

Rilievo di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nelle vongole (*Chamelea gallina*) della costa abruzzese

Evidence of the presence of Giardia spp. and Cryptosporidium spp. in clams (Chamelea gallina) of the Abruzzo coast

Umberto Molini^{1*}, Raffaella Iorio¹, Donato Traversa¹, Barbara Paoletti¹,
Carla Giansante², Annunziata Giangaspero¹

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Università degli Studi di Teramo

² IZS dell'Abruzzo e del Molise, Reparto di Biologia Marina e Fluviale, Teramo

RIASSUNTO – La capacità dei molluschi bivalvi di filtrare elevati volumi di acqua rende tali organismi in grado di concentrare un numero elevato di agenti patogeni per l'uomo e gli animali. Il presente lavoro ha avuto lo scopo di valutare la presenza di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nelle vongole della costa abruzzese. Sono stati raccolti 960 esemplari di vongole (*Chamelea gallina*) presenti in natura ad una distanza di circa 500 metri dalle foci dei fiumi Tronto, Vibrata, Tordino e Vomano. L'emolinfa e la polpa sono stati estratti dagli esemplari (240 per foce), precedentemente identificati, misurati e pesati (peso vivo). I campioni, divisi in pools, sono stati sottoposti al test di immunofluorescenza diretta (MERIFLUOR^(R) *Cryptosporidium*/*Giardia*; Meridian Diagnostic, Cincinnati, OH, USA). Cisti di *Giardia* sono state evidenziate nell'emolinfa dei campioni provenienti dalle foci dei fiumi Tordino e Vibrata, mentre oocisti di *Cryptosporidium* sono state rilevate in tutti i campioni di emolinfa e di polpa omogenizzata di *C. gallina*. In considerazione della cross-reattività con altri organismi, quattordici campioni di emolinfa sono stati testati con una PCR specifica per il gene COWP di *Cryptosporidium* spp. Due di questi campioni hanno prodotto amplificati confermando la presenza di *Cryptosporidium* spp. nelle vongole. L'osservazione di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp. nelle vongole della costa abruzzese, rappresenta la prima segnalazione nel territorio italiano di protozoi parassiti di interesse umano e veterinario. Il rilievo di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp., nei molluschi acquatici, oltre all'interesse sanitario che riveste, consentirebbe di assegnare loro un ruolo come indicatori dell'inquinamento delle acque costiere abruzzesi.

SUMMARY – *Bivalves filter large volumes of water and consequently concentrate organisms which are pathogenic for humans and animals. This work aimed to evaluate the presence of Giardia spp. and Cryptosporidium spp. in clams from adriatic coast (Abruzzo region). 960 specimens of clams (Chamelea gallina) present in nature were collected at 500 mt. from the Tronto, Vibrata, Tordino and Vomano river mouths on the Adriatic sea. The haemolymph and tissues were extracted from the specimens (240 per mouth) after they had been identified, measured and weighed (live weight). Immunofluorescence tests (IFA) (MERIFLUOR^(R) Cryptosporidium/Giardia; Meridian Diagnostic, Cincinnati, OH, USA) were performed on pools of samples. Cysts of Giardia spp. were detected in the haemolymph of samples coming from Tordino and Vibrata river mouth while oocysts of Cryptosporidium spp. were detected in all the haemolymph and tissue homogenates of C. gallina. Due to the possible cross-reaction with other organisms, fourteen samples of haemolymph were tested by a PCR specific for the Cryptosporidium COWP gene. Of these samples two produced amplicons confirming the presence of Cryptosporidium in the clams. This is the first time that evidence of Cryptosporidium spp. and Giardia spp. in clams from the Adriatic sea in Italy and the case is of public health importance. Besides the health implications, evidence of Giardia spp. and Cryptosporidium spp. in bivalve mollusks may also lead to using the clams as indicators for monitoring the aquatic environment of the Adriatic coast for pollution.*

Key words: *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Chamelea gallina*., Abruzzo coast

* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza Aldo Moro, 45 - 64100 Teramo – ITALY. Tel/Fax. +39 0861 412868; E-mail: umberto_molini@virgilio.it

