

## Rischio microbiologico associato al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati

Elisabetta CARRARO (a), Silvia BONETTA (a), Franca PALUMBO (b) e Giorgio GILLI (c)

(a) Dipartimento di Scienze dell' Ambiente e della Vita, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Alessandria

(b) Azienda Mediterranea Gas e Acqua SpA, Genova

(c) Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, Università degli Studi, Torino

**Riassunto.** - Questa rassegna tratta la problematica delle patologie idrodifuse nei paesi industrializzati (USA, Canada, Regno Unito e altri paesi europei). Vengono analizzati l'epidemiologia delle patologie idrodifuse e i fattori demografici, sociali ed ambientali implicati nella loro diffusione. Segue una descrizione dei principali agenti eziologici responsabili di infezioni idrodifuse, con particolare riferimento ai patogeni emergenti in questi paesi (ad es. *Cryptosporidium parvum*, *Legionella* e Calicivirus), considerando le caratteristiche del microrganismo, esempi di epidemie veicolate dall'acqua e cenni sui metodi di ricerca nelle acque. In conclusione vengono analizzati alcuni possibili interventi per il controllo del rischio microbiologico idrodifuso nei paesi industrializzati (analisi dei rischi e sistema HACCP) e viene sottolineata la necessità di approfondire la conoscenza dell'epidemiologia delle infezioni idrodifuse attraverso l'organizzazione di un sistema di sorveglianza specifico.

*Parole chiave:* acqua potabile, patogeni emergenti, rischio microbiologico, patologie idrodifuse.

**Summary** (*Drinking water microbiological risk in developed countries*). - This article provides an overview of the waterborne disease (WBD) issue in developed countries (USA, Canada, UK and other European countries). The factors involved in the epidemiology of waterborne infection are analysed (microbial, social, environmental, etc.) and the main WBD etiological agents are described with particular interest to emerging pathogens (i.e. *Cryptosporidium parvum*, *Legionella* and Calicivirus). Microorganism characteristics related to water contamination risk are described and examples of waterborne outbreak are reported. A short account about the detection methods of these microorganisms in the water is given. In conclusion, some possible strategies to control waterborne microbiological risk in industrialised countries are discussed considering the application of the risk analysis and the HACCP system in the water production and the need of a WBD surveillance system.

*Key words:* drinking water, emerging pathogens, microbiological risk, waterborne diseases.

### Introduzione

A partire dagli anni '70-'80 l'attenzione del mondo scientifico è stata rivolta prevalentemente al controllo delle sostanze chimiche potenzialmente pericolose presenti nelle acque destinate al consumo umano. In questo ambito sono state effettuate molte indagini, sempre più approfondite, riguardanti il rischio chimico associato alle acque potabilizzate (ad esempio quelle sui solventi clorurati e gli erbicidi), mentre è stato trascurato il rischio legato alla componente microbiologica [1]. Il riscontro di un aumento del numero di epidemie correlate al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati ha portato, negli ultimi anni, ad una maggiore attenzione verso le

problematiche connesse alla presenza di microrganismi patogeni nelle risorse idriche, anche potabilizzate. Negli USA, paese che può essere considerato come riferimento perché è l'unico ad avere attivo fin dal 1971 un sistema di sorveglianza specifico per le patologie idrodifuse, si sono verificate solo nel periodo 1999-2000 ben 39 epidemie, attribuibili al consumo di acqua potabile, che interessarono 2068 persone, causando due decessi. La causa venne identificata solo per 22 di queste 39 epidemie: in due casi venne riscontrata una contaminazione chimica (nitrati, idrossido di sodio), mentre negli altri 20 fu riconosciuta un'origine microbiologica. Il 35% delle epidemie causate da una contaminazione microbiologica è stato attribuito a parassiti (*Giardia duodenalis* e

*Cryptosporidium parvum*), il 45% a batteri (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*) e il 20% a virus (Calicivirus) [2]. In uno studio del 1995 Morris e Levin hanno calcolato un'incidenza annua di patologie idrodifuse negli USA piuttosto elevata, con una stima di 7 100 000 casi di patologie di bassa gravità, 560 000 casi di media gravità e 1200 decessi [3].

Complessivamente è da ritenere che l'incidenza delle patologie idrodifuse nei paesi industrializzati sia certamente sottostimata. A livello europeo non è presente un sistema di sorveglianza organizzato per le patologie di questa origine ed è possibile ipotizzare che molte gastroenteriti siano di origine idrica, dovute al consumo di acqua contaminata o al consumo di alimenti contaminati dall'acqua. In un'indagine pubblicata nel 2002 congiuntamente dall'European Environmental Agency e dal WHO-Regional Office for Europe nella quale sono stati analizzati i dati relativi alla sorveglianza per le gastroenteriti in 18 paesi europei nel periodo 1986-1996, solo il 2% su un totale di 2 567 210 casi di gastroenterite riportati è stato attribuito all'acqua (Tab. 1). In questo periodo sono state riportate complessivamente 710 epidemie di origine idrica, ma solo per 208 sono state raccolte informazioni sull'agente eziologico e sulla tipologia di acqua coinvolta. Nel 68% di queste 208 epidemie è stato identificato l'agente eziologico; su 154 epidemie il 36% è stato attribuito ad acqua distribuita dall'acquedotto pubblico, il 18% distribuita da acquedotti privati, il 6% distribuita da reti di derivazione della fornitura pubblica e il 41% è stato attribuito a risorse idriche non note o ad acque usate a scopo ricreazionale; il 66%, su 120 epidemie, è stato attribuito ad acqua di pozzo, il 22% ad acque superficiali ed il 14% a fonti miste [4].

Confrontando l'incidenza annua di gastroenterite riscontrata in questo studio con l'incidenza di gastroenteriti esclusivamente di origine alimentare, stimata negli USA intorno ai 6÷80 milioni di casi/anno, e con le stime sull'incidenza delle patologie idrodifuse riportati da Morris and Levin (1995) [3] ne deriva che a livello europeo si ha una evidente situazione di sottostima. Anche in una recente indagine del 2002 Poullis *et al.* concludono sottolineando che lo schema di sorveglianza per le WBD (*waterborne disease*) a livello Europeo non è sufficientemente organizzato e che la variabilità nelle modalità di notifica tra gli Stati Membri comporta una condizione generale di sottotifica per queste patologie [5].

Questa rassegna si pone l'obiettivo di dare un inquadramento al problema delle patologie idrodifuse nei paesi industrializzati analizzando la letteratura disponibile sull'argomento, che riguarda principalmente USA, Canada, Regno Unito e pochi altri paesi europei. Nell'articolo viene trattata l'epidemiologia

delle patologie idrodifuse nei paesi industrializzati e vengono descritti i principali fattori demografici, sociali ed ambientali implicati nella loro diffusione. Segue una descrizione dei principali agenti eziologici responsabili di infezioni idrodifuse organizzata in base al tipo di microrganismo (batteri, virus e protozoi) in questi paesi.

### Epidemiologia delle infezioni idrodifuse

Nei paesi industrializzati il moderno concetto di protezione delle risorse idriche e lo sviluppo di tecniche di potabilizzazione sempre più efficaci (disinfezione, chiariflocculazione e filtrazione) hanno portato alla eradicazione virtuale delle patologie idrodifuse, eliminando quelle causate dai cosiddetti "patogeni classici", come *Salmonella typhi* o *Vibrio cholerae*. D'altra parte l'instaurarsi di alcune tendenze comportamentali e la comparsa di nuove problematiche hanno contribuito a creare un'altra situazione riguardo al rischio microbiologico associato al consumo di acqua. I fattori coinvolti comprendono l'eccessivo sfruttamento delle fonti di approvvigionamento, causato dal continuo incremento della richiesta idrica, e l'invecchiamento e deterioramento degli impianti di trattamento e della rete idrica. Anche la permanenza di sorgenti di inquinamento microbiologico delle acque (scarichi municipali, effluenti dei depuratori, scarichi industriali ed agricoli, ecc.) e le conseguenze sulle risorse idriche di alcune attività antropiche (es. eutrofizzazione), che hanno determinato la crescita incontrollata di *nuisance species*, hanno contribuito a determinare una nuova situazione nel settore della produzione e distribuzione di acqua potabile. Ciò ha favorito la comparsa di altre patologie idrodifuse causate da patogeni nuovi, emergenti, riemergenti e opportunisti. Vengono considerate patologie infettive emergenti le infezioni che compaiono per la prima volta in una popolazione perché causate da un microrganismo nuovo, come quelle dovute a *E. coli* O157:H7 negli USA o patologie già esistenti che, per svariati fattori, subiscono un improvviso incremento dell'incidenza o della diffusione geografica in aree dove prima non erano presenti, come quelle legate a *C. parvum*, *Legionella*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, Calicivirus, in USA, Canada e Europa. Riemergenti invece sono quelle infezioni che, dopo un periodo variabile di scomparsa in un territorio, ricompaiono con una frequenza rilevante, come quelle determinate da *G. duodenalis* nei paesi industrializzati [6, 7].

I patogeni opportunisti sono microrganismi commensali, saprofiti o ambientali, che possono determinare infezione in soggetti appartenenti ai sottogruppi più suscettibili della popolazione come

**Tabella 1.** - Epidemie idrodifuse associate all'acqua usata a scopo potabile e balneare riportate in 18 paesi Europei nel periodo 1986-96 (modificata da: Bartram *et al.*, 2002) [4]

Paese	n. di epidemie	n. di casi	Agente eziologico o malattia (n. di epidemie)
Albania	14	59	Dissenteria amebica (5), febbre tifoide (5), colera (4)
Croazia	29	1931	Dissenteria batterica (14), gastroenterite <sup>(a)</sup> (6), epatite A (4), tifo (4), criptosporidiosi (1)
Estonia	12	1010	Dissenteria batterica (7), epatite A (5)
Germania	0	0	Non sono state riportate epidemie
Grecia	2	16	Dissenteria batterica (1), tifo (1)
Islanda	1	10	Dissenteria batterica (1)
Lettonia	1	863	Epatite A (1)
Lituania	0 <sup>(b)</sup>	0	Non sono state riportate epidemie
Malta	162	19	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (152), dissenteria batterica (4), epatite A (4), giardiasi (1), tifo (1)
Norvegia	0	0	Non sono state riportate epidemie
Regno Unito	20	2810	Criptosporidiosi (13), gastroenterite <sup>(a)</sup> (6), giardiasi (1)
Rep. Ceca	18 <sup>(c)</sup>	76	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (15), dissenteria batterica (2), epatite A (1)
Rep. Slovacca	61	5173	Dissenteria batterica (30), gastroenterite <sup>(a)</sup> (21), epatite A (8), tifo (2)
Romania	57	745	Dissenteria batterica (36), gastroenterite <sup>(a)</sup> (8), epatite A (8), colera (3), tifo (1)
Slovenia	45	n.d.	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (33), dissenteria batterica (8), epatite A (2), dissenteria amebica (1), giardiasi (1)
Spagna	208	n.d.	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (97), dissenteria batterica (47), epatite A (28), tifo (27), giardiasi (7), criptosporidiosi (1), non specificato (1)
Svezia	53 <sup>(d)</sup>	27074	Gastroenterite <sup>(a)</sup> (36), campilobacteriosi (8), Norwalk like virus (4), giardiasi (4), criptosporidiosi (1), dissenteria amebica (1), <i>Aeromonas</i> sp. (1)
Ungheria	27 <sup>(e)</sup>	4884	Dissenteria batterica (17), gastroenterite <sup>(a)</sup> (6), salmonellosi (4)

(a) Da agente eziologico sconosciuto; (b) dati relativi solo a dieci anni; (c) dati relativi solo ad un anno; (d) in una epidemia *Campylobacter* sp., *Cryptosporidium* sp. and *Giardia duodenalis* sono stati identificati come agenti eziologici (tutti e tre sono stati elencati nella colonna); (e) epidemie associate con acqua potabile (n. = 12) e ad attività di balneazione (n. = 15); n.d. = non determinato.

neonati, anziani e soggetti immunodepressi. Tra gli opportunisti si annoverano specie batteriche che hanno come habitat anche l'ambiente acquatico, come *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Flavobacterium* spp.

La situazione relativa al rischio microbiologico associato all'acqua può essere diversa nei vari paesi in relazione al fatto che l'epidemiologia delle patologie idrodifuse è influenzata dalla interazione di una serie di fattori che determinano condizioni che possono

favorire o meno la diffusione attraverso l'acqua di microrganismi patogeni differenti in aree diverse. Tali fattori comprendono la presenza/assenza originaria di un microrganismo in un'area, le sue caratteristiche intrinseche (resistenza, infettività, dose infettante, ecc.), le condizioni climatiche che possono favorirne la sopravvivenza ed eventualmente la moltiplicazione. La pressione che determina la selezione di specifici microrganismi patogeni idrodifusibili e la loro circolazione in un'area è dovuta alla presenza di

sorgenti di contaminazione microbiologica e di attività antropiche che ne favoriscono la diffusione sul territorio, come la presenza di pascoli e la circolazione di animali selvatici, l'impiego di fertilizzanti organici naturali in agricoltura, le modalità di trattamento e smaltimento dei reflui civili e degli allevamenti, il trattamento effettuato sulle acque destinate ad uso potabile, la qualità dell'acqua impiegata a scopo irriguo, ecc. Anche la morfologia del territorio e le condizioni meteorologiche dell'area sono fondamentali per la idrodifusione di microrganismi patogeni, in quanto possono favorire o meno, attraverso fenomeni di percolazione e dilavamento, la contaminazione delle risorse idriche superficiali e profonde.

Una questione critica per i paesi industrializzati è comprendere se l'incidenza delle patologie idrodifuse sia realmente in aumento. L'aumento dell'incidenza riscontrato da alcuni autori potrebbe essere attribuibile ad una più attenta attività di sorveglianza e notifica rispetto al passato oppure ad un effettivo aumento dei fattori di rischio associati alle risorse idriche [8]. Tenendo presente questa considerazione, negli ultimi 30-40 anni negli USA è stato messo in evidenza un aumento dell'incidenza delle epidemie idrodifuse e, in particolare, è stato riscontrato un aumento del numero dei casi coinvolti in ogni epidemia [3].

L'aumento dell'incidenza delle epidemie idrodifuse nei paesi industrializzati è associabile a fattori che riguardano i microrganismi, come la comparsa di patogeni resistenti ai trattamenti di potabilizzazione e di microrganismi resistenti agli antibiotici. Intervengono anche fattori socio-demografici che hanno contribuito ad un aumento della suscettibilità della popolazione, come la minore immunizzazione rispetto al passato contro i patogeni, dovuta al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie, all'invecchiamento della popolazione ed all'incremento del numero degli immunodepressi (soggetti trapiantati, sottoposti a terapia immunosoppressiva, soggetti con AIDS). Anche la tendenza a centralizzare la gestione del ciclo delle acque e la produzione di acqua potabile hanno sicuramente contribuito al problema, se non altro per quanto riguarda l'aumento del numero dei casi coinvolti nelle epidemie.

