positivi inviati a UR4 per infezioni sperimentali)

- **PCR** su pool emolinfa e liquido di lavaggio branchiale (*Giardia* e *Cryptosporidium*)

- **ZN** su pool emolinfa (*Cryptosporidium*)



SPECIE	UR1	UR2	UR3	Totale
<i>Chamalea gallina</i>	1.380	647	780	2.807
<i>Donax trunculus</i>	-	1.933	-	1.933
<i>Tapes philippinarum</i>	121	-	1.560	1.681
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1.080	-	-	1.080
<i>Tapes decussatus</i>	797	-	-	797
<i>Ostrea gigas</i>	125	-	-	125
Totale	3.503	2.580	2.340	8.423
(n. pool)	(73)	(31)	(39)	(143)

Analisi

➤ IF (emolinfa) per *Giardia* e *Cryptosporidium*:

143 pool negativi

➤ ZN (emolinfa) per *Cryptosporidium* :

4/39 pool positivi

- 3/26 *T. philippinarum*
- 1/13 *C. gallina*

➤ PCR per *Giardia* e *Cryptosporidium*: 225 pool così suddivisi

- 119 pool (emolinfa neg. a IF): negativi
- 4 pool (emolinfa pos. A ZN): 1 pos. *Cryptosporidium* (id. 96%)
- 39 pool (lavaggio branchiale): negativi
- 63 pool (ghiandole digestive): negativi



PRIN 2005-07

RU 4 - University of Padua

**Biomolecular assays of
Toxoplasma and in vivo
infectivity trials of zoonotic
protozoa in marine bivalve
shellfish of Adriatic and
Tyrrhenian seas**



GIORNATA DI STUDIO

Giardia e Cryptosporidium
negli animali e nell'ambiente:
i progressi della ricerca per
la salvaguardia della
salute umana

Giovedì 18 OTTOBRE 2007
Aula Magna, Palazzo Ateneo
P.zza Umberto - BARI



Why *Toxoplasma* in shellfish ?

International Journal for Parasitology 38 (2008) 1319–1328

Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters

M.A. Miller ^{a,*}, W.A. Miller ^b, P.A. Conrad ^b, E.R. James ^c, A.C. Melli ^b,
C.M. Leutenegger ^d, H.A. Dabritz ^e, A.E. Packham ^b, D. Paradies ^f, M. Harris ^a,
J. Ames ^a, D.A. Jessup ^a, K. Worcester ^g, M.E. Grigg ^h

^a California Department of Fish and Game, Marine Wildlife Veterinary Care and Research Center, 1451 Shaffer Road, Santa Cruz, CA 95060, United States

^b Department of Pathology, Microbiology and Immunology, 1 Garrod Drive, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, United States

^c Department of Medicine, University of British Columbia, D452 HP East, VGH, 2733 Heather Street, Vancouver, BC, Canada V5C 3J5

^d IDEXX Reference Laboratories, 2825 KOVR Drive, West Sacramento, CA 95605, United States

^e California Department of Public Health, Infant Botulism Treatment and Prevention Program, 850 Marina Bay Pkwy, E361, Richmond, CA 94804, United States

^f Bay Foundation of Morro Bay, 601 Embarcadero, Suite 11, Morro Bay, CA 93442, United States

^g Regional Water Quality Control Board-Central Coast, 81 South Higuera Street, Suite 200, San Luis Obispo, CA 93401, United States

^h Molecular Parasitology Unit, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, 4 Center Drive, Room B1-06, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-0425, United States

Received 29 December 2007; received in revised form 15 February 2008; accepted 17 February 2008

Detection of *Toxoplasma* - M&M

- in pool of digestive glands (up to 60/pool) collected by Research Units (RRUU) 1, 2, 3, frozen and sent to RU4,...
- ... tested by PCR using primers amplifying a 300 bp sequence of *Apicomplexa coccidia* (Ho *et al.*, 1996),...
- ...and enzymatic restriction on positive samples.

Experimental infections - M&M

- Samples positive (IFA) to *Giardia* and/or *Cryptosporidium*, sent by RRUU 1, 2, 3,...
- ...intra-gastric administration in newborn mice according to D.L. 116/92,...
- ...coprological assays (modified ZN) and IFA (MERIFLUOR[®] *Cryptosporidium/Giardia*, Meridian Diagnostic, U.S.A.) pre-infection and during 7 days post-infection.

Collected samples - Results



1260 *Tapes philippinarum*
900 *Chamelea gallina*

341 *Donax trunculus*

1070 *Donax trunculus*
572 *Chamelea gallina*

540 *Mytilus galloprovincialis*
480 *Chamelea gallina*
308 *Tapes decussatus*

Detection of *Toxoplasma* - Results

	RU1 Foggia		RU2 Rome		RU3 Bologna		Total	
	pool (n.)	dig. glands (n.)	pool (n.)	dig. glands (n.)	pool (n.)	dig. glands (n.)	pool (n.)	dig. glands (n.)
<i>Chamelea gallina</i>	8	480	14	572	15	900	37	1952
<i>Donax trunculus</i>	-	-	27	1411	-	-	27	1411
<i>Tapes philippinarum</i>	-	-	-	-	21	1260	21	1260
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	9	540	-	-	-	-	9	540
<i>Tapes decussatus</i>	6	308	-	-	-	-	6	308
Total	23	1328	41	1983	36	2160	100	5471
Sampling period	January '06 June '06		May '06 June '07		February '06 January '07			

Detection of *Toxoplasma* - Results

- No *Toxoplasma* positive samples have been detected by PCR

Experimental infection - Results

- It was not possible to carry out in vivo trials for detection of *Giardia / Cryptosporidium* infectivity (no IFA-positive samples)



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr



Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG)

L. Putignani^a, L. Mancinelli^a, F. Del Chierico^a, D. Menichella^a, D. Adlerstein^b, M.C. Angelici^c, M. Marangi^d, F. Berrilli^e, M. Caffara^f, D.A. Frangipane di Regalbono^g, A. Giangaspero^{d,*}

To evaluate the presence of *Toxoplasma gondii* in edible farmed shellfish, **1734** shellfish specimens i.e., 109 *Crassostrea gigas* (**6 pools**), 660 *Mytilus galloprovincialis* (**22 pools**), 804 *Tapes decussatus* (**28 pools**) and 161 *Tapes philippinarum* (**6 pools**), were collected from the Varano Lagoon (Apulia, Italy). Shellfish from 62 pools were subjected to two molecular techniques: a nested-PCR assay, and a fluorescent amplicon generation (FLAG) real-time PCR assay, both based on the multi-copy B1 target, were performed. **One pooled sample of gills from *C. gigas* and one pooled sample of haemolymphs from *T. decussatus* were assessed as positive for *T. gondii* DNA** by both techniques. The results demonstrated the presence of *T. gondii* in edible farmed *C. gigas* and *T. decussatus* and indicate that there may be a considerable health threat involved in eating contaminated raw shellfish.

Conclusion