INTRODUZIONE

Giardia spp. e *Cryptosporidium* spp. sono tra i più comuni protozoi enterici di numerosi animali domestici, selvatici e dell'uomo, a distribuzione cosmopolita. Trasmessi per via oro-fecale e frequentemente attraverso le acque contaminate da reflui agricoli ed industriali (Lisle e Rose, 1995; Graczyk *et al.*, 1997; Fayer, 1997), questi microrganismi, colonizzano l'epitelio gastrointestinale e sono causa di forme diarroiche gravi particolarmente nei soggetti giovani e/o immunocompromessi. Entrambi i parassiti sono oggetto oggi di notevole interesse nel mondo scientifico in considerazione del loro possibile ruolo zoonosico: sulla base delle più recenti acquisizioni è stato infatti dimostrato che, nel caso di *Giardia* alcuni genotipi (in particolare AI e B) possono essere condivisi dagli animali e dall'uomo (Thompson *et al.*, 2000; Graczyk *et al.*, 2001), mentre per quanto riguarda *Cryptosporidium*, si è osservato che, oltre a *Cryptosporidium parvum* genotipo 2 o C (genotipo bovino), anche altre specie e altri genotipi sono in grado di infettare sia l'uomo che gli animali (Chalmers e Elwin, 2001). 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 alcune aree geografiche degli Stati Uniti (Johnson *et al.*, 1995; Fayer, 1997; Graczyk *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2001), del Giappone (Hashimoto *et al.*, 2002), di Taiwan (Hu, 2002) e dell'Europa (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 1994; Lowery *et al.*, 2001; Glaberman *et al.*, 2002). Corsi d'acqua dolce inquinati da scarichi umani e animali possono essere fonte di contaminazione degli ambienti marini e di diversi organismi viventi presenti negli estuari e nelle aree costiere. La capacità dei molluschi bivalvi di filtrare elevati volumi di acqua, rende questi organismi in grado di concentrare un numero elevato di agenti patogeni per l'uomo e per gli animali. *Chamelea gallina* è un comune mollusco bivalve, di notevole interesse commerciale, diffuso lungo le coste italiane, principalmente del mare Adriatico, ma presente in tutto il Mediterraneo, nel mar Caspio, nel mar Rosso e nell'Est Atlantico, dalla Norvegia al Marocco. Il presente contributo riporta i primi risultati di uno studio longitudinale, finalizzato alla ricerca, mediante indagini classiche e biomolecolari, di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nelle vongole della specie *C. gallina* presenti lungo la costa abruzzese.

MATERIALI E METODI

Nel mese di Marzo e nel mese di Luglio 2003, sono state raccolte da una vongolara con draga idraulica, complessivamente 960 (480 per campionamento) esemplari di vongole (*C. gallina*) presenti in natura ad una distanza di circa 500 metri dalle foci dei fiumi Tronto, Vibrata, Tordino e Vomano. I campioni sono stati mantenuti ad una temperatura compresa tra 0 e 5° C sino all'arrivo in laboratorio. Dai bivalvi (120 per foce), precedentemente identificati, misurati, pesati (peso vivo) e divisi in pools, sono state prelevate l'emolinfa (approssimativamente 100 µl/vongola) e la polpa. La polpa, omogenizzata in un doppio volume (w/v) di Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7.2), è stata passata al setaccio (<60µm) ed il filtrato è stato posto in flasche per sedimentazione e lasciato riposare a 4°C per 12 ore. I campioni di emolinfa e di polpa così preparati, sono stati sottoposti al test di immunofluorescenza diretta (IFA) (MERIFLUOR *Cryptosporidium/Giardia*; Meridian Diagnostic, Cincinnati, OH, USA) e le cisti di *Giardia* e le oocisti di *Cryptosporidium* sono state misurate e contate. Circa 2 ml di emolinfa prelevata da ciascun pool sono stati concentrati mediante centrifugazione utilizzando una soluzione 1M di sucrosio. Il materiale in esame è stato sottoposto all'esame microscopico sia ottico (Zeiss Axiophot) sia elettronico a scansione (S.E.M., LEO 1530). Per le indagini molecolari, il concentrato, dopo aver subito cicli di congelamento/scongelo, è stato centrifugato per 2' e il sedimento è stato

sottoposto a digestione con tampone contenente proteinasi-K come descritto da Graczyk *et al.* (2001) e ad estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale DNeasy Kit, Qiagen GmbH, Germany. Tutti gli estratti di DNA (in totale 14 campioni) sono stati sottoposti a reazioni di PCR specifiche per un tratto di ~550bp del dominio N-terminale del gene COWP codificante per una proteina della parete della oocisti di *Cryptosporidium* spp. (Spano *et al.*, 1997).