Bisogna anche considerare l'esistenza di una situazione di sottostima delle epidemie idrodifuse causata dalla sottotifica e dalla presenza di microepidemie, condizioni che rendono difficile la stima dei reali livelli di incidenza. Inoltre, solo le infezioni sintomatiche vengono in parte notificate, mentre quelle asintomatiche sfuggono completamente. L'importanza di quest'ultima considerazione è legata al fatto che molti dei microrganismi agenti eziologici di patologie idrodifuse, quando sono presenti nell'acqua in basse concentrazioni, possono determinare infezioni asintomatiche. L'infezione

asintomatica di individui suscettibili può però determinare una condizione endemica, con la possibilità di causare epidemie derivanti da trasmissione interpersonale, attraverso gli alimenti o l'acqua, in conseguenza di esposizioni a cariche elevate del microrganismo rilasciate da portatori infetti [9]. In questo contesto bisogna tenere in considerazione che anche il miglioramento delle tecniche di determinazione sia diagnostiche, sia di controllo microbiologico delle matrici ambientali avvenuto negli ultimi anni può aver incrementato la percezione di questo problema.

Anche se la manifestazione associata più spesso al consumo d'acqua potabile rimane la gastroenterite, è importante ricordare che vi sono altre patologie determinate dall'esposizione ad acqua contaminata. Le gastroenteriti idrodifuse sono evidenti per la natura stessa dei sintomi e per il fatto che hanno un tasso d'attacco elevato (50% degli esposti). Vi sono però numerose altre patologie trasmissibili con l'acqua potabile, come polmoniti (*Legionella pneumophila*) e infezioni localizzate in diversi distretti, causate da patogeni e patogeni opportunisti (es. *Pseudomonas aeruginosa*), che assumono una notevole importanza per la salute pubblica e per le quali è molto spesso difficile riconoscere l'acqua quale sorgente d'infezione [10].

Trattando l'incidenza delle patologie idrodifuse si deve anche considerare il ruolo svolto dalle epidemie provocate dal consumo di alimenti venuti a contatto con acqua contaminata. Una quota rilevante delle patologie trasmesse da alimenti è infatti legata al loro contatto con acqua contaminata [11].

#### **Fattori associati alla comparsa di infezioni idrodifuse emergenti e riemergenti**

È possibile riconoscere una serie di fattori di carattere generale implicati nella comparsa di nuovi microrganismi patogeni e nei cambiamenti della diffusione delle infezioni nelle popolazioni dei diversi paesi.

I *cambiamenti demografici* verificatisi nei paesi industrializzati influiscono in modo determinante sulla diffusione delle patologie. Un fattore importante è rappresentato dalla tendenza all'invecchiamento delle popolazioni, che si sta verificando nei paesi industrializzati e che ha portato all'aumento del numero di soggetti suscettibili a potenziali patogeni. Anche l'incremento nella popolazione, legato all'aumento della speranza di vita, dell'incidenza e della prevalenza di patologie e condizioni associate a immunosoppressione (malattie ereditarie, infezione da HIV, trapianti d'organo, trattamenti immunosoppressivi per patologia cancerosa e reumatoide, ecc.) aumenta la suscettibilità

ad infezioni da parte di microrganismi che non causano malattia nei soggetti immunocompetenti. Infatti i soggetti immunodepressi hanno un maggiore rischio di ammalarsi e di morire per gastroenteriti diarroiche.

La maggior parte delle infezioni emergenti è associata anche al cambiamento dello stile di vita ed all'assunzione di *nuovi comportamenti*. Ad esempio, la diffusione dell'uso della doccia al posto della vasca da bagno e l'uso degli impianti di condizionamento dell'aria, causando aerosolizzazione dell'acqua, hanno certamente favorito la diffusione dell'infezione da *Legionella pneumophila* e da *Mycobacterium avium*.

Molti di questi patogeni sono in realtà *nuovi microrganismi* originati, in primo luogo, dall'abilità di acquisire facilmente la resistenza nei confronti di uno o più antibiotici e, in secondo luogo, dalla capacità di trasferimento del patrimonio genetico responsabile della patogenicità (le cosiddette *pathogenicity islands*) tra diversi microrganismi [12]. L'esempio più evidente è rappresentato dal ceppo patogeno enteromorragico di *E. coli* (EHEC) che si suppone abbia acquisito i geni della virulenza attraverso sistemi di trasferimento genico (lisogenia) [13].

Recentemente è stato ipotizzato che anche i *cambiamenti climatici* su piccola e larga scala possano aver contribuito alla diffusione di nuovi microrganismi patogeni. Nell'ultimo secolo si è osservato un aumento della temperatura media giornaliera e negli ultimi cinque anni la temperatura superficiale della Terra è risultata più alta rispetto agli analoghi periodi degli ultimi 600 anni. Questo ha influenzato la nuvolosità, le precipitazioni e la frequenza di eventi piovosi di elevata intensità, fenomeni frequentemente associati ad epidemie idrodifuse causate da microrganismi a trasmissione oro-fecale [14]. In particolar modo, si è osservata una maggiore diffusione nell'ambiente di alcuni batteri (*Campylobacter*, ecc.), virus (Calicivirus, ecc.) e protozoi (*Cryptosporidium*, *Giardia*), considerati per tale ragione patogeni "emergenti" [15].

Inoltre, i *cambiamenti ecologici* legati allo sviluppo economico ed agricolo sui territori (disboscamento, fertirrigazione, riuso delle acque in agricoltura, ecc.) hanno comportato continui cambiamenti a livello degli ecosistemi, andando ad influire anche sulla diffusione dei microrganismi [14]. Un altro aspetto importante è rappresentato dall'*intensificazione dei viaggi e del commercio internazionali*. Solo nel 1990 il numero di viaggiatori sulle rotte aeree internazionali è stato di 280 milioni, arrivando a 600 milioni nell'anno 2000. Per quanto riguarda il rischio di diffusione di patogeni associato alle attività commerciali, basta pensare che una rilevante proporzione della frutta e verdura consumate nei paesi industrializzati è coltivata in paesi diversi da dove vengono consumati [16].

Per quanto riguarda in particolare le acque potabili è importante tenere in considerazione anche altre problematiche più specifiche, che influiscono sulla microbiologia dell'acqua.

Uno dei problemi attualmente più diffuso e maggiormente pressante nell'ambito della produzione e distribuzione di acqua potabile è rappresentato dalla contaminazione microbiologica cronica o episodica dell'acqua. Il riscontro di acqua contaminata all'utenza può essere dovuto al fenomeno del *breakthrough*, cioè all'elusione del trattamento di potabilizzazione da parte di alcuni microrganismi (protozoi, virus e batteri) presenti nell'acqua grezza. Alcuni microrganismi possono attraversare illeso il trattamento di potabilizzazione perché resistenti a specifici trattamenti. Ad esempio, alcuni protozoi come *Cryptosporidium* e *Giardia* producono forme di resistenza ambientali (oocisti e cisti) insensibili ai trattamenti con i più comuni disinfettanti chimici (cloro, ipoclorito di sodio). Anche la maggior parte dei virus idrodiffusi è resistente ai trattamenti di disinfezione con cloro e non sempre viene abbattuta dai trattamenti fisici. Sembra addirittura che il trattamento determini una pressione selettiva sui patogeni che sviluppano un'ampia gamma di strategie di sopravvivenza. Altri microrganismi possono sopravvivere al trattamento di potabilizzazione rimanendo danneggiati (*injured*) e in uno stato quiescente che non ne consente la crescita nei comuni terreni di coltura, determinando una condizione detta VBNC (*viable but non culturable*) [17]. Il fenomeno è stato dimostrato prevalentemente per i batteri del gruppo dei coliformi, ma anche per altri batteri eterotrofi [18]. I batteri *injured* manifestano il danno subito con l'incapacità di crescere sui terreni selettivi utilizzati per la colimetria delle acque determinando risultati "falsi negativi" all'analisi microbiologica. Tuttavia, quando i batteri *injured* giungono nella rete di distribuzione, trasportati dall'acqua in zone favorevoli e protette come fondi rete, tubercoli e depositi nelle tubature, grazie alla concentrazione bassa di cloro residuo ed alla presenza di nutrienti, possono subire un processo di "rivivificazione" che li rende nuovamente attivi ed in grado di moltiplicarsi. Risultano così nuovamente rilevabili sui terreni di coltura e determinano risultati "falsi positivi" in conseguenza del fatto che il loro riscontro non è dovuto ad una reale situazione di contaminazione.

La contaminazione dell'acqua potabile può essere causata anche da un *incidente* durante il trattamento di potabilizzazione oppure dalla rottura di una tubazione.

Qualsiasi sia la loro origine nell'acqua potabile, i microrganismi possono andare incontro a moltiplicazione nella rete di distribuzione. In caso di *breakthrough* di microrganismi resistenti ai trattamenti oppure di contaminazione dovuta ad un incidente si

parla di *crescita* nella rete di distribuzione, mentre nel caso di microrganismi *injured* si parla di *ricrescita* [17].

La crescita/ricrescita batterica nelle reti di distribuzione può comportare delle conseguenze sulla qualità igienico-sanitaria dell'acqua. Un elevato carico batterico complessivo dell'acqua può provocare stress nei coliformi impedendone il rilevamento. Spesso elevati carichi batterici sono correlati con la scomparsa dei coliformi. Ma fatto ancora più grave è che carichi batterici elevati in assenza di coliformi sono stati ritrovati anche in occasione di epidemie idrodifuse. Inoltre la presenza di un elevato carico microbico provoca un deterioramento delle qualità organolettiche dell'acqua per la produzione di colorazioni, odori e sapori sgradevoli. Si può anche verificare un deterioramento della qualità chimica dell'acqua per il rilascio di metaboliti microbici e di metalli per fenomeni di corrosione biologica.

La crescita batterica porta alla formazione di un biofilm costituito da cellule microbiche, prodotti extracellulari, residui organici ed inorganici, che può provocare occlusione e corrosione delle tubature che necessitano pertanto di manutenzione o sostituzione. Il biofilm consente la crescita dei microrganismi in grado di moltiplicarsi nell'ambiente perché ricco di nutrienti e protettivo nei confronti dei disinfettanti utilizzati nella potabilizzazione. È anche un sito potenziale per il trasferimento della virulenza e della resistenza agli antibiotici tra i batteri [17, 18].

Si deve, infine, tenere presente che esistono alcune evidenze che il fenomeno della rivivificazione e ricrescita coinvolga oltre ai coliformi anche altri batteri ed altri microrganismi (funghi, protozoi e alghe). Esistono, pertanto, ragionevoli e preoccupanti possibilità che tra questi si possano ritrovare anche microrganismi patogeni e patogeni opportunisti che possono seguire lo stesso comportamento.

Per quanto riguarda il *controllo della qualità microbiologica delle acque* destinate al consumo umano i tradizionali indicatori microbiologici di contaminazione fecale (coliformi, *E. coli*, streptococchi, *C. perfringens*) hanno dimostrato di non essere sempre sufficienti come indicatori della presenza di patogeni. Infatti in numerose epidemie idrodifuse causate da protozoi, ma anche da virus, non sono stati rilevati coliformi [19, 20]. Ciò è imputabile al fatto che questi indicatori sono meno resistenti ai trattamenti di potabilizzazione e agli stress ambientali di alcuni protozoi e virus patogeni, ma anche di alcuni batteri (*Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*). Inoltre la condizione di VBNC dei coliformi può renderli non evidenziabili dai comuni controlli microbiologici dell'acqua. Ciò suggerisce la necessità di affiancare ai metodi tradizionali dei terreni di coltura per i VBNC per valutare il reale grado di

contaminazione dell'acqua. Inoltre il conteggio dei coliformi *injured* può essere un utile indicatore dell'efficacia del trattamento di potabilizzazione [21].

Oltre alla difficoltà di individuare degli indicatori efficaci, malgrado i recenti sviluppi tecnici nel settore dei metodi di analisi microbiologica, molti microrganismi patogeni non vengono facilmente identificati. In genere la presenza di un microrganismo nell'acqua, diviene evidente quando si verifica un'epidemia e si identifica come sorgente d'infezione comune l'acqua potabile. Molto spesso (circa nel 50 % dei casi) non è possibile giungere all'identificazione del microrganismo che ha causato l'epidemia. Pertanto, la comparsa di nuovi patogeni determina la necessità di sviluppare nuovi approcci per il monitoraggio della qualità microbiologica delle acque potabili.

Lo sviluppo recente dei metodi analitici in microbiologia, con particolare riferimento ai metodi molecolari, offre una maggiore sensibilità e specificità analitica, consente l'identificazione di microrganismi non rilevabili con i metodi tradizionali, permette di individuare nuovi ceppi patogeni e di ricostruire le dinamiche di trasmissione in caso di epidemia [21]. È ancora lontana, però, la possibilità di applicare questi metodi nei monitoraggi di routine. Inoltre, la determinazione con metodi molecolari di patogeni enterici non fornisce indicazioni sulla vitalità ed infettività dei microrganismi, se non impiegando tecniche analitiche sofisticate.

### Principali agenti eziologici di infezioni idrodifuse

La lista dei patogeni idrodifusi è ampia e comprende virus, batteri e protozoi. Ampia è anche la gamma delle patologie provocate da questi patogeni, che può andare da alterazioni gastro-intestinali a complicanze polmonari, fino anche alla morte di individui particolarmente suscettibili (es. malati di AIDS).

È noto che la diffusione delle infezioni attraverso l'acqua dipende dalla sopravvivenza nell'acqua dei microrganismi, dalla dose infettante, dal periodo di latenza e dalla capacità di moltiplicarsi nell'ambiente. Gran parte dei batteri patogeni ha origine fecale (es. *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter*), ma altri sono rappresentati da specie ambientali in grado di moltiplicarsi nell'acqua e nelle reti di distribuzione idrica (*Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*). Diversamente i virus (Rotavirus, Calicivirus) e i protozoi enterici (es. *Cryptosporidium*, *Giardia*) idrodifusibili non sono in grado di moltiplicarsi nelle acque, ma hanno una dose infettante tipicamente bassa, da unità a decine di unità infettanti,

e sono resistenti sia all'ambiente acquatico, sia ai trattamenti di potabilizzazione.

Di seguito verranno passati in rassegna alcuni tra i più importanti patogeni idrodiffusi nei paesi industrializzati, focalizzando l'attenzione sulle caratteristiche dei microrganismi e sulle epidemie veicolate dall'acqua (Tab. 2, 3, 4).

