



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Παράσιτα στα τρόφιμα και μέθοδοι ανίχνευσης

English Title

Foodborne parasites and detection methods

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ / NAME OF STUDENT

Παπάζογλου Αγγελική/
Parazoglou Aggeliki

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ / NAME OF THE SUPERVISOR

Χούχουλα Δήμητρα/
Houhoula Dimitra

ΑΙΓΑΛΕΩ / AIGALEO 2023

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει την πτυχιακή εργασία με τίτλο «Παράσιτα στα τρόφιμα και μέθοδοι ανίχνευσης» που παρουσιάσθηκε από την Παπάζογλου Αγγελική και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

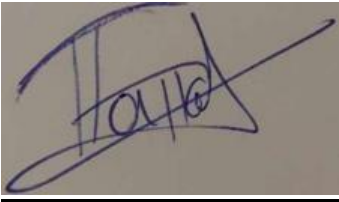
Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Πατάζογλου Αγγελική

A handwritten signature in blue ink on a light-colored background. The signature is stylized and appears to read 'Αγγελική Πατάζογλου'.

Παράσιτα στα τρόφιμα και μέθοδοι ανίχνευσης

Περίληψη.....	9
Ορισμός παράσιτα	9
Τροφιμογενή και υδατογενή παράσιτα ιατρικής σημασίας.....	10
Ποια τρόφιμα μπορούν να μεταφέρουν παράσιτα;	11
Πρωτόζωα	12
Τροφιμογενή παρασιτικά σκουλήκια	12
Πόσο μεγάλο πρόβλημα αποτελούν τα παράσιτα;	13
Πώς μπορούν να ελεγχθούν τα παράσιτα;.....	14
Καθαριότητα και υγιεινή.....	14
Κτηνοτροφία και επιθεώρηση	14
Μαρινάρισμα, πάστωμα, κάπνισμα, ζύμωση	15
Μαγείρεμα και θερμική επεξεργασία.....	15
Κατάψυξη.....	16
Δήθηση και χλωρίωση και άλλα απολυμαντικά	16
Άλλες φυσικές διεργασίες	17
Στόχοι κύκλου ζωής	17
Κύκλοι ζωής των παρασίτων	18
Άμεση επαναμόλυνση	19
Ολοκλήρωση του κύκλου ζωής σε έναν ξενιστή	19
Ένας ενδιάμεσος ξενιστής.....	19
Δύο ενδιάμεσοι ξενιστές	21
Πρωτόζωα παράσιτα	22
Toxoplasma gondii.....	22
Cryptosporidium spp.	26
Giardia.....	29
Entamoeba histolytica	32
Cyclospora cayetanensis	35
Microsporidia	37
Παρασιτικά σκουλήκια – Νηματώδεις	37
Anisakis και Pseudoterranova (Sealworm, Codworm)	37
Ascaris.....	39
Trichinella spiralis (Trichinosis)	40
Παρασιτικά σκουλήκια - Κεστώδεις.....	42
Taenia spp.	42
Echinococcus spp.	44
Diphyllobothrium spp. (ταινία των ψαριών)	45
Παρασιτικά σκουλήκια - Τρηματώδεις	46
Clonorchis/Opisthorchis (Liver flukes)	46
Fasciola hepatica (Liver fluke).....	47
Fasciolopsis buski (Fasciolopsiasis, Intestinal fluke).....	49
Paragonimus (Lung fluke).....	50
Μέθοδοι ανίχνευσης τροφιμογενών παρασίτων	51
Συμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης.....	52
Σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης	58
Νέες τεχνικές	63
Μικροσυστοιχίες	63
Βιοασθητήρες.....	64
Φασματομετρία μάζας.....	64
Συλλογή συνθετικού πολυμερούς	65
Νανοτεχνολογίες	65
Μέθοδοι ανίχνευσης παρασίτων σε ορισμένα τρόφιμα.....	71
Μέθοδοι ανίχνευσης στα τρόφιμα (Cryptosporidium)	71
Μέθοδοι ανίχνευσης σε νωπά προϊόντα (Cryptosporidium)	73
Μέθοδοι ανίχνευσης σε χυμούς φρούτων (Cryptosporidium)	74

Μέθοδοι ανίχνευσης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (<i>Cryptosporidium</i>)	76
Μέθοδοι ανίχνευσης σε οστρακοειδή μαλάκια (<i>Cryptosporidium</i>)	76
Μέθοδοι ανίχνευσης στο κρέας (<i>Cryptosporidium</i>)	78
Μέθοδοι ανίχνευσης στα τρόφιμα (<i>Toxoplasma gondii</i>)	78
Μέθοδοι ανίχνευσης σε νωπά προϊόντα (<i>Toxoplasma gondii</i>)	79
Μέθοδοι ανίχνευσης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (<i>Toxoplasma gondii</i>).....	79
Μέθοδοι ανίχνευσης σε οστρακοειδή μαλάκια (<i>Toxoplasma gondii</i>).....	80
Μέθοδοι ανίχνευσης στο κρέας (<i>Toxoplasma gondii</i>)	81
Μέθοδοι ανίχνευσης στα τρόφιμα (<i>Echinococcus</i>)	82
Μεθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για ανίχνευση παρασίτων στην Κίνα	82
Συμπεράσματα	85
Βιβλιογραφία.....	86