RISULTATI

Nel primo campionamento, eseguito nel mese di Marzo 2003, gli esemplari esaminati avevano un peso medio di 5,08 g ed una lunghezza media di 22,5 mm. Oocisti di *Cryptosporidium* (4-5 μ m) sono state rilevate in tutti i campioni di vongole con una concentrazione media compresa tra 8 e 45 oocisti/g nella polpa e tra 18 e 187 oocisti/ml nell'emolinfa. Le cisti di *Giardia* (10-11 μ m) sono state evidenziate esclusivamente nell'emolinfa dei campioni provenienti dalla foce del fiume Tordino con valori medi pari a 19 cisti/ml (Tabella 1). Nel secondo campionamento, effettuato nel mese di Luglio 2003, gli esemplari esaminati avevano un peso medio di 4,6 g e una lunghezza media di 27 mm; oocisti di *Cryptosporidium* (4-5 μ m) sono state evidenziate esclusivamente negli esemplari provenienti dalle foci dei fiumi Vomano e Vibrata con una concentrazione media compresa tra 2 e 3 oocisti/g nella polpa e tra 15 e 45 oocisti/ml nell'emolinfa. mentre cisti di *Giardia* (10-11 μ m) sono state evidenziate nell'emolinfa dei campioni provenienti dalle foci dei fiumi Tordino e Vibrata con valori medi pari a 5 cisti/ml (Tabella 1).

Cisti di *Giardia* sono state evidenziate al microscopio ottico in entrambi i campionamenti. Le indagini di biologia molecolare, condotte sugli isolati di emolinfa positivi all'IFA, per *Cryptosporidium* spp. hanno prodotto amplificati delle dimensioni di circa 550bp, confermando la presenza di tale protozoo esclusivamente nelle vongole provenienti dalla foce dei fiumi Vomano e Vibrata.

Foci dei fiumi	N° campioni	<i>Cryptosporidium</i> spp.				<i>Giardia</i> spp.			
		Marzo		Luglio		Marzo		Luglio	
		Emolinfa	polpa	emolinfa	polpa	emolinfa	polpa	emolinfa	polpa
Tronto	240	29 oocisti/ml	45 oocisti/g	assente	assente	assente	assente	assente	assente
Vibrata	240	18 oocisti/ml	37 oocisti/g	15 oocisti/ml	2 oocisti/g	assente	assente	5 cisti/ml	assente
Tordino	240	44 oocisti/ml	8 oocisti/g	assente	assente	19 cisti/ml	assente	5 cisti/ml	assente
Vomano	240	187 oocisti/ml	10 oocisti/g	45 oocisti/ml	3 oocisti/g	assente	assente	assente	assente

Tabella 1 – Numero medio di oocisti di *Cryptosporidium* spp. e di cisti di *Giardia* spp. in *C. gallina* delle coste abruzzesi nei due campionamenti
 Table 1 - Mean number of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in *C. gallina* from Abruzzo coast.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La presenza di *Giardia* in campioni di vongole (*C. gallina*), è stata dimostrata sia mediante la tecnica IFA sia mediante l'osservazione microscopica diretta, mentre la presenza di *Cryptosporidium* è stata dimostrata sia con l'IFA sia con indagini di biologia molecolare; quest'ultima indagine, ha consentito di eliminare l'errore dovuto alla bassa specificità del test IFA, confermando, quindi, l'esistenza di cross-reattività tra *Cryptosporidium* e altri microrganismi (Graczyk *et al.*, 1998) anche nelle nostre condizioni ambientali.

In Europa, *Cryptosporidium* spp. è stato isolato in esemplari di *Ruditapes decussatus* in Portogallo (Azevedo, 1989), e in specie di ostriche, cozze, vongole e noci di mare nella Spagna nord-occidentale (Gomez-Couso *et al.*, 2003); *C. parvum* è stato rilevato in esemplari di *Mytilus edulis* in Irlanda (Chalmers *et al.*, 1997) e di *M. galloprovincialis* nella Spagna nord-occidentale da Freire-Santos *et al.* (2000) e Gomez-Bautista *et al.* (2000); in quest'ultima segnalazione *Cryptosporidium* è stato inoltre identificato come appartenente al genotipo bovino (genotipo 2 o C).