### Batteri

#### *Campylobacter spp.*

Il genere *Campylobacter* comprende *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* e *C. sputorum*: sono batteri mobili, gram negativi, microaerofili. Eccetto *C. jejuni* che ha una temperatura di crescita ottimale a 42°C, la maggior parte di questi microrganismi cresce bene a 37°C [1]. L'habitat naturale della maggior parte delle specie di *Campylobacter* è l'intestino degli uccelli o di altri animali omeotermi [22]. Può essere, però, rilevato in ambiente e nelle acque destinate ad uso potabile a seguito della contaminazione con feci di animali o individui infetti. Questi microrganismi non sono in grado di moltiplicarsi in ambiente, ma possono sopravvivere per alcune settimane a temperature intorno ai 4°C [23]. *Campylobacter* è in grado di provocare un ampio range di sintomatologie sia nell'uomo che negli animali. In particolare, nell'uomo determina dolori addominali e diarrea acuta, sintomi clinicamente indistinguibili da quelli della maggior parte delle gastroenteriti batteriche. La patologia è normalmente autolimitante, anche se l'1-2% dei pazienti può presentare, nella fase post-infezione, artrite ed infezioni che rientrano nel quadro clinico della sindrome di Guillan-Barrè. In studi condotti su soggetti volontari la dose infettante è stata riscontrata considerevolmente variabile, sebbene l'infezione possa essere causata dall'ingestione di poche migliaia di microrganismi [24]. Molte epidemie idrodifuse sono state provocate da *Campylobacter* [25]. Negli Stati Uniti tra il 1978 ed il 1986, 11 delle 57 epidemie attribuite a questo microrganismo sono state provocate dal consumo di acqua potabile risultata contaminata da acque non trattate, da feci di uccelli selvatici, oppure non adeguatamente trattata [23]. Infatti, a differenza di altri patogeni idrodiffusi, come *Cryptosporidium* e Norwalk virus, *Campylobacter* è sensibile all'azione disinfettante del cloro. Studi di inattivazione con cloro e monoclorammina a diverse condizioni di temperatura, pH e tempo di contatto hanno dimostrato che *Campylobacter* è più sensibile alla disinfezione chimica di *E. coli* [20]. Non sono invece disponibili dati sulla resistenza di *Campylobacter* ad altri trattamenti di potabilizzazione.

Numerose epidemie legate alla presenza di *Campylobacter* nelle acque potabili sono state riportate nei paesi del Nord Europa (Svezia, Norvegia e Finlandia) dove, in parecchie regioni, l'acqua viene utilizzata a scopo potabile senza alcun trattamento di disinfezione. L'origine idrica di queste epidemie è stata confermata da studi di tipizzazione con PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) condotti sui ceppi isolati dalle feci di soggetti malati e su ceppi isolati dall'acqua potabile [26]. Un simile approccio è stato utilizzato anche per risalire all'agente eziologico di alcune epidemie legate al consumo di acqua potabile che hanno avuto luogo tra il 1995-1996 in Danimarca. In tale occasione venne dimostrato che *Campylobacter jejuni* isolato da 110 soggetti tra i residenti e i visitatori dell'area con campilobatteriosi riconosciuta, apparteneva allo stesso sierotipo del ceppo isolato nei campioni d'acqua. Lo stesso studio proseguito con un'indagine telefonica ha messo in evidenza che, oltre ai casi di campilobatteriosi riconosciuti, altri 2400 soggetti nella zona avevano presentato, nello stesso periodo, sintomi di gastroenterite, suggerendo una diffusione più ampia dell'epidemia [27]. Un'altra epidemia di gastroenterite si è verificata in una cittadina svizzera (La Neuveville) di circa 3000 abitanti. Uno studio retrospettivo di coorte svolto su 1915 soggetti ha dimostrato la presenza della patologia nell'84% dei soggetti. *Campylobacter jejuni* è stato isolato dalle feci di 28 pazienti affetti da gastroenterite. Il rischio di contrarre la patologia è stato significativamente più alto nei soggetti che avevano bevuto acqua potabile con un incremento del rischio in relazione alla quantità di acqua consumata. L'origine della contaminazione è stata attribuita ad una inefficienza di una pompa nell'impianto di trattamento delle acque [25]. In Italia non sono state riportate epidemie di campilobatteriosi trasmesse attraverso il consumo di acqua potabile.

La ricerca di *Campylobacter* nelle acque presenta problematiche legate alla difficoltà di rilevare bassi livelli di contaminazione, senza attuare specifici metodi di concentrazione, ed alla difficoltà di crescita di *Campylobacter* sui terreni di coltura. I metodi microbiologici per la ricerca di *Campylobacter* sono laboriosi e necessitano tempi lunghi di esecuzione poiché richiedono arricchimenti selettivi, lunghi periodi di incubazione e l'identificazione con test biochimici [23]. Inoltre *Campylobacter*, se esposto a particolari condizioni di stress, può sopravvivere anche nella forma VBNC [28]. Ciò può spiegare il mancato isolamento di questo batterio da campioni di acqua implicati in epidemie utilizzando esclusivamente i metodi di coltivazione classici [29].

La correlazione tra la presenza di *Campylobacter* e gli indicatori utilizzati per valutare la qualità microbiologica delle acque non è chiara. Alcuni studi

**Tabella 2.** - Caratteristiche di alcuni batteri patogeni idrodifusi nei paesi industrializzati (modificata da: AWWA, 1999) [1]

Batteri	Resistenza ai trattamenti di potabilizzazione	Effetti sulla salute	Diffusione nelle acque	VBNC <sup>(a)</sup>	Persistenza in acque documentate	Epidemie idrodifuse
<i>Mycobacteria</i> ambientali <sup>(b)</sup>	Resistenti alla clorazione	Polmoniti, patologie gastrointestinali	Comune	No	Ricrescita	Sì
<i>Helicobacter pylori</i>	Sensibile alla disinfezione	Ulcera, possibile tumore allo stomaco	Abbastanza comune	No	Informazione non disponibile	No
<i>E. coli</i> patogeni	Sensibile alla disinfezione	Diarrea	Comune	Sì	Breve; 1 o 2 settimane	Sì
<i>Legionella</i>	Resistente alla clorazione	Polmonite	Comune	Sì	Lunga	Sì
<i>Aeromonas</i>	Sensibile alla clorazione	Gastroenterite	Comune	No	Media	No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente alla clorazione	Patologie gastrointestinali, infezioni polmonari	Comune	No	Media	No
<i>Campylobacter jejuni</i>	Sensibile alla disinfezione	Diarrea	Comune	Sì	Breve	Sì
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Sensibile alla clorazione	Diarrea	Abbastanza comune	No	Lunga	?

(a) VBNC (*viable but non culturable*); (b) comprende *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium* intracellulare; ? = informazione non disponibile; AWWA: American Water Works Association.

**Tabella 3.** - Caratteristiche di alcuni virus patogeni idrodifusi nei paesi industrializzati (modificata da: AWWA, 1999) [70]

Virus	Resistenza al Cl <sub>2</sub>	Dose infettante (pt. virali)	Effetti sulla salute	Diffusione nelle acque	Persistenza in acqua	Epidemie note
Enterovirus	Media	Bassa (1-10)	Vari (diarrea, paralisi, ecc.)	Comune	Lunga (90 gg)	Sì
Norwalk virus	Medio-alta	?	Diarrea, vomito	?	?	Sì
HAV	Medio-alta	Bassa (1-10)	Danni epatici	Comune	Lunga (120 gg)	Sì
HEV	?	Bassa (1-10)	Danni epatici	Comune	Lunga (120 gg)	Sì

AWWA: American Water Works Association; ? = informazione non disponibile.

**Tabella 4.** - Caratteristiche di alcuni protozoi patogeni idrodifusi nei paesi industrializzati (modificata da: AWWA, 1999) [70]

Protozoi	Resistenza al Cl <sub>2</sub>	Effetti sulla salute	Diffusione nelle acque	Persistenza in acqua	Epidemie note
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Alta	Diarrea acuta e cronica	Comune	Lunga	Sì
<i>Giardia</i> spp.	Alta	Diarrea e malassorbimento	Comune	Moderata	Sì
<i>Toxoplasma gondii</i>	?	Linfoadenopatia, febbre, infezioni congenite	?	?	Sì
<i>Microsporidia</i>	?	Diarrea e perdita di peso	?	?	Sì
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	?	Diarrea persistente	?	?	Sì

AWWA: American Water Works Association; ? = informazione non disponibile.



non hanno rilevato alcuna correlazione significativa tra la presenza di *Campylobacter* e la conta dei coliformi totali, dei coliformi fecali e degli streptococchi fecali. Al contrario, altri hanno creato un modello per predire la presenza di *Campylobacter* nell'acqua basato sul conteggio dei coliformi fecali e sulla valutazione della temperatura dell'acqua [30]. È possibile quindi che *Campylobacter* sia presente nell'acqua contemporaneamente agli indicatori di contaminazione fecale, ma che la sua densità non sia correlabile numericamente con quella degli indicatori. Ad esempio Stanley *et al.* (1998) hanno rilevato la presenza contemporanea di *Campylobacter* e degli indicatori di contaminazione fecale, sebbene la conta di *Campylobacter* risultasse più elevata nei campioni in cui gli indicatori fecali mostravano un conteggio più basso [31].

#### *Ceppi patogeni di Escherichia coli*

La contaminazione da parte di *Escherichia coli* patogeni delle acque rappresenta un importante problema di salute pubblica. *E. coli* vive nell'intestino di animali a sangue caldo compreso l'uomo. La maggior parte dei ceppi patogeni di *E. coli* isolati nelle acque possono provocare diarree persistenti. Inoltre, alcuni ceppi sono in grado di produrre tossine simili a quelle prodotte da *Vibrio cholerae* (*E. coli* enterotossici), altri possono invadere il tessuto intestinale (*E. coli* enteroinvasivi), altri ancora producono tossine emorragiche simili a quelle prodotte da *Shigella* (*E. coli* enteroemorragici). Particolare rilievo sta assumendo la diffusione dei ceppi enteromorragici e a questo sottogruppo appartiene il ceppo *E. coli* O157:H7 responsabile di alcune importanti epidemie idrodiffuse [1]. La prima epidemia associata alla presenza di questo microrganismo nelle acque potabili è stata riconosciuta in Missouri, USA, nel 1989. Essa determinò il coinvolgimento di più di 240 persone, con 32 ricoveri in ospedale e 4 morti. L'origine della contaminazione non è stata identificata con chiarezza, ma è stato ipotizzato che sia stata causata da una rottura verificatasi nella rete di distribuzione dell'acqua [32]. La più grande epidemia nota dovuta a *E. coli* O157:H7 ha avuto luogo a Walkerton in Ontario, USA, nel 2000 e ha interessato più di 2000 persone. L'indagine epidemiologica attribuì l'epidemia all'acqua potabile. Venne individuata quale possibile causa l'inefficienza del trattamento di potabilizzazione in occasione di un periodo particolarmente piovoso che aveva determinato una notevole attività di dilavamento del terreno, con aumento della torbidità dell'acqua in ingresso all'impianto. Fu anche dimostrata la presenza di fonti di contaminazione ambientale (es. allevamenti e pascoli) che avevano contribuito all'inquinamento della fonte di approvvigionamento idrico [33].

*E. coli* non risulta particolarmente resistente ai trattamenti di potabilizzazione e viene inattivato dal cloro e derivati già a basse concentrazioni [34].

Un altro problema importante da tenere in considerazione quando si fa riferimento a questi microrganismi è la presenza di numerose varianti fenotipiche del sierotipo O157:H7, che possono avere un considerevole impatto sui metodi di ricerca di questi patogeni [35]. Infatti, nonostante la presenza di *E. coli* O157:H7 nelle acque sia frequentemente suffragata da evidenze epidemiologiche, è spesso complesso isolare questo ceppo dall'acqua. Le difficoltà analitiche possono essere attribuite alla sensibilità limitata dei metodi microbiologici tradizionali [36]. Risultati migliori sono stati ottenuti con metodi molecolari anche se è necessario considerare che, anche se questi metodi mostrano una elevata sensibilità, specificità, e permettono di distinguere le diverse varianti fenotipiche, sono comunque troppo complessi e costosi per essere utilizzati come metodi per il controllo di routine [35].

#### *Helicobacter pylori*

L'infezione da *Helicobacter pylori* è diffusa in tutto il mondo ed è fortemente associata con le patologie gastroduodenali, incluse gastriti croniche, ulcere peptiche e duodenali e tumore gastrico [37]. Nei paesi in via di sviluppo l'infezione si manifesta più frequentemente nei giovani adulti, con una prevalenza che varia in alcune zone dal 70 all'80% della popolazione. Nei paesi industrializzati la prevalenza dell'infezione è più bassa, ma comunque significativa (dal 25 al 50%, soprattutto in età infantile) [38]. *Helicobacter pylori* è un batterio gram negativo, microaerofilo, mobile, con una temperatura ottimale di crescita variabile tra 30 e 37 °C [39]. Le modalità di trasmissione di questo microrganismo sono tuttora poco chiare anche se vi sono evidenze che confermano la via di trasmissione oro-fecale [40, 41]. Per quanto riguarda il ruolo dell'acqua nella trasmissione di questa patologia è stata frequentemente riportata in letteratura un'associazione epidemiologica tra presenza di *Helicobacter* nelle risorse idriche e prevalenza dell'infezione da *Helicobacter pylori* nella popolazione [42, 43]. In uno studio condotto recentemente su diverse risorse idriche in Pennsylvania e Ohio (n. = 62), la presenza di *Helicobacter pylori* è stata rilevata nella maggior parte dei campioni analizzati (60% nei campioni di acqua superficiale e 65% delle acque sotterranee), confermando una notevole diffusione di questo microrganismo nelle risorse idriche utilizzate a scopo potabile. Nello stesso studio, però, non è stata rilevata alcuna correlazione significativa tra la presenza di *Helicobacter* e quella degli indicatori di contaminazione fecale [44].

Per quanto riguarda la resistenza ai trattamenti di potabilizzazione, è confermato che *Helicobacter pylori*, come molti altri microrganismi, può essere rimosso dalle acque potabili con i convenzionali metodi di sedimentazione e filtrazione [1] ed è sensibile ai comuni trattamenti di disinfezione chimica [45]. Studi recenti hanno però ipotizzato la possibilità che i biofilm presenti nei sistemi di distribuzione delle acque potabili rappresentino un possibile serbatoio di diffusione di *Helicobacter pylori* [37, 46, 47]. Inoltre, in presenza di particolari condizioni di stress questo microrganismo può sopravvivere nella forma VBNC. In questo stadio il microrganismo non è in grado di crescere sui normali terreni di coltura, ma è comunque metabolicamente attivo [48]. Ciò è stato confermato in uno studio condotto da Aleljung *et al.* (1996) dove è stata dimostrata la capacità di *Helicobacter* nella forma VBNC, a bassa dose (100 CFU), di determinare infiammazione acuta della mucosa gastrica di topi [49].

Le comuni tecniche microbiologiche hanno mostrato efficacia limitata nel rilevare la presenza di *Helicobacter pylori* nell'acqua, che invece è stato frequentemente isolato nelle acque potabili con tecniche PCR ed ELISA [48].

#### *Yersinia enterocolitica*

*Y. enterocolitica* è un batterio gram negativo, mobile a 25 °C, psicrotrofo e, pertanto, in grado di sopravvivere a lungo nell'ambiente acquatico. Alcuni ceppi di *Y. enterocolitica* possiedono fattori di virulenza e sono patogeni per l'uomo. La patogenicità sembra essere dovuta alla invasione della mucosa dell'ileo, che causa diarrea ematica e mucosa, e alla produzione di una tossina termostabile che causa diarrea acquosa. Nella maggior parte dei casi determina sintomi gastroenterici come enterocolite con diarrea acuta, ileite, linfadenite mesenterica. Sono state rilevate anche sequele post-infezione, come artrite reattiva.