Περίληψη

Τα παράσιτα στα τρόφιμα αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών σε όλο τον κόσμο. Η παρουσία παρασίτων σε διάφορα είδη τροφίμων μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις, όπως αλλεργικές αντιδράσεις, μολυσματικές ασθένειες, ακόμα και θάνατο. Στο παρόν κείμενο, θα εξετάσουμε τη φύση των παρασίτων στα τρόφιμα, τις επιπτώσεις της παρουσίας τους στην υγεία, και τα μέτρα που λαμβάνονται για την πρόληψη και τον έλεγχό τους καθώς και διάφορες μεθόδους ανίχνευσης παρασίτων στα τρόφιμα. Τα παράσιτα είναι οργανισμοί που επιβιώνουν και αναπαράγονται σε ζωντανούς ή νεκρούς οργανισμούς, καθώς και σε τρόφιμα. Ορισμένα από αυτά μπορούν να είναι ορατά με γυμνό μάτι. Οι επιπτώσεις των παρασίτων στην υγεία είναι σημαντικές. Ορισμένα παράσιτα προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις ενώ άλλα παράσιτα προκαλούν μολυσματικές ασθένειες. Υπάρχουν επίσης παράσιτα που επιβιώνουν από την ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά, δυσκολεύοντας έτσι τη θεραπεία των μολύνσεών τους. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσία παρασίτων στα τρόφιμα είναι πολλοί. Για παράδειγμα οι κακές συνθήκες υγιεινής, μπορούν να διευκολύνουν την ανάπτυξη παρασίτων. Επιπλέον, η έλλειψη τήρησης υγειονομικών προτύπων στις επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων αποτελεί κίνδυνο για την εμφάνιση παρασίτων στα προϊόντα. Για την πρόληψη και τον έλεγχο των παρασίτων στα τρόφιμα, υπάρχουν διάφορα μέτρα που λαμβάνονται. Οι χώρες εφαρμόζουν αυστηρούς κανονισμούς υγιεινής και ασφάλειας τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των προτύπων HACCP (Ανάλυση Κινδύνου και Σημεία Κρίσης Ελέγχου) και των πρακτικών καλής παραγωγής (GMPs) για την αποτροπή της μόλυνσης. Επίσης, η εκπαίδευση των παραγωγών, των εμπόρων και των καταναλωτών είναι σημαντική για την ευαισθητοποίηση σχετικά με τους κινδύνους και τις πρακτικές που πρέπει να ακολουθούνται.

Ορισμός παράσιτα

Ως παράσιτα ορίζονται οι οργανισμοί που ζουν στην εξωτερική επιφάνεια ή εντός ενός άλλου οργανισμού, ο οποίος ονομάζεται ξενιστής. Το παράσιτο είναι ένα παθογόνο, του οποίου η επιβίωση εξαρτάται από τον ξενιστή και ταυτόχρονα προκαλεί βλάβη σε αυτόν. Εξελικτικά, προήλθαν από ελευθέρως διαβιούντες οργανισμούς που προσάρμοσαν τις λειτουργίες τους ώστε να είναι ικανοί να επιβιώσουν και να εξελιχθούν στους ξενιστές τους. Ως «παράσιτα» χαρακτηρίζονται οι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί (πρωτόζωα) ή οι πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί (μετάζωα), που μολύνουν με τρόπο άμεσο ή έμμεσο τον άνθρωπο ή τα ζώα. Ο ξενιστής διακρίνεται σε ενδιάμεσο, ο οποίος «φιλοξενεί» τα προνυμφικά στάδια του παράσιτου και σε τελικό

ξενιστή, ο οποίος φιλοξενεί το ενήλικο παράσιτο.

Μορφολογικά είναι όμοια με τους προγόνους τους, αλλά οι λειτουργίες τους έχουν διαφοροποιηθεί και προσαρμοστεί καλύτερα στην παρασιτική ζωή, με αποτέλεσμα πολλά από αυτά να μη παράγουν βασικά στοιχεία, όπως βιταμίνες, ένζυμα αλλά και άλλα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά αναγκαία για την επιβίωσή τους, καθώς τα προσλαμβάνουν από τους ξενιστές τους.

Τα παράσιτα χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι για να φτάσουν στη φάση της ενηλικίωσής τους, πρέπει να προηγηθούν κάποια στάδια ανάπτυξης, από το γονιμοποιημένο ωάριο ως το ώριμο παράσιτο το οποίο έχει τη δυνατότητα να παράγει αναπαραγωγικά στοιχεία (όπως αυγά και προνύμφες). Τα στάδια αυτά συνολικά αποτελούν το βιολογικό κύκλο του παράσιτου. Ο βιολογικός κύκλος περιλαμβάνει συνήθως δύο φάσεις: τον έμμεσο βιολογικό κύκλο, όπου το παράσιτο απαιτεί έναν ή παραπάνω ενδιάμεσους ξενιστές για την ανάπτυξή του και τον άμεσο βιολογικό κύκλο, όπου το παράσιτο χρειάζεται έναν μόνο ξενιστή.