Isolati di *Giardia* spp. appartenenti ai genotipi A e B sono invece stati rilevati soltanto in acque reflue della città di Roma (Cacciò *et al.*, 2003).

Se si escludono le segnalazioni di Freire-Santos *et al.* (2000) prima, e di Gomez-Couso *et al.* (2003) più recentemente, relative al rilievo di *Cryptosporidium*, rispettivamente in 5 su 8 esemplari di *R. philippinarum* provenienti dalla laguna di Venezia e di 10 su 30 molluschi bivalvi, di provenienza e tipologia non nota, il presente contributo rappresenta la prima segnalazione, di cisti di *Giardia* spp. e di oocisti di *Cryptosporidium* spp. nelle vongole autoctone e, in particolare, in *C. gallina* nel territorio italiano.

La presenza di tali 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. L'elevata sopravvivenza delle forme infettanti di entrambi i protozoi, 2 mesi circa per *Giardia* (de Regnier *et al.*, 1989) e 1 anno circa per *Cryptosporidium* (Robertson *et al.*, 1992; Fayer *et al.*, 1998; Tamburrini e Pozio, 1999) e la velocità con cui si depositano sui fondali, ridotta per *Cryptosporidium* (Fayer, 1997), più elevata per *Giardia* (Graczyk *et al.*, 1999), fanno aumentare le possibilità che tali protozoi si mantengano in ambiente acquatico. La concentrazione minima in grado di infettare un uomo adulto immunocompetente è inferiore a 30 oocisti per *Cryptosporidium* (Dillingham *et al.*, 2002) e di 10 cisti per *Giardia* (Rendtorff, 1954). Per tali motivi, la presente segnalazione assume un interesse sanitario notevole, se si considera che in molte parti d'Italia, i molluschi bivalvi, vengono consumati crudi prima di essere sottoposti a depurazione. Inoltre, alla luce delle indagini condotte da Gomez-Couso *et al.* (2003), relative al rilievo di campioni contaminati da oocisti di *Cryptosporidium* anche dopo 2 settimane di depurazione, si ritiene che i tempi di depurazione normalmente utilizzati nelle nostre aree vadano ridiscussi. Nonostante in letteratura non siano mai stati segnalati casi umani di criptosporidiosi e giardiosi dovuti al consumo di molluschi crudi e al contatto con acqua di mare, focolai o casi di giardiosi sono stati riportati negli ultimi anni in diverse aree geografiche del nostro paese, compreso l'Abruzzo, negli animali (Giangaspero *et al.*, 2002; Capelli *et al.*, 2003) e nell'uomo (Ballone *et al.*, 2001; Giangaspero *et al.*, 2002; Capelli *et al.*, 2003).

La caratterizzazione genotipica dei singoli isolati di entrambi i protozoi, attualmente in corso, oltre a definire l'identità, consentirà di stabilire l'ospite di provenienza e di conseguenza chiarire il reale rischio zoonosico nel territorio considerato. Il rilievo di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp., nei molluschi acquatici, oltre all'interesse sanitario che riveste, dimostra che *C. gallina*, per la sua capacità di concentrare microrganismi, potrebbe

rappresentare, soprattutto se confermato nel tempo, un buon indicatore per il monitoraggio dei fiumi e delle acque dell'Adriatico di organismi di interesse antropozoonosico.