La maggior parte dei ceppi di *Y. enterocolitica* isolati dall'ambiente sono atipici, non sono patogeni per l'uomo e vengono definiti *Y. enterocolitica-like organisms*. Alimenti ed acqua contaminata rappresentano probabilmente le sorgenti di infezione principali. Carne e derivati, latte e prodotti lattiero-caseari costituiscono i maggiori veicoli di trasmissione, mentre la trasmissione dell'infezione attraverso l'acqua è ancora oggetto di discussione. Infatti, in presenza di bassi livelli di torbidità dell'acqua anche il solo trattamento di clorazione si è dimostrato sufficiente ad inattivare *Y. enterocolitica*.

In letteratura viene riportato un numero piuttosto limitato di gastroenteriti causate da *Y. enterocolitica* apparentemente associate a contaminazione dell'acqua potabile [41, 50, 51]. Numerosi animali sia domestici che selvatici costituiscono un possibile serbatoio di

*Y. enterocolitica*. È probabile che lepri, volpi e castori rappresentino un serbatoio naturale di questo batterio, mentre i maiali vengono considerati la più importante sorgente dei sierotipi che causano infezione nell'uomo. *Y. enterocolitica* è stata spesso isolata dall'acqua, ma i sierotipi riscontrati differiscono da quelli patogeni per l'uomo. È stata riscontrata la presenza di sierotipi patogeni nei reflui fognari e nelle acque superficiali e ci sono indicazioni che fanno presumere una possibile via di contaminazione delle acque potabili da acque superficiali contaminate o da scarichi civili. Bisogna anche considerare che la lunga sopravvivenza di questo microrganismo nell'ambiente acquatico aumenta la difficoltà di individuare l'origine della contaminazione. In generale, non sono stati riscontrati ceppi di *Y. enterocolitica* patogeni nelle acque potabili trattate e non trattate, in assenza di contaminazione fecale. D'altra parte ceppi non patogeni di *Y. enterocolitica*, di probabile origine ambientale, sono stati isolati dalle acque potabili, in assenza di alcun rischio per la salute pubblica [52].

#### *Batteri in grado di moltiplicarsi nelle riserve idriche*

Alcuni batteri ambientali in grado di moltiplicarsi nell'ambiente acquatico anche in presenza di un basso livello di nutrienti organici, possono essere patogeni opportunisti per l'uomo. Sono attualmente in discussione i possibili rischi per la salute determinati dalla loro presenza nelle acque potabili. In questo gruppo di potenziali patogeni i più importanti sono rappresentati da *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp., *Legionella* e *Mycobacteria* ambientali.

#### *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* è un microrganismo ubiquitario presente nell'acqua, nel suolo e nelle piante. Viene anche riscontrato nelle feci e nei reflui fognari. Non viene usato come indicatore di contaminazione fecale perché non si trova nel materiale fecale, ma soprattutto, perché può moltiplicarsi in ambiente acquatico in presenza di nutrienti e nel biofilm nella rete di distribuzione. Il suo riscontro nelle acque potabili è generalmente indice del deterioramento della qualità microbiologica dell'acqua, dovuto alla presenza di nutrienti, ad un flusso dell'acqua troppo basso o ad un trattamento di potabilizzazione insufficiente [20]. Infatti, *P. aeruginosa* per la capacità di produrre muco (composti alginati) è piuttosto resistente ai trattamenti chimici con cloro e derivati. Sono serbatoi di diffusione di *P. aeruginosa* i punti di erogazione degli impianti di distribuzione dell'acqua, come rubinetti, docce, ecc. difficilmente raggiungibili dal disinfettante residuo. Per queste caratteristiche

*P. aeruginosa* viene utilizzato come indicatore della qualità microbiologica dell'acqua potabile a livello della rete di distribuzione e della qualità delle acque imbottigliate, nonché come indicatore dell'efficacia del trattamento di potabilizzazione [53].

Non sono riportate in bibliografia epidemie idrodifuse ascrivibili a questo microrganismo, ma *Pseudomonas aeruginosa* è considerato un importante patogeno opportunista ed è uno dei principali agenti di infezioni nosocomiali (10-20%) [9, 52]. La maggior parte dei casi di infezione determinati da *P. aeruginosa* non è causata dal consumo di acqua potabile, ma dal contatto con essa. *P. aeruginosa* può provocare infezioni delle vie urinarie, delle ustioni e delle ferite, ulcere corneali e cheratiti, setticemie, gastroenteriti nei neonati, ascessi, broncopolmoniti e meningiti. Negli anni recenti, a causa dell'utilizzo diffuso di antibiotici e di altri agenti battericidi, ai quale tale microrganismo è notoriamente resistente è diventato un importante agente di infezioni animali ed umane, in particolare per individui immunodepressi [54].

#### *Aeromonas spp.*

*Aeromonas spp.* è diffusa nelle acque superficiali, acque dolci e marine e anche nel suolo. Nei climi temperati può moltiplicarsi in acqua se vi è un sufficiente apporto di nutrienti. Come *Legionella*, *Aeromonas spp.* è presente nelle risorse idriche destinate al consumo umano generalmente in piccole quantità, ma può moltiplicarsi nei sistemi di distribuzione delle acque per la capacità di crescere in presenza di pochi nutrienti [20]. L'entità dello sviluppo in rete varia considerevolmente in base alla disponibilità di nutrienti, il tempo di permanenza in rete e la temperatura dell'acqua. È stato riscontrato che la moltiplicazione di *Aeromonas* è proporzionale alla formazione potenziale di biofilm nelle condutture dell'acqua. Questa relazione tra ricrescita di *Aeromonas* e presenza del biofilm è alla base dell'impiego in Olanda di questo microrganismo come indicatore delle potenzialità di ricrescita batterica nelle reti (valore guida 200 CFU/100 mL) [41, 55]. Il possibile ruolo delle acque potabili come via di trasmissione dell'infezione da *Aeromonas spp.* è ancora in discussione, anche se è ormai noto che alcune fenospecie di *Aeromonas* sono in grado di produrre differenti fattori di virulenza, come tossine extracellulari, citotossine ed enterotossine [56]. Particolare interesse è stato rivolto allo studio di *Aeromonas hydrophila* che è stato riconosciuto come potenziale agente di gastroenteriti, setticemie, coliti e meningiti. Questo microrganismo è stato anche frequentemente isolato in infezioni di ferite dovute al contatto con acqua potenzialmente inquinata [57]. Diversamente da quanto messo in luce da studi

precedenti, studi recenti di tipizzazione non hanno rilevato alcuna correlazione tra gli isolati ottenuti da pazienti affetti da gastroenterite da *Aeromonas hydrophila* e i ceppi presenti nelle risorse idriche [58].

Sebbene questi batteri vengano frequentemente isolati dall'acqua, anche potabile, non sono note al momento epidemie idrodifuse causate da *Aeromonas spp.* [9, 59]. In uno studio condotto su risorse idriche italiane nella zona delle Dolomiti, su oltre 7000 campioni d'acqua analizzati in 3 anni, più del 20% è risultato positivo ad *Aeromonas spp.*, senza riscontrare alcuna correlazione tra la concentrazione di questi microrganismi e quella degli indicatori di contaminazione fecale [55].

#### *Legionella*

Il genere *Legionella* comprende 42 specie tra le quali *Legionella pneumophila* sierogruppo 1, risulta quella più frequentemente associata a patologia nell'uomo. L'infezione da *Legionella* può presentarsi in due forme differenti: la legionellosi o "morbo del legionario" che si manifesta come una polmonite acuta con una letalità del 10%, in assenza di opportuna terapia antibiotica e la febbre di Pontiac rappresentata da una forma autolimitante similinfluenzale non letale. La forma più pericolosa è la legionellosi nosocomiale che, se interessa soggetti immunodebilitati, ha un tasso di mortalità particolarmente elevato (20÷30%) [52, 60]. La legionellosi si presenta principalmente con casi sporadici di origine nosocomiale. Recentemente sono però stati segnalati anche casi di legionellosi riconducibili a precedenti viaggi in paesi con una maggiore frequenza della patologia [61]. Questa patologia è diffusa in molti paesi industrializzati, infatti nel solo dicembre 2003, i casi di legionellosi notificati al Sistema di Sorveglianza Europeo per la Legionella (in inglese European Working Group on Legionella Infections) erano 24 con segnalazioni provenienti principalmente dal Regno Unito (9 casi) e dall'Italia (6 casi). Molti di questi sono stati imputati a precedenti viaggi in diversi paesi del mondo (es. Repubblica Dominicana, USA, Italia, Spagna) [62].

L'infezione viene normalmente acquisita attraverso inalazione di aerosol contaminati. Questo microrganismo è comunemente presente in basse concentrazioni nell'ambiente acquatico e nelle risorse idriche utilizzate a scopo potabile. Diversi fattori abiotici, tra i quali la temperatura è il più importante, ne influenzano la sopravvivenza e la moltiplicazione. *Legionella* ha una temperatura di crescita ottimale di 30-40 °C, tra i 46-60 °C sopravvive ed oltre i 60°C viene uccisa. I serbatoi dell'acqua calda (*boiler*) possono fungere da "amplificatori" della concentrazione di questo batterio. *Legionella* può

colonizzare il sistema di distribuzione e di erogazione dell'acqua, le unità di trattamento dell'aria con sistema di raffreddamento ad acqua, i sistemi di umidificazione dell'aria e può essere diffusa in ambiente da qualsiasi mezzo che determini la produzione di aerosol (ad esempio docce, bocchette di aerazione) [9]. Recenti studi hanno inoltre dimostrato la capacità di *Legionella* di crescere intracellularmente in amebe come *Acanthamoeba* e *Naegleria* spp. ed in protozoi ciliati del gruppo di *Tetrahymena*, rimanendo protetta dall'azione dei disinfettanti [20]. Anche *Legionella*, come *P. aeruginosa* e *Aeromonas* viene tipicamente riscontrata nei biofilm.

La bonifica degli impianti contaminati è complessa e può essere effettuata attuando una combinazione di trattamenti, quali disinfezione con cloro ad elevate concentrazioni, trattamento con calore e irradiazione con UV. Non si riscontra correlazione tra la presenza di questo microrganismo e gli indicatori di contaminazione normalmente monitorati [57].

#### *Mycobacteria ambientali*

Il genere *Mycobacterium* comprende le specie strettamente patogene come *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. leprae* che non vengono trasmesse attraverso l'acqua, ma hanno solo serbatoi umani ed animali. Questo genere, però, comprende anche i cosiddetti micobatteri atipici, chiamati anche micobatteri ambientali, possibili patogeni per l'uomo, che possono avere serbatoi ambientali (ad esempio suolo e acqua) [20]. I micobatteri atipici sono infatti ubiquitari nell'ambiente acquatico e sono stati isolati nelle acque grezze e potabili [41, 63]. Negli ultimi anni i micobatteri ambientali sono emersi come causa di infezioni opportuniste in pazienti con AIDS. Il microrganismo maggiormente coinvolto in questo tipo di infezione è il *M. avium* che rappresenta la seconda causa di morte nei pazienti con AIDS [64]. Ad esempio *M. avium*, isolato in soggetti con AIDS nella città di Los Angeles, è stato geneticamente correlato agli isolati ottenuti dall'acqua che i pazienti utilizzavano per scopi potabili o ricreativi [1]. La maggior parte dei micobatteri, incluso *M. avium*, possono crescere nelle acque e sopravvivere ai normali trattamenti di disinfezione con cloro e ozono [65, 66]. Il riscaldamento dell'acqua nelle tubature di strutture pubbliche, come uffici e ospedali può, come nel caso di *Legionella*, favorire l'eliminazione dei micobatteri. È stato verificato sperimentalmente che l'esposizione di *M. avium* a temperature intorno a 60 °C per 4 minuti riduce la conta dei microrganismi vitali di 1 log [1]. I biofilm nelle tubazioni possono costituire un importante serbatoio e fonte di contaminazione di questi microrganismi [6]. I metodi analitici più frequentemente utilizzati per la ricerca dei micobatteri

nelle acque sono i metodi microbiologici classici, sebbene la crescita di questi microrganismi necessita di lunghi periodi di incubazione (più di 7 giorni a 37 °C) [1]. Negli ultimi anni a questi metodi sono stati affiancati protocolli di PCR multipla e l'uso di sonde a DNA [65, 67].

#### *Virus*

I virus sono patogeni obbligati intracellulari e sono costituiti da un acido nucleico genomico (*core*) a DNA o RNA circondato da una capsula protettiva proteica (*capside*). Alcuni virus hanno anche un rivestimento lipoproteico (*envelope*). L'elevata incidenza delle infezioni virali idrodifuse è dovuta alle caratteristiche dell'infezione virale che comporta l'escrezione di enormi quantità di particelle virali da parte dei soggetti infetti; a questo si aggiunge la bassa carica infettante e la resistenza tipica dei virus alle condizioni ambientali avverse e ai trattamenti di potabilizzazione sia chimici che fisici [68]. L'impatto delle infezioni virali viene ulteriormente aggravato dalla presenza di vie di trasmissione secondaria e terziaria diverse dall'acqua che rappresenta la via originaria. Inoltre, gli studi epidemiologici sulle infezioni virali sono complicati dalla presenza di soggetti infettati asintomatici, particolarmente i bambini, che eliminano virus all'esterno come i soggetti sintomatici.

I virus che sono in grado di moltiplicarsi nel tratto gastrointestinale dell'uomo o degli animali sono comunemente conosciuti come "virus enterici". Tra questi sono stati descritti più di 140 differenti tipi sierologici [69] e molti sono stati associati ad epidemie trasmesse dal consumo di acqua.

Nei paragrafi successivi saranno brevemente trattate le caratteristiche generali dei virus enterici ed in particolare dei Calicivirus data l'importanza che questi ultimi stanno assumendo nella trasmissione di patologie legate al consumo di acqua potabile.

#### *Virus enterici*

Tra i più importanti virus trasmessi attraverso le acque vi sono gli Enterovirus (Poliovirus, Coxsackie virus e Echovirus), i Rotavirus, HEV, gli Astrovirus e i Calicivirus [70, 71, 72, 73].

Nell'uomo i virus enterici sono trasmessi principalmente per via oro-fecale. Dopo la replicazione nel tratto gastrointestinale sono rilasciati nelle feci e possono persistere nell'ambiente [20]. La trasmissione può avvenire attraverso il consumo di acque non trattate oppure di acque potabili contaminate da reflui.