Τροφιμογενή και υδατογενή παράσιτα ιατρικής σημασίας

Πολλά παράσιτα χρησιμοποιούν το περιβάλλον ως μέσο μετάδοσης και ορισμένα από αυτά τα παράσιτα έχουν ακόμη και στάδια ζωής που είναι ανθεκτικά στο περιβάλλον, όπως τα σπόρια, τα ωάρια, οι προνύμφες, οι κύστες και οι ωοκύστες. Η μετάδοση της ασθένειας γίνεται είτε μέσω άμεσης επαφής με μολυσμένους ξενιστές είτε συνήθως μέσω μολυσμένου με κόπρανα υλικού. Οι τροφιμογενείς και υδατογενείς ασθένειες μεταδίδονται μέσω του μολυσμένου νερού και των τροφίμων. Αν και η τροφή και το νερό είναι δύο από τις σημαντικότερες ανάγκες του οργανισμού, μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως σημεία εισόδου για πολλούς ιούς. Το μολυσμένο νερό αποτελεί σημαντική αιτία μόλυνσης του ανθρώπου είτε λόγω κατανάλωσης, είτε λόγω επαφής, είτε λόγω χρήσης στην παρασκευή τροφίμων. Η μόλυνση του πόσιμου νερού μπορεί να αποδοθεί σε διάφορα προβλήματα, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης ανεπαρκώς επεξεργασμένων πηγών νερού και περιστασιακά αποτυχημένων διαδικασιών απολύμανσης στις πρωτογενείς παροχές νερού. Η επαφή με μολυσμένο νερό συνδέεται κυρίως με δραστηριότητες ψυχαγωγίας σε γλυκά ή θαλάσσια ύδατα. Επιπλέον, το μολυσμένο νερό μπορεί να εισέλθει στην τροφική αλυσίδα εάν χρησιμοποιείται για άρδευση ή κατά την παρασκευή τροφίμων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη βιομηχανία τροφίμων λόγω της μεγάλης κλίμακας παραγωγής και διανομής. Οι οξείες λοιμώξεις των χειριστών τροφίμων και η κακή υγιεινή έχουν συνδεθεί με αρκετά τροφιμογενή κρούσματα. Στη συνέχεια, η βιομηχανία τροφίμων εφάρμοσε κατευθυντήριες γραμμές και κανονισμούς για τον έλεγχο της εξάπλωσης των υδατογενών και τροφιμογενών ασθενειών, γνωστές ως ανάλυση

κινδύνου και κρίσιμα σημεία ελέγχου. Παρά το γεγονός ότι οι διαδικασίες βέλτιστης πρακτικής έχουν συμβάλει στη μείωση της εμφάνισης υδατογενών και τροφιμογενών ασθενειών, ο κίνδυνος εξακολουθεί να υφίσταται με αρκετά σποραδικά κρούσματα και επιδημίες σε όλο τον κόσμο. (M Bouzid, 2014)

Ποια τρόφιμα μπορούν να μεταφέρουν παράσιτα;

Τα παράσιτα που απασχολούν τους επαγγελματίες της ασφάλειας των τροφίμων περιλαμβάνουν διάφορα σκουλήκια, που κυμαίνονται από μερικά εκατοστά έως αρκετά μέτρα σε μήκος, και πρωτόζωα, μονοκύτταρους οργανισμούς (Nichols R and Smith H. 2002; Orlandi PA et al., 2002) (Πίνακας 1). Πολλές παρασιτικές λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές, άλλες προκαλούν οξείες βραχύχρονες επιδράσεις και άλλες μπορεί να παραμείνουν στον οργανισμό προκαλώντας χρόνιες επιδράσεις (Motarjemi Y. 2002).

Table 1. Parasites found in different foods.

Foods	Protozoa	Nematodes	Tapeworms	Flukes
Beef			<i>Taenia saginata</i>	
Pork	<i>Toxoplasma</i>	<i>Trichinella</i>	<i>Taenia solium</i> , <i>Taenia asiatica</i>	
Other meat	<i>Toxoplasma</i> , <i>Cryptosporidium</i> (lamb, mutton)	<i>Trichinella</i> (cougar, walrus, bear, horse, wild boar) <i>Gnathostoma</i> (frogs, snakes)		<i>Paragonimus</i> (wild boar, guinea pig)
Milk	<i>Cryptosporidium</i>			
Fish		<i>Anisakis</i> , <i>Gnathostoma</i>	<i>Diphyllobothrium</i>	<i>Clonorchis</i>
Crabs, shrimp		<i>Gnathostoma</i>		<i>Paragonimus</i>
Clams, mussels, oysters	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Toxoplasma</i>			
Snails, slugs		<i>Angiostrongylus</i>		
Squid		<i>Anisakis</i>		
Fruits, vegetables (raw)	<i>Cyclospora</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i>	<i>Angiostrongylus</i> , <i>Ascaris</i>	<i>Taenia solium</i> , <i>Echinococcus</i>	<i>Fasciola</i> , <i>Fasciolopsis</i>
Water	<i>Cyclospora</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> , <i>Toxoplasma</i>	<i>Ascaris</i> , <i>Gnathostoma?</i>	<i>Echinococcus</i>	<i>Fasciola</i> , <i>Fasciolopsis</i>