BIBLIOGRAFIA

- Azevedo C. (1989). Ultrastructural observations of *Cryptosporidium* sp. parasite of *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *J. of Invertebr. Pathol.*, 54: 289-298.
- Ballone E., Fazio P., Riario Sforza G., Scassa E., Di Nicola M., Ippolito N., Di Mascio C. & Schioppa F. (2001). Indagine sulla diffusione della giardiosi nell'area pescarese. *Ann. Ig.*, 13: 11-120.
- Cacciò S.M., De Giacomo M., Aulicino F.A. & Pozio E. (2003). *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (6): 3393-3398.
- Capelli G., Paoletti B., Iorio R., Frangipane Di Regalbono A., Pietrobelli M., Bianciardi P. & Giangaspero A. (2003). Prevalence of *Giardia* spp. in dogs and humans in Northern and Central Italy. *Parasitol. Res.*, 90: 154-155.
- 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.
- Chalmers R.M. & Elwin K. (2001). Implications and importance of genotyping *Cryptosporidium*. *Commun. Dis. Public Health*, 3 (3): 155-158.
- de Regnier D.P., Cole L., Schupp D.G. & Erlandsen S.L. (1989). Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (5): 1223-1229.
- Dillingham R.A., Lima A.A. & Guerrant R.L. (2002). Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Micr. Infect.*, 4: 1059-1066.
- Fayer R. (1997). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *CRC press, Inc.*
- Fayer R., Graczyk T.K., Lewis E.J., Trout J.M. & Farley C.A. (1998). Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1070-1074.
- Freire-Santos F., Oteiza-Lopez A.M., Vergara-Castilblanco C.A., Ares-Mazas E., Alvarez-Suarez E. & Garcia-Martin O. (2000). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *J. Parasitol.*, 86 (4): 853-854.
- Giangaspero A., Paoletti B., Traversa D. & Iorio R. (2002). *Giardia* spp. in dogs and humans in Abruzzo region (Central Italy). *Parassitologia*, 44 (Suppl.1): 81.
- 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. & Xiao L. (2002). Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg. Infect. Dis.*, 8 (6): 631-633.
- 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.

- Gomez-Couso H., Freire-Santos F., Martinez-Urtaza J., Garcia-Martin O. & Ares-Mazas M.E. (2003). Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *Int. J. F. Micr.*, 87: 97-105.
- Graczyk T.K., Fayer R. & Cranfield M.R. (1997). Zoonotic potential of cross-transmission of *Cryptosporidium parvum*: implications for waterborne cryptosporidiosis. *Parasitol. Today*, 13: 349-351.
- Graczyk T.K., Farley C.A., Fayer R., Lewis E.J. & Trout J.M. (1998). Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the tissues of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) carrying principal oyster infectious diseases. *J. Parasitol.*, 84 (5): 1039-1042.
- Graczyk T.K., Thompson R.C.A., Fayer R., Adams P., Morgan U.M. & Lewis E.J. (1999). *Giardia duodenalis* cysts of genotype a recovered from clams in the Chesapeake Bay subestuary, Rhode River. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61 (4): 526-529.
- Graczyk T.K., Marcogliese D.J., De Lafontaine Y., Da Silva J., Mhangami-Ruwende B. & Pieniazek N.J. (2001). *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River. *Parasitol. Res.*, 87: 231-234.
- Hashimoto A., Kunikane S. & Hirata T. (2002). Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. *Water Res.*, 36 (13): 3420.
- Hu T.L. (2002). Detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in central Taiwan rivers by immunofluorescence assay. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 35 (3): 206.
- Johnson D.C., Reynolds K.A., Gerba C.P., Pepper I.L. & Rose J.B. (1995). Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. *Water Sci. Technol.*, 31: 439-442.
- Lisle J.T. & Rose J.B. (1995). *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: A mini review. *J. Water SRT-Aqua*, 44: 103-117.
- Lowery C.J., Moore J.E., Millar B.C., McCorry K.A.J., Xu J., Rooney P.J. & Dooley J.S.G. (2001). Occurrence and molecular genotyping of *Cryptosporidium* spp. in surface waters in Northern Ireland. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 774-779.
- Rendtorff R.C. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.*, 59: 209-220.
- Robertson L.J., Campbell A.T. & Smith H.V. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3494-3500.
- Rodriguez-Hernandez J., Canut-Blasco A., Ledesma-Garcia M. & Martin-Sanchez A.M. (1994). *Cryptosporidium* oocysts in water for human consumption. Comparison of staining methods. *Eur. J. Epidemiol.*, 10 (2): 215-218.
- Spano F., Putignani L., McLauchlin J., Casemore D.P. & Crisanti A. (1997). PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 150: 209-217.
- Tamburrini A. & Pozio E. (1999). Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.*, 29: 711-715.

Thompson R.C.A., Hopkins R.M. & Homan W.L. (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today*, 16: 210-213.

Xiao L., Singh A., Limor J., Graczyk T.K., Gradus S. & Lal A.A. (2001). Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1097-1101.