I virus enterici, data l'estrema resistenza alle condizioni sfavorevoli, possono persistere per lungo tempo nell'ambiente, mentre generalmente vengono inattivati dai comuni trattamenti di potabilizzazione

(ad eccezione dei Calicivirus). I trattamenti convenzionali combinati, fisici e chimici, delle acque rimuovono ad esempio essenzialmente tutti gli enterovirus (99,99%) [70]. Infatti le epidemie associate al consumo di acqua potabile si sono spesso verificate, non tanto per l'inefficienza dei trattamenti negli impianti, quanto piuttosto per contaminazioni crociate con la rete delle acque reflue [74]. Generalmente non si osserva una correlazione tra la presenza di questi virus ed i parametri microbiologici monitorati nella valutazione della qualità delle acque [20]. Particolare attenzione negli ultimi anni è stata rivolta allo studio della diffusione del virus dell'epatite E nelle risorse idriche nei paesi industrializzati. Infatti, sebbene il virus dell'epatite E sia diffuso in alcuni paesi in via di sviluppo (es. Asia, Africa e Messico), recenti studi hanno dimostrato una prevalenza di anticorpi anti-HEV pari all'1-5% nella popolazione statunitense e in quella di altre nazioni industrializzate, attestando la possibile presenza del virus anche in questi paesi [75]. Alcuni ceppi di HEV associati a epatiti acute sporadiche sono stati isolati da campioni di siero umano in Nord America ed Europa (es. Italia, Grecia, Spagna ed Inghilterra). Analisi molecolari hanno dimostrato che i ceppi isolati in questi paesi formano un gruppo geneticamente divergente rispetto ai ceppi rilevati nei paesi riconosciuti come endemici per HEV [76].

Un gruppo di virus che in quest'ambito merita un particolare approfondimento è quello dei Calicivirus. Già nel 1972 fu scoperto un virus in campioni di feci ottenuti nell'indagine epidemiologica effettuata in occasione di un'epidemia di gastroenterite scoppiata in una scuola elementare a Norwalk, Ohio, che venne definito "agente di Norwalk". Anche se questa era la prima scoperta di un virus specificatamente associato a gastroenterite, le ricerche sono progredite comunque molto lentamente per le grandi difficoltà incontrate nella sua identificazione. Infatti è stato raramente osservato al microscopio elettronico e non può essere amplificato in coltura cellulare o in modelli animali [77]; successivamente sono stati distinti antigenicamente altri virus differenti dal Norwalk virus, indicati come "*small round structured virus*" (SRSVs) o "calicivirus umani classici". La confusione nella nomenclatura generata dalla consuetudine di associare il nome del virus al luogo della scoperta (es. Norwalk, Hawaii ecc.) o alla morfologia al microscopio elettronico (es. SRSV, classici calicivirus) è stata recentemente chiarita. Infatti, a partire dal 1990, le tecniche molecolari (clonaggio e sequenziamento, ecc.) hanno permesso di rivoluzionare la classificazione dei Calicivirus [78]. Ad oggi, sulla base delle diverse sequenze genomiche, l'International Committee on Taxonomy of Viruses ha modificato la nomenclatura dei Calicivirus includendo 4 generi

("Norwalk-like virus" che comprende il Norwalk virus, "Sapporo-like virus", *Vesivirus* e *Lagovirus*) [73]. La trasmissione dei Calicivirus è principalmente di tipo oro-fecale ed è stata stimata una dose minima infettante tra le 10 e le 100 particelle virali [79].

Negli ultimi anni sono state numerose le epidemie determinate da Calicivirus trasmesse attraverso le acque potabili [74, 80, 81]. Ad esempio Kukkula ha riportato nel 1998 in Finlandia dai 1700 ai 3000 casi di gastroenterite legati al consumo di acqua potabile contaminata da Norwalk-like virus [82]. Anche in Italia si è verificata recentemente un'epidemia causata da Norwalk-like virus: a luglio del 2000 presso un villaggio turistico a Taranto 344 persone, tra staff e turisti, sono state colpite da gastroenterite acuta. Il Norwalk-like virus fu ritrovato nel materiale fecale e l'indagine epidemiologica individuò l'acqua quale più probabile via di trasmissione, poiché l'ispezione evidenziò una rottura nel sistema di distribuzione dell'acqua potabile e nella cisterna di raccolta venne rilevata contaminazione di origine fecale [83].

Poiché alcuni di questi virus, come ad esempio il Norwalk, sono relativamente resistenti alla semplice clorazione, si suppone che la contaminazione delle acque potabili con basse concentrazioni di questi virus possa verificarsi periodicamente o continuamente, provocando casi sporadici di infezione che rimangono sconosciuti [20].

Sfortunatamente i metodi microbiologici convenzionali per l'isolamento dei virus enterici dalle acque sono tecnicamente complessi, dispendiosi e con una bassa efficienza di recupero [84]. La possibile presenza di virus enterici anche a concentrazioni molto basse comporta la necessità di operare una concentrazione a partire da elevati volumi d'acqua. Inoltre, si rileva la mancanza di una metodica universalmente valida per tutti i virus enterici e dei mezzi per l'identificazione dei virus isolati [54]. I recenti sviluppi dei metodi molecolari hanno permesso di mettere a punto alcuni protocolli di ibridazione degli acidi nucleici, PCR ed RT-PCR utili per una rapida e sensibile ricerca dei virus enterici nelle acque [85]. Tali metodi però non consentono di discriminare le forme infettanti o inattive del virus e la necessità di concentrare l'acqua determina la concentrazione anche di sostanze (acidi umici e fulvici) che interferiscono con i metodi molecolari di identificazione. È necessario tenere comunque presente che l'accuratezza e la precisione dei metodi impiegabili per l'analisi degli altri virus enterici (campionamento, eluizione, concentrazione e allestimento del saggio) non sono state verificate per i Calicivirus. Inoltre, le tecniche basate sulla formazione di foci o placche in colture cellulari non sono generalmente applicabili per i Calicivirus, così come i test di infezione *in vivo* non possono essere utilizzati per la diversa suscettibilità

delle specie. Un dato importante da sottolineare è che i comuni indicatori batterici di contaminazione delle acque potabili poiché sono maggiormente sensibili dei virus ai trattamenti chimici e fisici di potabilizzazione non sono spesso in grado di segnalare la presenza di questi virus. Inoltre, la presenza degli indicatori batterici non è mai stata correlata in modo costante con la presenza dei virus [79].

#### Protozoi

I protozoi sono organismi unicellulari che possono essere comunemente considerati come la più semplice forma di vita animale. Le patologie ascrivibili a questi patogeni portano ad un significativa morbosità nell'uomo e costi economici elevati per la comunità. Questi parassiti, le cui forme infettanti sono escrete nelle feci e nelle urine, possono contaminare le risorse idriche impiegate a scopi potabili [86]. Numerosi sono i protozoi che possono utilizzare l'acqua come via di trasmissione. Di seguito verranno descritte le caratteristiche generali di alcuni di questi protozoi.

#### *Cryptosporidium spp.*

*Cryptosporidium* è un protozoo parassita noto da molto tempo. È stato osservato per la prima volta nel 1910 da Tyzzer nelle ghiandole gastriche di un topo con infezione asintomatica [87]. Attualmente al genere *Cryptosporidium* si ascrivono diverse specie come *C. parvum*, *C. muris*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis* e *C. wrairi* isolabili dai mammiferi; *C. bailey* e *C. meleagris* che parassitano gli uccelli, *C. nesorum* e *serpentis* riconosciuti come agenti patogeni rispettivamente dei pesci e di alcune specie di rettili [88]. Questo protozoo è un parassita obbligato in grado di moltiplicarsi solo nel rispettivo ospite. La forma infettante di *C. parvum* è rappresentata dall'oocisti escreta con le feci dagli animali o dagli individui infetti [89]. Le oocisti sono molto resistenti agli stress ambientali e possono sopravvivere per molte settimane o mesi in ambiente [90]. Sono anche resistenti alla concentrazione comunemente utilizzata del cloro e derivati e di ozono nei trattamenti chimici di potabilizzazione [20]. I trattamenti fisici di chiarificazione e di filtrazione, opportunamente ottimizzati, sono in grado di abbattere il numero delle oocisti nelle acque approssimativamente di due o tre ordini di grandezza [91].

Negli individui sani questo protozoo causa solo infezioni sub-cliniche e diarree autolimitanti, ma nei bambini e negli individui immunocompromessi può causare gravi, e a volte fatali, gastroenteriti [41].

La maggior parte delle segnalazioni di epidemie idrodifuse di criptosporidiosi riportate in letteratura provengono dagli USA, dal Canada e dal Regno Unito. Negli ultimi 12 anni, sono state riportate ben 39

epidemie di criptosporidiosi attribuibili al consumo di acqua negli Stati Uniti, in Canada, nel Regno Unito [92]. L'epidemia idrodifusa più estesa causata da *Cryptosporidium* si è verificata nel 1993 a Milwaukee, Wisconsin, USA; sono state coinvolte 403 000 persone e si sono verificati 100 decessi tra soggetti immunocompromessi, principalmente malati di AIDS [93, 94]. Un'analisi retrospettiva dei costi associati all'epidemia effettuata da Corso *et al.* (2003) ha calcolato una spesa pari a 31,7 milioni di dollari per spese mediche e 64,6 milioni di dollari per la perdita di produttività [95].

In Italia è stata segnalata un'unica epidemia significativa verificatasi in Emilia Romagna in una comunità per il recupero di tossicodipendenti nel mese di gennaio del 1995. Lo studio effettuato da Pozio *et al.* (1997) riporta risultati interessanti sulla diffusione delle manifestazioni cliniche e dell'infezione nella comunità in rapporto all'infezione da HIV. Gli autori calcolano un tasso d'attacco della criptosporidiosi clinica del 13,6% tra i sieronegativi per l'infezione da HIV e del 30,7% tra i sieropositivi [96]. Pur non essendo stata effettuata la ricerca delle oocisti nell'acqua potabile perché era trascorso troppo tempo dall'esordio dell'epidemia, anche per questo episodio è stata ipotizzata la diffusione idrica dell'infezione, perché alcuni campioni di sedimento prelevati dai serbatoi di raccolta dell'acqua dell'acquedotto impiegati per l'approvvigionamento della comunità sono risultati contaminati da oocisti di *Cryptosporidium*.

Un'altra epidemia di criptosporidiosi idrodifusa si è verificata in Francia a settembre del 2001. Questo episodio causò criptosporidiosi sintomatica in 563 persone con un tasso d'attacco del 50,8%. Le oocisti sono state ritrovate nell'acqua potabile e poiché nelle feci dei pazienti è stata rilevata anche la presenza di numerosi altri patogeni (Rotavirus gruppo A, Enterovirus, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* enteropatogeni, adenovirus) si è supposto che si fosse verificata una contaminazione dell'acqua potabile con reflui civili [97].

Il fatto che, ad esclusione del Regno Unito, nel resto dell'Europa siano state complessivamente segnalate poche epidemie di criptosporidiosi potrebbe essere dovuto alla effettiva assenza di contaminazione dell'acqua e degli alimenti oppure alla incapacità dei sistemi di sorveglianza di rilevare cluster di criptosporidiosi piccoli e sporadici. In alternativa, si potrebbe anche ipotizzare che in queste aree un elevato livello endemico dell'infezione da *Cryptosporidium* impedisca lo sviluppo della malattia clinica. Alcune indagini sierologiche e parassitologiche effettuate in Italia sia sulla popolazione immunocompetente che in soggetti con infezione-HIV attestano che la popolazione italiana è esposta all'infezione da *C. parvum* [98, 99, 96]. In uno studio sieroepidemiologico svolto da Frost *et al.* nel 2000 in una città del nord

Italia in un gruppo di 100 soggetti immunocompetenti viene rilevata una notevole diffusione della sieropositività (83%) agli antigeni di *C. parvum* [100]. In relazione a questi riscontri che fanno ipotizzare la possibilità che l'infezione sia endemica in Italia, è fondamentale individuare quale sia la via di trasmissione principale. Si può ipotizzare che le principali fonti di infezione per la popolazione generale possano essere rappresentate dal consumo occasionale di acqua non trattata, dal consumo di acqua potabile trattata in modo insufficiente, dal consumo di prodotti ortofrutticoli contaminati perché irrigati con acque contaminate o concimati con concimi organici naturali. Oocisti di *C. parvum* sono state ritrovate in Italia in acque superficiali grezze, ma non sono riportati casi di acque potabili contaminate [101, 102]. Pur considerando che in Italia la ricerca delle oocisti nelle acque è ancora limitata, alla luce di questi riscontri epidemiologici si potrebbe ipotizzare che, se la trasmissione fosse imputabile all'acqua potabile, potrebbe essere dovuta ad un basso livello di contaminazione intermittente e diffuso, tale da non essere rilevabile al controllo e tale da mantenere lo stato endemico, senza causare epidemie [103]. D'altra parte, a discapito di questa ipotesi, bisogna considerare che in Italia per bere si usa poco l'acqua del rubinetto, mentre si fa ampio uso di acqua minerale. L'Italia è il maggior consumatore di acqua minerale a livello europeo con una stima di 116 l/pro capite all'anno [104]. Ad esempio nella città di Torino solo il 5% dei residenti beve acqua del rubinetto. Da questa considerazione deriva la possibilità che il contatto con le oocisti avvenga prevalentemente attraverso altre vie, compresa quella alimentare.

Per quanto concerne il controllo delle acque potabili, bisogna considerare che molte delle epidemie di criptosporidiosi hanno avuto luogo quando i livelli dei parametri microbiologici utilizzati per valutare la qualità delle acque non segnalavano alcuna problematica [19]. Ciò è dovuto alla particolare resistenza delle oocisti ai trattamenti di disinfezione delle acque e sottolinea il fatto che gli indicatori di contaminazione fecale non sono sempre sufficienti per predire il rischio di contaminazione da oocisti.

Il metodo più comunemente utilizzato per la ricerca di *Cryptosporidium* nelle acque potabili prevede il campionamento dell'acqua mediante filtrazione su capsula o sistemi analoghi alternativi; purificazione delle oocisti con IMS (*immuno magnetic separation*); determinazione su vetrino con IFA (*immunofluorescence assay*) diretta, valutazione della vitalità con coloranti vitali [105]. In contemporanea sono stati sviluppati anche protocolli di PCR e RT-PCR per la ricerca di questo protozoo nelle acque [106, 107]. Informazioni più precise dal punto di vista quantitativo e genotipico sono state ottenute applicando protocolli

di biologia molecolare più sofisticati come ad esempio Real Time PCR e microarray [108, 109].

#### *Giardia spp.*

*Giardia duodenalis* (sinonimi *lamblia e intestinalis*) è stata osservata per la prima volta da van Leeuwenhoek nel 1681, ed è stata dettagliatamente descritta da Lambl nel 1859 [110]. Solo nel 1966 questo protozoo è stato riconosciuto come patogeno. Per mezzo di studi morfologici ed in base alla presenza di organelli nel citoplasma del trofozoite sono state identificate tre specie di *Giardia*: *G. agilis* che infetta gli anfibi, *G. muris* che infetta roditori, uccelli e rettili, *G. duodenalis* che infetta i mammiferi, incluso l'uomo. Non tutte le Giardie della specie *duodenalis* comunque causano infezioni nell'uomo [111]. Il ciclo vitale di *Giardia* è caratterizzato da 2 fasi: una attiva moltiplicazione del trofozoite nell'intestino dell'uomo e la produzione di una cisti resistente agli stress ambientali, che rappresenta la forma infettante di questo protozoo [87]. I sintomi della giardiasi includono diarrea persistente, dolori addominali e rapida perdita di peso, ma molti soggetti infettati possono restare asintomatici. Inoltre lo stato immunitario del soggetto infettato sembra influenzare la suscettibilità nei confronti di questa infezione, come anche la severità dei sintomi [112]. Negli Stati Uniti *Giardia* è il più comune agente eziologico di patologie idrodiffuse tanto che il 18% delle epidemie che si sono verificate tra il 1971 e il 1985 sono state attribuite a questo protozoo [86]. Inoltre, è stato calcolato che il 60% di tutti i casi di giardiasi in USA si sono verificati per ingestione di acqua contaminata [113]. Nel solo Canada più di 9000 casi di giardiasi sono stati notificati ogni anno dal Laboratory Centre for Disease Control in Ottawa [114].