Πρωτόζωα

Τα πρωτόζωα μπορεί να υπάρχουν σε πηγές γλυκού νερού που έχουν μολυνθεί με ανθρώπινα ή ζωικά περιττώματα. Τα φρούτα και τα λαχανικά που καλλιεργούνται ή πλένονται με τέτοιο μολυσμένο νερό μπορεί να έχουν παράσιτα στην επιφάνειά τους και να αποτελούν πηγές μόλυνσης. Το *Toxoplasma* είναι μερικές φορές παρόν στο ωμό κρέας, ιδίως στο χοιρινό, και απαιτείται σχολαστικό μαγείρεμα για την καταστροφή του. Ορισμένα πρωτόζωα είναι πολύ συγκεκριμένα ως προς το είδος τους και μπορούν να επιβιώσουν μόνο σε ένα είδος ζώου, όμως άλλα, συμπεριλαμβανομένων πολλών παθογόνων για τον άνθρωπο, μπορούν να ζουν στον άνθρωπο και σε άλλα ζώα και τα ζώα αυτά μπορεί να λειτουργούν ως αποθήκες που μεταδίδουν συνεχώς παράσιτα στο περιβάλλον. Τα πρωτόζωα παράσιτα έχουν ένα ανθεκτικό στάδιο ηρεμίας (κύστη ή ωοκύστη) το οποίο μπορεί να αντέξει σε ορισμένα αποξηραντικά και απολυμαντικά. (*M. Ellin Doyle, 2003*)

Τροφιμογενή παρασιτικά σκουλήκια

Κεστώδεις (ταινίες): Το κρέας και τα ψάρια μπορεί να περιέχουν προνύμφες ταινιοσκώληκες που μπορούν να εξελιχθούν σε ενήλικες στο ανθρώπινο έντερο. Οι χοιρινές και οι μοσχαρίσιες ταινίες είναι οι πιο γνωστές (*Taenia solium* και *T. saginata*, αντίστοιχα), αλλά υπάρχουν και άλλα είδη με προνυμφικά στάδια στους μύες των ψαριών. Τα αυγά του ταινιοσκώληκα μπορεί να υπάρχουν σε φρούτα ή λαχανικά που έχουν γονιμοποιηθεί με ανθρώπινα απόβλητα ή πλυθεί με μολυσμένο νερό. Εάν ο άνθρωπος καταναλώσει τα αυγά του *T. solium*, οι προνύμφες που εκκολάπτονται από τα αυγά απομακρύνονται από το έντερο και ταξιδεύουν στους μύες, τον εγκέφαλο και άλλα μέρη του σώματος όπου εγκλωβίζονται και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα.

Οι νηματώδεις (στρογγυλά σκουλήκια) περιλαμβάνουν τα ακόλουθα ανθρώπινα παράσιτα: *Anisakis*, *Angiostrongylus* και *Gnathostoma*. Ορισμένοι νηματώδεις, όπως το *Ascaris*, έχουν απλό κύκλο ζωής που δεν απαιτεί ενδιάμεσο ξενιστή, αλλά μπορεί να μεταδοθούν από τον έναν άνθρωπο στον άλλο με μολυσμένο με κόπρανα νερό ή λαχανικά. Άλλοι, συμπεριλαμβανομένων των *Trichinella*, *Gnathostoma* και *Anisakis*, υπάρχουν ως κύστες στους μύες του κρέατος ή των ψαριών και μπορεί (*Trichinella*) ή μπορεί και όχι (*Anisakis* και *Gnathostoma*) να εξελιχθούν σε ενήλικα άτομα στον άνθρωπο που καταναλώνει μολυσμένο κρέας. Το *Angiostrongylus* χρησιμοποιεί δύο ενδιάμεσους ξενιστές και μπορεί να υπάρχει σε σαλιγκάρια και σε φυλλώδη λαχανικά.

Οι τρηματώδεις ("flatworms" ή "flukes") έχουν συνήθως δύο ή περισσότερους ενδιάμεσους

ξενιστές. Ορισμένοι μπορεί να υπάρχουν σε υδρόβια λαχανικά ή τρόφιμα που πλένονται σε μολυσμένο νερό (*Fasciola* και *Fasciolopsis*), ενώ άλλοι βρίσκονται ενστικτωδώς σε ψάρια (*Clonorchis*) ή καβούρια και αγριογούρουνα (*Paragonimus*). (M. Ellin Doyle, 2003)

Πόσο μεγάλο πρόβλημα αποτελούν τα παράσιτα;

Σε όλο τον κόσμο, τα παράσιτα μολύνουν εκατομμύρια ανθρώπους. Σε ορισμένες υποανάπτυκτες περιοχές, αποτελούν κύρια αιτία παιδικής διάρροιας και καθυστέρησης της ανάπτυξης και προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία και τη γεωργία (Fan PC. 1997; Guerrant RL et al., 2002; Roberts T et al., 1994).