Diversi studi hanno, inoltre, dimostrato come i più comuni trattamenti di potabilizzazione delle acque (come ad esempio la sola clorazione) non siano in grado di rimuovere le cisti presenti nelle acque [90]; i parametri microbiologici utilizzati per valutare la qualità delle acque, come i coliformi, non sono sempre utili per evidenziare la presenza di questo protozoo nelle acque [115]. Il metodo normalmente utilizzato per la ricerca di *Giardia* nelle acque potabili è analogo a quello impiegato per la ricerca di *Cryptosporidium*, sebbene siano stati sviluppati protocolli di biologia molecolare diversi (PCR, RT-PCR) [105, 116, 117, 118].

#### *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma* è un membro dello stesso phylum (*Apicomplexa*) di altri protozoi parassiti come *Cryptosporidium* e *Cyclospora*. Il nome della specie *gondii* è derivato dal nome del roditore africano (*Ctenodactylus*

*gundi*) nel quale questo parassita è stato descritto per la prima volta. Richiede due ospiti per completare il proprio ciclo vitale: un ospite intermedio ed un ospite definitivo [70]. Tutti i vertebrati a sangue caldo possono rappresentare l'ospite intermedio (uomo, uccelli ecc.) nel quale questo protozoo si moltiplica asessualmente, mentre solo i felini rappresentano gli ospiti definitivi dove avviene la riproduzione sessuale [119]. L'infezione viene contratta dall'uomo per ingestione di acqua o alimenti contaminati dalle oocisti di questo protozoo rilasciate in elevate quantità con le feci da gatti infetti oltre che dal consumo di carne infetta [120]. Le oocisti possono sopravvivere per mesi agli stress ambientali e poco si conosce sulla resistenza di questo protozoo ai comuni trattamenti di disinfezione delle acque [70, 121]. La prima epidemia di toxoplasmosi legata al consumo di acqua ha interessato l'esercito americano di stanza a Panama nel 1979. Le evidenze epidemiologiche hanno dimostrato che la contaminazione dell'acqua con feci di gatto era la più probabile causa dell'infezione [92, 121]. La seconda epidemia ha avuto luogo in British Columbia, Canada, nel 1995 con 110 casi di toxoplasmosi conclamata, tra i quali 42 donne in stato di gravidanza. Anche in questo caso evidenze epidemiologiche hanno individuato una possibile contaminazione dell'acqua come sorgente dell'infezione [122]. La più grande epidemia idrodiffusa di toxoplasmosi che ha coinvolto 290 persone si è verificata recentemente in Brasile a Santa Isabel do Ivaí. Anche in questo caso è stata riconosciuta come sorgente dell'infezione la risorsa idrica utilizzata da una parte della popolazione della piccola cittadina brasiliana [123].

I metodi utilizzati per la ricerca di questo protozoo nelle acque comprendono una fase di concentrazione delle oocisti con cartucce filtranti, purificazione su gradiente o con centrifugazione e flocculazione, e determinazione mediante esame al microscopio a contrasto di fase. La valutazione dell'infettività viene eseguita inoculando le oocisti in topi [120, 124].

#### *Microsporidia*

Microsporidi è un termine non tassonomico, usato per descrivere organismi appartenenti al *phylum Microspora* [87]. Questo *phylum* comprende approssimativamente 144 generi e più di 1000 specie [125]. Le due specie che rivestono il ruolo più importante come agenti eziologici di infezioni nell'uomo sono *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon intestinalis* [126]. Tutti i microsporidi sono parassiti intracellulari obbligati e non hanno stadi attivi al di fuori dell'ospite [127], mentre la forma infettante è rappresentata dalle spore in grado di sopravvivere in ambiente. La forma e la dimensione delle spore sono importanti caratteristiche strutturali poiché appaiono

relativamente costanti nei diversi generi e specie [87]. I sintomi tipici dell'infezione da microsporidi sono simili a quelli riportati per altri protozoi parassiti e comprendono diarrea cronica, disidratazione e perdita di peso (> 10% del peso corporeo) [128]. Questi protozoi sono principalmente patogeni opportunisti, in grado di infettare soggetti immunocompromessi [129]. Sin dal 1965 *Enterocytozoon bieneusi* è stato riconosciuto come un patogeno opportunista associato all'AIDS e sono state segnalate centinaia di pazienti con diarrea cronica attribuibile a questo microorganismo. Negli anni successivi i numerosi studi che si sono susseguiti sull'argomento hanno messo in evidenza che *Enterocytozoon bieneusi* è la causa di una proporzione significativa di casi di diarrea anche in soggetti non affetti da AIDS [130, 131]. Dagli studi attualmente a disposizione non si rilevano sostanziali andamenti o variazioni nella prevalenza di questa patologia in relazione al paese di origine oppure ad altre variabili socio-demografiche dei soggetti infettati [132]. Sebbene patologie umane associate a Microsporidi siano state prevalentemente riportate in Nord America, Europa Occidentale e Australia la microsporidiosi è diffusa in tutto il mondo e recentemente sono stati documentati casi in parecchie nazioni africane, nel Sud-Est asiatico ed in Sud America [133, 134, 135]. Manifestazioni gravi dell'infezione si verificano principalmente nei soggetti adulti immunodepressi soprattutto con HIV/AIDS [136], ma sta aumentando il riscontro di casi di microsporidiosi tra soggetti immunodepressi non per HIV e anche tra soggetti immunocompetenti, soprattutto tra viaggiatori [137, 138]. Le potenziali sorgenti di infezione ambientali da microsporidi che infettano l'uomo sono ancora poco chiare. Poiché altre infezioni da protozoi come *Giardia* e *Cryptosporidium* vengono trasmesse dall'acqua o da alimenti contaminati è stato ipotizzato che *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon intestinalis* possano essere trasmessi allo stesso modo. Anche se i dati a supporto di questa ipotesi sono molto limitati, riscontri recenti stanno cominciando a fornire un fondamento scientifico a questa ipotesi. In alcuni studi caso-controllo svolti su pazienti con HIV per studiare i fattori di rischio della microsporidiosi sono stati evidenziati come fattori significativi il nuoto in piscina e l'omosessualità maschile. Questo riscontro ha fatto ipotizzare una via di trasmissione oro-fecale, inclusa quella attraverso l'acqua e una via di trasmissione interpersonale della microsporidiosi. La presenza di infezioni del tratto respiratorio suggerisce che la microsporidiosi possa essere acquisita anche per via aerea [139].

Molto scarse sono le informazioni riguardanti la presenza e la distribuzione dei microsporidi patogeni per l'uomo in ambiente. I metodi comunemente



utilizzati per la ricerca di questi protozoi nei pazienti (microscopia elettronica) non sono applicabili nei campioni ambientali, data anche la grande diffusione di altri microsporidi in grado di infettare pesci ed insetti, ma non patogeni per l'uomo [20]. Anche l'uso dell'IFA per la ricerca di questi protozoi in ambiente ed in particolar modo nelle acque si è dimostrato inefficiente [140]. La fase di concentrazione dalle acque è basata sull'impiego di cartucce filtranti analoghe a quelle impiegate nella ricerca di *Cryptosporidium* e *Giardia* nelle acque. Recentemente, è stato però messo a punto un protocollo di PCR per la ricerca di *E. bienersi* e di tre specie di *Encephalitozoon* nelle acque. Con questi metodi è stata effettuata negli USA la ricerca dei Microsporidi in campioni ambientali (acque superficiali, sotterranee e reflui in uscita dagli impianti di depurazione), rilevandone la presenza in 7 dei 14 campioni analizzati [126].

In bibliografia è riportata un'unica epidemia idrodiffusa dovuta a microsporidi verificatasi in Francia nel 1995, che causò circa 200 casi di microsporidiosi, in maggioranza tra soggetti con AIDS. Il fattore maggiormente associato alla diagnosi di microsporidiosi è stata la residenza in una area specifica della città, in corrispondenza di uno dei tre sotto-sistemi di distribuzione delle acque. In questa epidemia è stata ipotizzata una contaminazione dell'acqua potabile con le acque non trattate di un lago [127].

Per quanto riguarda l'efficacia dei trattamenti di potabilizzazione bisogna considerare che le spore dei microsporidi, per le loro piccole dimensioni (1-5 µm), sono difficilmente eliminabili con i comuni trattamenti di filtrazione impiegati negli impianti di potabilizzazione. Considerando l'estrema resistenza di questi organismi in ambiente (alcune specie rimangono infettive per mesi o anni), l'uso dei disinfettanti chimici nel trattamento delle acque potabili rappresenta un punto critico [141].

#### *Cyclospora cayetanensis*

*C. cayetanensis* appartiene al phylum *Apicomplexa*, famiglia *Eimeriidae*. Il nome della specie deriva dal nome dell'Università che per prima ha iniziato gli studi su questo protozoo (Universidad Peruana Cayetano Heredia) [87]. Questo protozoo è stato osservato per la prima volta nel 1979, ma solo nel 1993 è stato classificato precisamente dal punto di vista tassonomico [70]. È un parassita intracellulare obbligato in grado di produrre oocisti (8-10 µm di diametro) ecrete con le feci dai soggetti infettati [87]. Studi preliminari hanno confermato un'elevata resistenza agli stress ambientali di queste oocisti poiché possono rimanere vitali per circa sei mesi alla temperatura di 4 °C [142]; sono anche resistenti ai

comuni trattamenti di disinfezione con cloro [143]. Sturbaum *et al.* nel 1998 e Sherchand *et al.* nel 1999 hanno evidenziato come potenziale sorgente di infezione per la ciclosporiasis l'acqua potabile contaminata e l'acqua di irrigazione in Nepal e Perù [144, 145]. Sono al momento riportate solo due epidemie di ciclosporiasis associate al consumo di acqua potabile contaminata. Un'epidemia si è verificata nel 1994 a Pokhara (Nepal) e ha coinvolto 14 soldati inglesi [146]. Sebbene non sia stata identificata la modalità di contaminazione dell'acqua da parte di *Cyclospora* questa tipologia di infezione era comunemente endemica in quel Paese e ciò ha fatto ipotizzare una contaminazione dell'acqua del fiume impiegata a scopo potabile [142]. Un'altra epidemia di ciclosporiasis è stata documentata negli Stati Uniti nel 1990 e coinvolse i medici di un dormitorio di Chicago. In tale occasione venne riscontrata la presenza di oocisti di *Cyclospora* nelle feci degli ammalati e, pur non avendone potuto riscontrare la contaminazione, la via più probabile di contaminazione è stata ritenuta l'acqua potabile [147].

Nei paesi industrializzati si sono verificate altre epidemie di ciclosporiasis causate però dal consumo di frutta e verdura importate da aree endemiche. Negli USA e in Canada è stata documentata nel 1996 un'epidemia che determinò ciclosporiasis in più di 1400 persone che avevano consumato lamponi importati dal Guatemala. Anche nel 1997 si verificarono altre epidemie di ciclosporiasis negli USA causate da lamponi, basilico e lattuga importati [148].

In Europa sono stati segnalati alcuni casi di ciclosporiasis tra soggetti che avevano viaggiato in aree endemiche, mentre è nota un'unica epidemia di ciclosporiasis di origine alimentare avvenuta in Germania nel dicembre 2000. Questa epidemia ha interessato 26 persone che avevano consumato pasti separatamente ed in giorni diversi in uno stesso ristorante. Anche se non fu possibile riscontrare la contaminazione, l'insalata venne individuata quale alimento responsabile dell'epidemia dall'analisi epidemiologica. L'insalata era stata acquistata in parte ai mercati generali, proveniente da un venditore all'ingrosso francese, ed in parte era stata acquistata da un rivenditore all'ingrosso in Italia, nella provincia di Bari [149]. Quanto accaduto per questa epidemia fa ipotizzare che l'origine della contaminazione sia da ricercare nei lavoratori agricoli provenienti da zone endemiche ed impiegati nelle coltivazioni nelle aree di provenienza dell'insalata. Considerando che è necessario che le oocisti di *Cyclospora* rimangano per qualche tempo in ambiente perché diventino infettanti si può ipotizzare che la contaminazione dell'insalata sia avvenuta attraverso il suolo e l'acqua [150]. Questo episodio è particolarmente significativo perché mette in evidenza che, oltre al rischio di contrarre l'infezione

attraverso l'importazione di alimenti contaminati da aree endemiche, esiste la possibilità di una diffusione ambientale di questo parassita anche nelle aree non endemiche, se l'ambiente è adatto alla sua sopravvivenza.

Ad oggi non vi sono riferimenti di legge per il controllo della presenza di questo protozoo nelle acque potabili e non sono disponibili metodi di routine per la sua ricerca [151]. Alcuni protocolli per la ricerca di *Cryptosporidium* sono stati utilizzati con successo per la ricerca di *Cyclospora* nelle acque. Non sono però disponibili anticorpi monoclonali utilizzabili per la ricerca specifica con il metodo IFA delle oocisti di questo protozoo nelle acque, mentre le colorazioni normalmente utilizzate per la diagnosi di molti organismi nelle feci non sono affidabili [87].

### Conclusioni

#### *Interventi necessari per diminuire e controllare la diffusione dei patogeni idrodifusi nei paesi industrializzati*

Gli interventi di prevenzione dovrebbero basarsi sul controllo (*control*) dei rischi di contaminazione e sulla presenza di un trattamento di potabilizzazione adeguato al tipo di risorsa, cioè in grado di eliminare o abbattere i contaminanti microbiologici specifici di quella risorsa. In altri termini è fondamentale per il gestore della risorsa idrica, per garantire la sicurezza, conoscere a fondo le caratteristiche della risorsa e i rischi, sia costanti che accidentali, di inquinamento ai quali questa può essere soggetta. L'impiego di un approccio preventivo è anche indicato nella Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, attualmente in corso di recepimento o attuazione nei paesi della CE. La Direttiva, in base al principio di sussidiarietà, consente agli stati membri di introdurre nelle proprie legislazioni nazionali parametri di controllo addizionali rispetto a quelli indicati, laddove la situazione nazionale o territoriale lo richieda per tutelare la salute umana [152].

Da queste considerazioni emerge l'importanza di utilizzare un approccio preventivo per il controllo dei rischi associati alle acque potabili basato sull'impiego della metodologia dell'analisi dei rischi (*risk analysis*) e sull'applicazione del sistema HACCP (*hazard analysis critical control point*) nella produzione di acqua potabile [153,154].