Τα παράσιτα γίνονται όλο και πιο ανησυχητικά για τους ακόλουθους λόγους:

- Οι αυξανόμενες εισαγωγές φρούτων, λαχανικών και εθνοτικών τροφίμων, ορισμένα από τα οποία προέρχονται από χώρες χωρίς σύγχρονες υγειονομικές εγκαταστάσεις και συστήματα ελέγχου, ενδέχεται να εισάγουν παράσιτα.
- Οι μετανάστες από υποανάπτυκτες χώρες μπορεί να έχουν μολυνθεί με παράσιτα που θα μπορούσαν να μεταδοθούν σε άλλους, ιδίως κατά την προετοιμασία των τροφίμων.
- Η δημοτικότητα των ωμών ή ελαφρώς μαγειρεμένων τροφίμων, όπως το σούσι και τα ωμά χοιρινά λουκάνικα, μπορεί να αυξήσει την έκθεση στα παράσιτα.
- Καθώς ο πληθυσμός ηλικιώνεται και όλο και περισσότεροι άνθρωποι έχουν ανεπαρκές ανοσοποιητικό σύστημα, οι παρασιτικές λοιμώξεις μπορεί να έχουν σοβαρότερες συνέπειες, όπως αποδείχθηκε στις επιδημίες *Cryptosporidium* (Goldstein ST et al., 1996; Hoxie NJ et al., 1997).
- Αν και οι παρασιτικές λοιμώξεις μπορεί να μην είναι πολύ συχνές στις ΗΠΑ, ορισμένα παράσιτα μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές χρόνιες επιπτώσεις, όπως νευρολογικά προβλήματα που προκαλούνται από το χοιρινό ταινιοσκώληκα (νευροκυστικέρκωση) και από το *Toxoplasma*, και καρκίνο του ήπατος που σχετίζεται με το *Clonorchis* (Hughes AJ and Biggs BA. 2002; Koláčková L. 2001; Watanapa P and Watanapa WB. 2002).
- Ένα ενδιαφέρον ζήτημα που εξετάζεται από ορισμένους παρασιτολόγους είναι η πιθανή εξάπλωση παρασιτικών ασθενειών καθώς προχωρά η υπερθέρμανση του πλανήτη. Ορισμένες ασθένειες περιορίζονται επί του παρόντος σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές επειδή οι κύστες ή οι ενδιάμεσοι ξενιστές δεν είναι ανθεκτικοί στο κρύο. Εάν όμως οι

θερμοκρασίες των λιμνών θερμανθούν και οι θερμοκρασίες του χειμώνα μετριαστούν, ορισμένες ασθένειες μπορεί να εισχωρήσουν σε εύκρατες περιοχές (Ando K. 1994).

Πώς μπορούν να ελεγχθούν τα παράσιτα;

Ορισμένες βασικές στρατηγικές, όπως η υγιεινή και το σωστό μαγείρεμα των τροφίμων, είναι χρήσιμες για την καταπολέμηση όλων των παρασίτων. Άλλες προσεγγίσεις μπορεί να είναι χρήσιμες για ορισμένα παράσιτα, αλλά όχι για άλλα. Παρακάτω παρατίθεται μια σύντομη περίληψη των μεθόδων που έχουν διερευνηθεί. (M. Ellin Doyle, 2003)

Καθαριότητα και υγιεινή

- Η ορθή διαχείριση των ανθρώπινων και ζωικών αποβλήτων για την πρόληψη της μόλυνσης των τροφίμων και των πηγών πόσιμου νερού αποτελεί μια εξαιρετική και βασική στρατηγική για την πρόληψη πολλών παρασιτικών λοιμώξεων που μεταδίδονται με την κοπρανοστοματική οδό. Ωστόσο, σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες τα απόβλητα αυτά χρησιμεύουν ως λίπασμα για τις καλλιέργειες. Η λιπασματοποίηση αυτού του υλικού θα μπορούσε να σκοτώσει τα αυγά των παρασίτων.
- Ο έλεγχος των μυγών, των κατσαρίδων και άλλων εντόμων μπορεί να αποτρέψει τη διασπορά των μολυσματικών σταδίων των παρασίτων στα τρόφιμα.
- Το σχολαστικό πλύσιμο των ωμών λαχανικών και φρούτων μπορεί να απομακρύνει τις κύστες, τις ωοκύστες και τα αυγά των παρασίτων, αλλά είναι δύσκολο να καθαριστούν επαρκώς ορισμένα φυλλώδη λαχανικά και μούρα.
- Το συχνό πλύσιμο των χεριών, η χρήση καθαρών σκευών και τα μέτρα για την πρόληψη της διασταυρούμενης μόλυνσης κατά την επεξεργασία των τροφίμων είναι επίσης σημαντικά.