L'analisi dei rischi può essere organizzata applicando le fasi caratteristiche della *risk analysis* al contesto specifico della gestione del ciclo dell'acqua:

- *Identificazione del rischio (hazard identification)*. È un processo qualitativo e ha l'obiettivo di

identificare la tipologia di microrganismi che può determinare un rischio nelle risorse idriche in studio. Si deve operare l'analisi delle caratteristiche di ogni risorsa idrica utilizzata a scopo potabile (acque superficiali o di falda), con particolare riferimento all'analisi della struttura del territorio ed al censimento delle attività presenti nell'area di ciascun bacino idrogeologico per individuare potenziali sorgenti di contaminazione microbiologica delle risorse idriche. La valutazione di queste informazioni consentirà di identificare rischi microbiologici specifici per ogni risorsa, ovvero, i patogeni (batteri, virus, protozoi) dei quali, in relazione alla tipologia di contaminazione, si può ipotizzare la presenza nelle diverse risorse idriche.

- *Valutazione dell'esposizione (exposure assessment)*. È un processo di stima mediante opportuni fattori di incertezza della presenza/assenza dei microrganismi patogeni individuati nella fase precedente e del grado di contaminazione delle risorse idriche. Si attuano dei piani di monitoraggio per ogni risorsa idrica per la ricerca dei patogeni in parallelo alla valutazione di alcuni parametri correlabili come *E. coli*, spore di *Clostridium perfringens*, torbidità, conteggio delle particelle, ecc. Le informazioni fornite dal monitoraggio, esteso per un lungo periodo, per valutare l'influenza dei fattori che variano durante l'anno, consentiranno di conoscere il livello di rischio microbiologico per ciascuna risorsa idrica. Ciò consente anche di valutare se il trattamento di potabilizzazione è adeguato, tenendo in considerazione condizioni di contaminazione estreme che si possono verificare in circostanze eccezionali.

- *Caratterizzazione del rischio (hazard characterization)*. Descrizione degli effetti che derivano dall'ingestione attraverso l'acqua potabile dei patogeni, facendo riferimento, se disponibili, ai valori della dose-infettante e alla curva dose-risposta. Questa fase prevede l'impiego di informazioni provenienti dalla letteratura relative a ciascun patogeno e patologia (studi epidemiologici, sorveglianza, ecc.).

- *Stima del rischio (risk characterization)*. Integrazione delle informazioni ottenute dalle fasi precedenti. Questa fase fornisce una mappatura del rischio per i patogeni considerati in relazione alle risorse idriche ed una stima del rischio per le popolazioni residenti.

Le informazioni acquisite possono essere impiegate per la gestione della risorsa, cioè per modulare il trattamento di potabilizzazione e per effettuare una scelta dei parametri da impiegare per il controllo della qualità microbiologica dell'acqua prodotta in base al tipo rischio individuato.

In Italia la Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 è stata recepita con il decreto legislativo 2 febbraio 2001 n. 31 che è entrato in vigore a dicembre 2003 [155]. Ciò potrà costituire l'occasione

per indurre sia i gestori delle risorse, sia gli enti preposti al controllo (ASL, ARPA, Laboratori di Sanità Pubblica) a sfruttare in tutte le sue potenzialità l'enorme messe di dati sulla qualità dell'acqua prodotti e raccolti da tempo, che fino ad oggi è stata sicuramente sottoutilizzata.

Un altro utile mezzo per garantire la qualità dell'acqua è l'applicazione del sistema HACCP (*hazard analysis critical control point*) nella produzione dell'acqua potabile. Questo metodo, utilizzato già da tempo per la valutazione e il controllo dei rischi nel settore alimentare, si basa sulla individuazione di punti critici (*critical points*) lungo la filiera produttiva utilizzando l'analisi dei rischi. Tra i punti critici lungo la filiera vengono individuati dei punti critici di controllo (*critical control points*) dove verrà effettuato il monitoraggio per controllare l'assenza dei rischi.

Per attuare in modo proficuo gli approcci descritti è importante conoscere l'epidemiologia e la diffusione dei patogeni attraverso l'acqua nelle diverse realtà territoriali. Si rende necessario, pertanto, migliorare le attività di sorveglianza in quest'ambito. È fondamentale organizzare un sistema specifico di sorveglianza per le patologie idrodifuse. La maggior parte degli Stati Membri dell'Unione Europea non ha un sistema di sorveglianza adeguato per le WBD. La situazione per quanto riguarda la notifica delle WBD, che rappresenta la base di un sistema di sorveglianza, è molto diversa tra i Paesi. Infatti, alcuni paesi prevedono la notifica di alcune WBD (es. Germania, Svezia, Belgio), mentre la maggior parte non hanno l'obbligo legale di notificare le WBD, ma fanno rientrare queste segnalazioni in altri sistemi di notifica, come quello per le patologie infettive (es. Italia, Francia, Ungheria) [156]. Gli attuali sistemi di sorveglianza sono portati a sottostimare il livello delle WBD. Infatti, sono in grado di rilevare le epidemie che rappresentano una piccola porzione delle WBD, ma nella maggior parte dei casi non sono in grado di rilevare i casi sporadici e le microepidemie causate dal consumo di acqua.

È importante anche che vengano messi a punto dei protocolli standardizzati per attuare indagini epidemiologiche approfondite in presenza di epidemie idrodifuse.

Infine, considerando che le principali cause di epidemie idrodifuse nei paesi industrializzati sono rappresentate dall'uso potabile di acque non trattate o trattate in modo inadeguato e dalla contaminazione secondaria di acque potabilizzate durante la distribuzione, è necessario operare degli interventi in più ambiti. Si devono sviluppare dei programmi di protezione delle fonti di approvvigionamento basati principalmente sull'attuazione di trattamenti adeguati delle acque reflue civili prima dell'introduzione nei

corpi idrici e dei concimi provenienti dalla zootecnia prima dell'impiego in agricoltura. È importante anche proseguire con lo studio di trattamenti di potabilizzazione dell'acqua più adeguati e, soprattutto, più specifici in relazione alla tipologia di risorsa idrica e alle sue fonti di contaminazione, in modo tale da evitare la selezione di patogeni resistenti e la formazione di biofilm. Si deve inoltre provvedere all'attuazione di un rinnovo delle reti di distribuzione ed alla loro manutenzione programmata. Infine, bisogna intervenire anche sulle modalità di controllo studiando dei metodi per il monitoraggio microbiologico dell'acqua basati sull'impiego di indicatori aggiuntivi oltre a quelli già impiegati e sull'uso di tecniche molecolari standardizzate applicabili nelle analisi di routine. Infine, bisogna sottolineare l'importanza dell'approccio preventivo precedentemente discusso per quanto riguarda soprattutto il rischio di contaminazione da virus e protozoi. Infatti non essendo disponibili degli indicatori di contaminazione efficaci per questi patogeni il controllo del rischio può essere basato solo sulla specificazione delle caratteristiche che deve avere l'acqua grezza e sull'efficienza del trattamento di potabilizzazione, piuttosto che sulla ricerca diretta dei protozoi e dei virus.

Ricevuto l' 8 settembre 2003.

Accettato il 2 febbraio 2004.

#### BIBLIOGRAFIA

1. American Water Works Association. Committee report emerging pathogen bacteria. *JAWWA* 1999;91:101-9.
2. Lee SH, Levy DA, Craun GF, Beach MJ, Calderon RL. Surveillance for waterborne-disease outbreak - United States, 1999-2000. *MMWR* 2002;51(SS-8):1-47.
3. Morris RD, Levin R. Estimating the incidence of waterborne infectious disease related to drinking water in the United States. In: Reichard EG, Zapponi GA (Ed.). *Assessing and managing health risks from drinking water contamination: approaches and applications*. Wallingford: IAHS; 1995. p.75-88.
4. Bartram J, Thyssen N, Gowers A, Pond K, Lack T. *Water and health in Europe*. WHO; 2002. (WHO Regional Publications) p. 109-17.
5. Poullis DA, Attwell RW, Powell SC. An evaluation of waterborne disease surveillance in the European Union. *Rev Environ Health* 2002;17(2):149-61.
6. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995;1(1):7-15.
7. Sharma S, Sachdeva P, Virdi JS. Emerging water-borne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;61(5-6):424-8.
8. Kramer MH, Herwaldt BL, Craun GF, Calderon F, Juranek DD. Surveillance of waterborne disease outbreaks - United States, 1993-1994. *MMWR* 1996;45:1-15.

9. Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol* 2002;28(4):371-409.
10. Payment P, Hunter PR. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water. In: Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: guidelines, standards and health*. London: IWA Publishing; 2001. p. 61-89.
11. Palumbo SA, Rajkowski T, Miller AJ. Current approaches for reconditioning process water and its use in food manufacturing operations. *Trend Food Sci Technol* 1997;8(3):69-74.
12. Egli T, Koster W, Meile L. Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:111-2.
13. O'Brien AD, Kaper JB. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In: Kaper JB, O'Brien AD (Ed.). *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington: DC:ASM Press; 1998. p. 1-11.
14. Patz JA, Epstein PR, Burke TA, Balbus JM. Effects of environmental change on emerging parasitic disease. *Int J Parasitol* 2000;30:1395-405.
15. Rose JB, Daeschner S, Easterling DR, Curriero FC, Lele S, Patz J. Climate and waterborne disease outbreaks. *JAWWA* 2000;92(9):77-87.
16. Louri DB. Emerging and re-emerging infections: the social determinants. *Futures* 2000;32:581-94.
17. Momba MNB, Kfir R, Venter SN, Cloete TE. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA* 2000;1:59-66.
18. Leclerc H. Relationship between common water bacteria and pathogens in drinking water. In: Bartram J, Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A (Ed.). *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*. London: IWA Publishing; 2003. p. 80-118.
19. Barrell RA, Hunter PR, Nichols G. Microbiological standards for water and their relationship to health risk. *Commun Dis Pub Health* 2000;3(1):8-13.
20. Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, Schleifer KH. Microbiological safety of drinking water. *Ann Rev Microbiol* 2000;54:81-127.
21. Romprè A, Servais P, Baudart J, de-Roubin M, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods* 2002;49:31-54.
22. Berndtson E, Emanuelson U, Engvall A, Danielsson-Tham ML. A 1-year epidemiological study of campylobacters in 18 swedish chicken farms. *Prev Vet Med* 1996;26:167-85.
23. Waage AS, Vardun T, Lund V, Kapperud G. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(4):1636-43.
24. Fricker C. Waterborne Pathogens In: *Manual of Water Supply Practices*. Denver: American Water Works Association; 1999. p. 67-70.
25. Maurer AM, Stuchler D. A waterborne outbreak of small round structured virus, *Campylobacter* and *Shigella* co-infections in La Neuville, Switzerland, 1998. *Epidem Infect* 2000;125(2):325-32.
26. Hanninen ML, Haajanen H, Pummi T, Wermundsen K, Katila ML, Sarkkinen H, Miettinen I, Rautelin H. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(3):1391-6.
27. Engberg J, Gernere-Smith P, Scheutz F, Moller Nielsen E, On SL, Molbak K. Water-borne *Campylobacter jejuni* infection in a Danish town - a 6 week continuous source outbreak. *Clin Microbiol Infect* 1998;4(11):648-56.
28. Talibart R, Denis M, Castillo A, Cappellier JM, Ermel G. Survival and recovery of viable but noncultivable forms of *Campylobacter* in aqueous microcosm. *Int J Food Microbiol* 2000;55(1-3):263-7.
29. Jones DM, Sutcliffe EM, Curry A. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J Gen Microbiol* 1999;137:2477-82.
30. Savill MG, Hudson JA, Ball A, Klena JD, Scholes P, Whyte RJ, McCormick RE, Jankovic D. Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *Appl Environ Microbiol* 2001;91:38-46.
31. Stanley K, Cunningham R, Jones K. Isolation of *Campylobacter jejuni* from groundwater. *J Appl Microbiol* 1998;85:187-91.
32. Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhoea and death. *Ann Intern Med* 1992;117:812-9.
33. Canada Communicable Disease Report. *Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, 2000*;26(20):170-3
34. Rice EW, Clark RM, Clifford HJ. Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg Infect Dis* 1999;5(3):461-3.
35. Feng P. *Escherichia coli* Serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerg Infect Dis* 1995;1(2):47-53.
36. Lejeune JT, Besser TE, Rice DH, Hancock DD. Methods for isolation of water-borne *Escherichia coli* O157. *Lett Appl Microbiol* 2001;32:316-20.
37. Park SR, Mackay WG, Reid DC. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Wat Res* 2001;35(6):1624-6.
38. Meng J, Doyle MP. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bull Inst Pasteur* 1998;96:151-64.
39. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(4):720-41.
40. Vincent P. Transmission and acquisition of *Helicobacter pylori* infection: evidences and hypothesis. *Biomed Pharmacother* 1995;49:11-8.
41. Theron J, Cloete TE. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, detection tools. *Crit Rev Microbiol* 2002;28(1):1-26.