(M. Ellin Doyle, 2003)

Κτηνοτροφία και επιθεώρηση

- Οι κτηνοτροφικές πρακτικές που περιορίζουν την έκθεση των χοίρων σε μολυσμένες

ζωοτροφές και περιττώματα, έχουν επιτύχει στις ανεπτυγμένες χώρες να μειώσουν δραστικά τις ανθρώπινες μολύνσεις από *Trichinella* και χοιρινό ταινιοσκώληκα.

- Ο έλεγχος των τροφτικών είναι επίσης σημαντικός για να αποφευχθεί η κατανάλωση τροφτικών που μεταφέρουν παράσιτα από τους χοίρους.
- Τα μολυσμένα ζώα μπορούν να υποβληθούν σε θεραπεία με φάρμακα για την εξόντωση των παρασίτων, και αναπτύσσονται εμβόλια για την πρόληψη των λοιμώξεων από ορισμένα παράσιτα.
- Τα συστήματα επιθεώρησης μπορούν να ανιχνεύσουν παράσιτα στο χοιρινό, το βόειο κρέας και τα ψάρια. Τα συστήματα αυτά διασφαλίζουν ότι σχεδόν όλο το κρέας που φτάνει στους καταναλωτές στις ΗΠΑ είναι απαλλαγμένο από παράσιτα.

(M. Ellin Doyle, 2003)

Μαρινάρισμα, πάστωμα, κάπνισμα, ζύμωση

- Οι διαδικασίες θερμού καπνίσματος σκοτώνουν το *Anisakis*, αλλά αυτά τα παράσιτα επιβιώνουν από το ψυχρό κάπνισμα.
- Το μαρινάρισμα ρέγγας σε 2,6% οξικό οξύ και 8-9% αλάτι σκοτώνει το *Anisakis* μετά από 6 εβδομάδες, αλλά απαιτούνται 12 εβδομάδες εάν η συγκέντρωση του αλατιού είναι 5-6%.
- Οι παραδοσιακές μεξικάνικες μέθοδοι παστώματος χοιρινού κρέατος με αλάτι σκοτώνουν τις προνύμφες του ταινιοσκώληκα (*cysticerci*).
- Η ζύμωση του κρέατος για την παραγωγή ξηρών λουκάνικων και ζαμπόν αδρανοποιεί τόσο τα πρωτόζωα όσο και τις προνύμφες παρασιτικών σκουληκιών. Το χαμηλό pH και η χαμηλή δραστηριότητα του νερού συνδυάζονται για να σκοτώσουν τα παράσιτα, έτσι ώστε τα λιγότερο όξινα προϊόντα να απαιτούν $a_w < 0,9$ για να είναι ασφαλή.

(M. Ellin Doyle, 2003)

Μαγείρεμα και θερμική επεξεργασία

Όλα τα μολυσματικά στάδια των παρασίτων καταστρέφονται με το κατάλληλο μαγείρεμα των τροφίμων και το βράσιμο του νερού. Ωστόσο, το μαγείρεμα με μικροκύματα δεν σκοτώνει αξιόπιστα όλα τα παράσιτα στο κρέας και τα ψάρια, επειδή η θέρμανση είναι ανομοιόμορφη και τα

ψυχρότερα σημεία μπορεί να επιτρέψουν την επιβίωση. Συνιστάται στους καταναλωτές να μαγειρεύουν το χοιρινό κρέας και οποιοδήποτε άγριο θήραμα που μπορεί να είναι μολυσμένο με τριχίνες σε εσωτερική θερμοκρασία 160°F (71°C). Το μαγείρεμα των ψαριών για 10 λεπτά στους 60°C ή 7 λεπτά στους 70°C θα σκοτώσει το *Anisakis* (Audicana MT et al., 2002; Wharton DA and Aalders O. 2002).

Κατάψυξη

Για τα τρόφιμα που πρόκειται να καταναλωθούν ωμά, όπως τα ψάρια και ορισμένα κρέατα, η κατάψυξη για αρκετές ημέρες μπορεί να αδρανοποιήσει ή να σκοτώσει ορισμένα παράσιτα.

- Τα ψάρια πρέπει να καταψύχονται στους -30°C για ≥ 15 ώρες σε επαγγελματικό καταψύκτη ή στους -20°C για ≥ 7 ημέρες σε οικιακό καταψύκτη για να θανατωθεί το *Anisakis* (McClelland G. 2002). Ορισμένα άλλα παρασιτικά σκουλήκια απαιτούν μεγαλύτερες ή μικρότερες περιόδους σε θερμοκρασίες κατάψυξης.
- Η κατάψυξη του κρέατος στους -17°C (5°F) για 20 ημέρες, στους -23,3°C (-10°F) για 10 ημέρες ή στους -29°C (-20°F) για 6 ημέρες καταστρέφει τις τριχίνες στο χοιρινό κρέας (Centers for Disease Control and Prevention. 2003; Lund BM et al., 2000), αλλά αυτό μπορεί να μην είναι επαρκές για τις τριχίνες στα άγρια θηράματα. Έχουν βρεθεί μολυσματικές τριχίνες σε κρέας πολικής αρκούδας και αρκούδας grizzly κατεψυγμένο για 24 μήνες (Centers for Disease Control and Prevention. 2003; Hill M. 2003).