42. Baker KH, Hegarty JP. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water is associated with clinical infection. *Scand J Infect Dis* 2001;33(10):744-6.
43. McKeown I, Orr P, Macdonald S, Kabani A, Brown R, Coghlan G, Dawood M, Embil J, Sargent M, Smart G, Bernstein N. *Helicobacter pylori* in the Canadian arctic: seroprevalence and detection in community water samples. *Am J Gastroenterol* 1999;94(7):1823-9.
44. Hegarty JP, Dowd MT, Baker KH. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J Appl Microbiol* 1999;87:697-701.
45. Johnson CH, Rice EW, Reasoner DJ. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(12):4969-70.
46. MacKay WG, Gribbon LT, Barer MR, Reid DC. Biofilms in drinking water systems - A possible reservoir for *Helicobacter pylori*. *Wat Sci Technol* 1998;38(12):181-5.
47. Bunn JEG, MacKay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett Appl Microbiol* 2002;34:450-4.
48. Velasquez M, Feirtag JM. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *Int J Food Microbiol* 1999;53:95-104.
49. Aleljung P, Nilsson HO, Wang X, Morner T, Warsame I, Wadstrom T. Gastrointestinal colonisation of BALB/cA mice by *Helicobacter pylori* monitored by heparin magnetic separation. *FEMS Immun Ed Microbiol* 1996;13:303-9.
50. Eden KV, Rosemberg ML, Stoopler M, Wood BT, Highsmith AK, Skaliy P, Wells JG, Feeley JC. Waterborne gastrointestinal illness at a ski resort. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from drinking water. *Public Health Rep* 1977;92(3):245-50.
51. Schieman DA. Isolation of *Yersinia enterocolitica* in drinking water. In: Mc Feters GA (Ed.). *Drinking water microbiology: progress and recent development*. New York: Springer-Verlag; 1990. p. 322-7.
52. WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. Vol. 2, Health criteria and other supporting information. Geneva: WHO; 1996. p. 20-1.
53. Grobe S, Wingender J, Flemming HC. Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *Int J Hyg Environ Health* 2001;204(2-3):139-42.
54. Ottaviani M, Bonadonna L. *Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano. Parte 2. Metodi microbiologici*. Roma: Rapporti ISTISAN; 2000.
55. Legnani P, Leoni E, Soppelsa F, Burigo R. The occurrence of *Aeromonas* species in drinking water supplies of an area of the Dolomite Mountains, Italy. *J Appl Microbiol* 1998;85:271-6.
56. Brandi G, Sisti M, Giardini F, Schiavano GF, Albano A. Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas* spp. in different types of water. *Lett Appl Microbiol* 1999;29:211-5.
57. Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. Bacteriological quality. In: Health Canada, Water Quality and Health Bureau *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*. Ottawa: Health Canada; 2002.
58. Borchardt MA, Stemper ME, Standridge JH. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. *Emerg Infect Dis* 2003;9(2):224-8.
59. Ivanova EP, Zhukova NV, Gorshkova NM, Chaikina EL. Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from a drinking water reservoir. *J Appl Microbiol* 2001;90:919-27.
60. Kool JL, Carpenter JC, Fields BS. Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *Lancet* 1999;333(9149):272-7.
61. Luck PC, Helbig JH, Schuppler M. Epidemiology and laboratory diagnosis of *Legionella* infections. *J Lab Med*, 2002;26(3-4):174-82.
62. Ricketts K. *EWGLINET Summary Report: December 2003*. European Working Group on *Legionella* Infections (EWGLI). (<http://www.egli.org>).
63. Falkinham III JO, Norton CD, Le Chevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other *Mycobacteria* in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(3):1225-31.
64. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma Jr GN. Occurrence of nontuberculous Mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(6):2492-6.
65. Taylor RH, Falkinham III JO, Norton CD, Le Chevallier MW. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(4):1702-5.
66. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(3):1025-32.
67. Chang CT, Wang LY, Liao CY, Huang SP. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(6):3159-61.
68. Payment P. Viruses: prevalence of disease, levels, and sources. In: Craun CF (Ed.). *Safety of Water Disinfection: Balancing Chemical and Microbial Risk*. Washington DC: ILSI Press; 1993. p. 99-113.
69. Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. Virological Quality of Drinking Water. In: Health Canada, Water Quality and Health Bureau *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*. Ottawa: Health Canada; 2003.
70. American Water Works Association. Committee Report. Emerging pathogens viruses, protozoa, and algal toxins. *JAWWA* 1999;91(9):110-21.
71. Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB. Detection of Astroviruses, Enteroviruses, and Adenovirus Type 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by information collection rule and an integrated cell-culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(6):2520-5.
72. Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Brengel-Pesce K, Soule H, Innocenti-Francillard P, Bost M, Gofiti L, Zmirou D, Seigneurin JM. Detection of human and animal Rotavirus sequences in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(6):2690-2.

73. Regenmortel van MHV, Fauquet GM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Ed.). *Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press; 2000.
74. Hafliger D, Hubner P, Luthy J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 2000;54:123-6.
75. Grimm AC, Fout GS. Development of a molecular method to identify hepatitis E virus in water. *J Virol Methods* 2002;101(1-2):175-88.
76. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Bofill-Mas S, Girones R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 2003;9(4):448-54.
77. Monroe SS, Ando T, Glass RI. Introduction: human enteric calicivirus - An emerging pathogen. Whose time has come. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl. 2):S249-51.
78. Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. The epidemiology of enteric Calicivirus from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl. 2):S254-61.
79. Schaub SA, Oshiro RK. Public health concerns about calicivirus as waterborne contaminants. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl. 2):S374-80.
80. Brugha R, Vipond IB, Evans MR, Sandifer QD, Roberts RJ, Salmon RL, Caul EO, Mukerjee AK. A community outbreak of food-borne small-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidemiol Infect* 1999;122(1):145-54.
81. Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V, Rogues AM, Gachie JP, Lafon ME, Fleury HJ. A hospital outbreak of gastroenteritis possibly related to the contamination of tap water by a small round structured virus. *J Hosp Infect* 1999;43(2):149-54.
82. Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, Von Bonsdorff CH. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like virus. *J Infect Dis* 1999;180(6):1771-6.
83. Boccia D, Tozzi AE, Cotter B, Rizzo C, Russo T, Buttinelli G, Caprioli A, Marziano ML, Ruggeri FM. Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis* 2002;8(6):563-8.
84. Li JW, Wang XW, Yuan CQ, Zheng JL, Jin M, Song N, Shi XQ, Chao FH. Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in water by consensus primer multiplex RT-PCR. *World J Gastroenterol* 2002;8(4):699-702.
85. Huang PW, Laborde D, Land VR, Matson DO, Smith AW, Jiang X. Concentration and detection of Calicivirus in water samples by RT-PCR. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(10):4383-8.
86. Gold D, Smith HV. Pathogenic protozoa and drinking water. In: Palumbo F, Ziglio G, van der Beken A (Ed.). *Detection methods for algae, protozoa and helminths in fresh and drinking water*. Chichester: Wiley & Sons; 2002. p. 143-66.
87. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(1):67-85.
88. Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, Zhang X, Fayer R, Lal A.A. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int J Parasitol* 2002;32:1773-85.
89. Toze S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Wat Res* 1999;33(17):3545-56.
90. Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol* 1998;84:1165-9.
91. Onghert JE, Percoraro JP. Removing *Cryptosporidium* using multimedia filters. *JAWWA* 1995;87:83-90.
92. Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonose associated with water and food. *Int J Parasitol* 2000;30:1379-93.
93. MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Eng J Med* 1994;331(3):161-7.
94. Naumova EN, Egorov AI, Morris RD, Griffiths JK. The elderly and waterborne *Cryptosporidium* infection: gastroenteritis hospitalizations before and during the 1993 Milwaukee outbreak. *Emerg Infect Dis* 2003;9(4):418-25.
95. Corso PS, Kramer MH, Blair KA, Addiss DG, Davis JP, Haddix AC. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 2003;9(4):426-31.
96. Pozio E, Rezza G, Boschini A, Pezzotti P, Tamburrini A, Rossi P, Di Fine M, Smacchia C, Schiesari A, Gattei E, Zucconi R, Ballarini P. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)- Induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-Positive and HIV-Negative former injection drug users. *J Infect Dis* 1997;176:969-75.
97. Dalle F, Roz P, Dautin G, Di Palma M, Kohli E, Sire-Bidault C, Fleishmann MG, Gallay A, Carbonel S, Bon F, Tilier C, Beaudou P, Bonnin A. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. Collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2690-3.
98. Brandonisio O, Maggi P, Panaro MA, Lisi S, Andriola A, Acquafredda A, Angarano G. Intestinal protozoa in HIV-infected patients in Apulia, South Italy. *Epidemiol Infect* 1999;123:457-62.
99. Gomez-Morales MA, Ausiello CM, Urbani F, Pozio E. Crude extract and recombinant protein of *Cryptosporidium parvum* oocysts induce proliferation of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Infect Dis* 1994;172:211-6.
100. Frost FJ, Fea E, Gilli G, Biorci F, Muller TM, Craun GF, Calderon RL. Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in southern Europe. *Eur J Epidemiol* 2000;385-90.
101. Carraro E, Fea E, Salva S, Gilli G. Impact of a wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in a surface water. *Wat Sci Technol* 2000;41(7):31-7.
102. Bonadonna L, Briancesco R, Ottavini M, Deschetti E. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. *Environ Monit Assess* 2002;75(3):241-52.

103. Gale P. Developments in microbiological risk assessment for drinking water. *J Appl Microbiol* 2001;91:191-205.
104. Bertolini R, Fabbri M, Di Tanno N (Ed.). *Ambiente e salute in Italia*. Centro Europeo Ambiente e Salute OMS. Roma: Il Pensiero Scientifico; 1997.
105. US-EPA, Office of Water *Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA*. Washington, DC: EPA; 2001.
106. Rochelle PA, De Leon R, Steward MH, Wolfe RL. Comparison of primer and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(1):106-14.
107. Whu Z, Nagano I, Matsuo A, Uga S, Kimata I, Iseki M, Takahashi Y. Specific primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. *Mol Cell Probes* 2000;14(1):33-9.
108. Fontaine M, Guillot E. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;214:13-7.
109. Straub TM, Daly DS, Wunshel S, Rochelle PA, DeLeon R, Chandler DP. Genotyping *Cryptosporidium parvum* with an hsp70 single-nucleotide polymorphism microarray. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(4):1817-26.
110. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(3):447-75.
111. Conio O, Palumbo F, Borelli E, Gilli G, Carraro E, Pignata C (Ed.). *Giardia e Cryptosporidium nell'ambiente acquatico. Diffusione nelle acque, problematiche igienico-sanitarie, metodi di determinazione, trattamenti di rimozione*. Milano: Franco Angeli; 2001.
112. Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000;30:1259-67.
113. Carraro E. An overview of concentration techniques for *Giardia* and *Cryptosporidium* - In: Palumbo F, Ziglio G, van der Beken A (Ed.). *Detection methods for algae, protozoa and helminths in fresh and drinking water*. Chichester: Wiley & Sons; 2002. p. 167-78.
114. Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. Protozoa in drinking water In: Health Canada, Water Quality and Health Bureau *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*. Ottawa: Health Canada; 1998.
115. Craun GF, Berger PS, Calderon RL. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *JAWWA* 1997;89(3):96-104.
116. Kaucner C, Stinear T. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cyst and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fibreglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(9):1743-9.
117. Mahbubani MG, Bej AK, Perlin MG. Differentiation of *Giardia intestinalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol* 1992;30:74-8.
118. Mahbubani MH, Schaefer III FW, Jones DD, Bej AK. Detection of *Giardia* in environmental waters by Immuno-PCR amplification methods. *Curr Microbiol* 1998;36:107-13.
119. Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoft C, Schwantje H, Ribble CS. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol Infect* 1999;122:305-15.
120. Kourenti C, Heckerath A, Tenter A, Karanis P. Development and application of different methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(1):102-6.
121. Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *New Engl J Med* 1982;307:666-9.
122. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 1997;350:173-7.
123. Hudson Keenihan S, Schettters T, Taverne J. Toxoplasmosis in Brazil. *Trends Parasitol* 2002;18:203-4.
124. Isaac-Renton J, Bowie WR, King A, Irwin GS, Ong CS, Fung CP, Shokeir MO, Dubey JP. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(6):2278-80.
125. Weiss LM. Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop* 2001;78:89-102.
126. Dowd SC, Gerba CP, Pepper IL. Confirmation of the human-pathogenic Microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(9):3332-5.
127. Franzen C, Muller A. Cryptosporidia and Microsporidia waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:245-62.
128. Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, Gelas P, Persat F, Piens MA, Trepo C. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in person with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1999;180:2003-8.
129. Mathis A. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Int J Parasitol* 2000;30:795-804.
130. Rabodonirina M, Bertocchi M, Desportes-Livage I, Cotte L, Levrey H, Piens MA, Monneret G, Celard M, Mornex JF, Mojon M. *Enterocytozoon bienersi* as a cause of chronic diarrhea in a heart-lung transplant recipient who was sieronegative for human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1996;23:114-7.
131. Sax PE, Rich W, Pieciak S, Trnka YM. Intestinal microsporidiosis occurring in a liver transplant recipient. *Transplantation* 1995;60:617-8.
132. Kyaw T, Curry A, Edwards-Jones V, Craske J, Mandal BK. The prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients from the northwest of England: 1992-1995. *Br J Biomed Sci* 1997;54:186-91.
133. Aoun K, Bouratbine A, Detry S, Biligui S, Ben Ismail R. Presence of intestinal microsporidia in Tunisia: apropos of 1 case. *Bull Soc Pathol Exot* 1997;90:176.

134. Morakote N, Siriprasert P, Piangjai S, Vitayasai P, Tookyan B, Uparanukraw P. *Microsporidium* and *Cyclospora* in human stool in Chiang Mai, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1995;26:799-800.
135. Brasil P, Sodre FC, Cuzzi-Maya T, Gutierrez MC, Mattos H, Moura H. Intestinal microsporidiosis in HIV-positive patients with chronic unexplained diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil: diagnosis, clinical presentation, and follow-up. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996;38:97-102.
136. Bryan RT. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. *Clin Infect Dis* 1995;21(Suppl):S62-5.
137. Cotte L, Rabodonirina M, Raynal C, Chapuis F, Piens MA, Trepo C. Outbreak of intestinal microsporidiosis in HIV-infected and non-infected patients. In: *Abstract of the 5 Conference on Retroviruses and opportunistic Infection*. Chicago, 1-5 February 1998.
138. Albrecht H, Sobottka I. *Enterocytozoon bieneusi* infection in patients who are not infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1997;25:344.
139. Bryan RT, Schwartz DA. Epidemiology of microsporidiosis - In: Wittner M, Weiss LM (Ed.). *The microsporidia and microsporidiosis*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999. p. 502-16.
140. Dowd SC, Gerba CP, Kamper CP, Pepper IL. Evaluation of methodologies including immunofluorescent assay (IFA) and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of human pathogenic microsporidia in water. *J Microbiol Methods* 1999;35:43-52.
141. Huffman DE, Gennaccaro A, Rose JB, Dussert BW. Low- and medium-pressure UV inactivation of microsporidia. *Encephalitozoon intestinalis*. *Wat Res* 2002;36:3161-4.
142. Herwaldt BL. *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin Infect Dis* 2000;31:1040-57.
143. Dalton C, Goater D, Pethig R, Smith HV. Viability of *Giardia intestinalis* cysts and viability and sporulation state of *Cyclospora cayetanensis* oocysts determined by electrorotation. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(2):586-90.
144. Sturbaum GD, Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR, Cabrera L, Klein DA. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in wastewater. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(6):2284-6.
145. Scherchand JB, Cross JH, Jimba M, Scherchand S, Shrestha MP. Study of *Cyclospora cayetanensis* in health care facilities, sewage water and green leafy vegetables in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999;30:2262-5.
146. Rabold JG, Hoge CW, Shim DR. *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water. *Lancet* 1994;334:1360-1.
147. Huang P, Weber JT, Sosin DM, Griffin PM, Long EG, Murphy JJ, Kocka F, Peters C, Kallick C. The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. *Ann Internal Med* 1995;123:409-14.
148. Nichols R, Smith H. Parasites: *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Cyclospora* as foodborne pathogens. In: Blackburn W and Mc Clure P (Ed.). *Foodborne Pathogens*. Boca Raton: CRC Press; 2002. p. 453-78.
149. Doller PC, Dietrich K, Filipp N, Brockmann S, Dreweck C, Vonthein R, Wagner-Wiening C, Wiedenmann A. Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerg Infect Dis* 2002;8:992-4.
150. Shields MJ, Olson BH. *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int J Parasitol* 2003;33:371-91.
151. Quintero-Betancourt W, Peele ER, Rose JB. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J Microbiol Methods* 2002;49:209-24.
152. Direttiva 98/83/CE 3/11/98 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* n. 330, 5 dicembre 1998.
153. Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: Guidelines, Standards and Health*. WHO Water Series, London: IWA Publishing; 2001.
154. Stevenson KE, Bernard DT (Ed.). *HACCP: establishing hazard analysis critical control point programs A workshop manual*. Washington, DC: Food Processor Institute; 1995. p. 187-90.
155. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* n. 52, 3 marzo 2001.
156. WHO. *Waterborne disease surveillance: goals and strategies*. Copenhagen: WHO Report, 2001.