Διήθηση και χλωρίωση και άλλα απολυμαντικά

- Τα συστήματα διήθησης μπορούν να απομακρύνουν τις κύστες και τις ωοκύστες πρωτοζώων από το νερό. Ωστόσο, διάφορα κρούσματα κρυπτοσποριδίασης που σχετίζονται με επιφανειακό νερό που είχε φιλτραριστεί δείχνουν ότι τα συστήματα αυτά δεν είναι πάντα αποτελεσματικά.
- Η χλωρίωση εξαλείφει τα βακτήρια και ορισμένα παράσιτα από το νερό, αλλά οι κύστες και οι ωοκύστες είναι ανθεκτικές στο χλώριο.
- Η εμφάνιση λαχανικών σε διάλυμα χλωρίνης 1,5%, ξύδι, διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου (24 mg/L) ή κορεσμένο μαγειρικό αλάτι κατέστρεψε τις μολυσματικές προνύμφες

ορισμένων νηματωδών και τρηματοδών παρασίτων. Ωστόσο, βιώσιμοι τρηματώδεις εντοπίστηκαν σε ψάρια που αποθηκεύτηκαν για μια εβδομάδα σε αλάτι (3 g αλάτι/10 g ψάρι) στους 26°C.

- Ένα 10% διάλυμα υδροξειδίου του αμμωνίου σκότωσε το 94% των αυγών *Ascaris* μετά από 3 ώρες, ενώ άλλα απολυμαντικά ήταν λιγότερο αποτελεσματικά.

(M. Ellin Doyle, 2003)

Άλλες φυσικές διεργασίες

- Η ακτινοβόληση μπορεί να καταστρέψει τα παράσιτα σε ορισμένα ωμά τρόφιμα. Οι χαμηλότερες δόσεις ακτινοβολίας (0,5-0,7 kGy) καταστρέφουν τις προνύμφες και αναστέλλουν τη μολυσματικότητα, αλλά απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις (6-7 kGy) για να σκοτωθούν όλες οι τριχίνες στο κρέας. Έχουν αναφερθεί δόσεις ακτινοβολίας 0,1-0,15 kGy για τη θανάτωση των κύστεων τρηματοδών στα ψάρια. Ωστόσο, δόσεις 5 kGy μπορεί να είναι απαραίτητες για την πλήρη αδρανοποίηση των ωοκύστεων των πρωτοζώων (Yu JR and Park WY. 2003).
- Έχει αναφερθεί ότι η υψηλή υδροστατική πίεση είναι μια δυνητικά χρήσιμη μη θερμική μέθοδος για τη θανάτωση του *Anisakis*.
- Το υπεριώδες φως μπορεί να απολυμάνει το νερό που περιέχει κύστες *Giardia*.
- Το όζον σκοτώνει τα πρωτόζωα παράσιτα στο νερό.
- Η επεξεργασία με υπερήχους αδρανοποιεί τις ωοκύστες του *Cryptosporidium* στο νερό.

(M. Ellin Doyle, 2003)

Στόχοι κύκλου ζωής

Μια άλλη προσέγγιση για τον έλεγχο των παρασίτων περιλαμβάνει την εξέταση των κύκλων ζωής των παρασίτων για την εξεύρεση αδύναμων κρίκων όπου οι κύκλοι μπορούν να διακοπούν. Για παράδειγμα, τα άτομα που φέρουν ενήλικους ταινιοσκώληκες μπορούν να υποβληθούν σε θεραπεία με ανθελμινθικά φάρμακα για την εξάλειψη των ενήλικων σκουληκιών που παράγουν αυγά και έτσι να μειωθεί η επίπτωση της κυστικέρκωσης.

Τα παράσιτα περνούν κάποιο χρόνο στο περιβάλλον ως κύστες ή αυγά, τα οποία όμως είναι ανθεκτικά στην αποξήρανση και σε άλλες καταπονήσεις. Οι κύστες της *Fasciola*, για παράδειγμα, μπορούν να επιβιώσουν σε τρεχούμενο νερό για 122 ημέρες και σε βοσκότοπους έως και ένα έτος, ενώ οι κύστες της *Giardia* μπορούν να επιβιώσουν για μήνες σε κρύο νερό.

Πολλά παράσιτα ζουν σε ένα ή περισσότερα ζώα κατά τα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής τους και ο έλεγχος αυτών των ζώων θα μπορούσε ενδεχομένως να μειώσει τον αριθμό των παρασίτων. Ωστόσο, είναι αδύνατο να ελεγχθούν πλήρως οι πληθυσμοί των άγριων ζώων και δεν είναι πρακτικό να προσπαθήσουμε να εξαλείψουμε ορισμένους ενδιάμεσους ξενιστές, όπως τα σαλιγκάρια και τα μικρά οστρακοειδή, από κάθε πηγή νερού. Ορισμένα παράσιτα μπορούν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους σε άλλα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των οικόσιτων και άγριων σαρκοφάγων και παμφάγων. Για παράδειγμα, οι λύκοι, οι αρκούδες και άλλα ιχθυοφάγα θηλαστικά και πτηνά μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως οριστικοί ξενιστές για τον ταινιοσκώληκα των ψαριών, *Diphyllbothrium*, και υπάρχουν αναφορές ότι οι σκύλοι (Ito A et al., 2002) και η αρκούδα (Theis JH et al., 1996) μπορούν να χρησιμεύσουν ως ενδιάμεσοι ξενιστές για τον ταινιοσκώληκα του χοιρινού κρέατος, *Taenia solium*. Οι κάστορες και άλλα άγρια και οικόσιτα ζώα μπορούν να φιλοξενήσουν πρωτόζωα μολυσματικά για τον άνθρωπο. Τα ζώα αυτά λειτουργούν ως δεξαμενές μόλυνσης και επομένως η κατάλληλη επεξεργασία των ανθρώπινων αποβλήτων μπορεί να μην εξαλείψει εντελώς την απειλή αυτών των παρασίτων. (M. Ellin Doyle, 2003)

Κύκλοι ζωής των παρασίτων

Τα παρασιτικά σκουλήκια έχουν συνήθως διακριτά προνυμφικά και ενήλικα στάδια, τα οποία συχνά ζουν σε διαφορετικά είδη ζώων. Τα ζώα που φιλοξενούν τα ώριμα ενήλικα σκουλήκια ονομάζονται οριστικοί ξενιστές. Τα ζώα που φιλοξενούν τις ανώριμες, προνυμφικές μορφές είναι ενδιάμεσοι ξενιστές. Τα παράσιτα μπορεί να υπάρχουν σε άλλα ζώα (ξενιστές μεταφοράς) αλλά να μην υφίστανται καμία ανάπτυξη ή εξέλιξη σε αυτά. Ορισμένα παράσιτα έχουν πολύπλοκο κύκλο ζωής που περιλαμβάνει πολλά ζώα-ξενιστές. Σε άλλες περιπτώσεις, ένα ζώο ή ένας άνθρωπος με κακές συνήθειες υγιεινής μπορεί να επαναμολυνθεί άμεσα. Τα περισσότερα παράσιτα έχουν ένα ανθεκτικό στάδιο ηρεμίας (αυγό ή κύστη), το οποίο μπορεί να επιβιώσει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον και μπορεί να επιβιώσει από τις απολυμαντικές θεραπείες. Τα προνυμφικά σκουλήκια, ενσωματωμένα στο κρέας, τα ψάρια ή τα οστρακοειδή, είναι μέτρια θερμοανθεκτικά και μπορεί να μην θανατωθούν από το ελαφρύ μαγείρεμα.

Τα κύτταρα των παρασιτικών πρωτόζωων διαφέρουν κάπως στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής τους. Ωστόσο, πολλά από αυτά δεν έχουν διαφορετικούς οριστικούς και ενδιάμεσους ξενιστές. (M. *Ellin Doyle*, 2003)

Άμεση επαναμόλυνση

Παράσιτο στο έντερο → αυγά ή κύστες στα κόπρανα → κατάποση αυγών/κύστεων σε μολυσμένα χέρια, νερό, φρέσκα φρούτα ή λαχανικά

Παραδείγματα: *Ascaris*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia*, *Entamoeba*

(M. *Ellin Doyle*, 2003)

Ολοκλήρωση του κύκλου ζωής σε έναν ξενιστή

Τα παράσιτα αυτά, που καταναλώνονται ως εγκυστωμένες προνύμφες σε μολυσμένο κρέας, ωριμάζουν στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα, παράγουν προνύμφες που μεταναστεύουν στους μύες και εγκυστώνονται. Οι εγκυστωμένες προνύμφες μπορούν να ωριμάσουν μόνο όταν οι μύες καταναλωθούν από άλλο ζώο ξενιστή.

Παράδειγμα: *Trichinella*

(M. *Ellin Doyle*, 2003)

Ένας ενδιάμεσος ξενιστής

Σαλιγκάρι/γυμνοσάλιαγκας ως μοναδικός ενδιάμεσος ξενιστής

Παράσιτο στο ανθρώπινο έντερο ή στους πνεύμονες → αυγά αποβάλλονται με τα κόπρανα ή τα

πτύελα → τα αυγά εκκολάπτονται σε μικρίδια (προνύμφες) στο νερό → τα μικρίδια διεισδύουν σε σαλιγκάρια και αναπτύσσονται:

(1) → οι προνύμφες βγαίνουν από τα σαλιγκάρια και εγκλωβίζονται στο νερό ή σε υδρόβια φυτά → οι άνθρωποι καταναλώνουν μολυσμένο νερό ή φυτά

Παραδείγματα: *Fasciolopsis*, *Fasciola*

(*M. Ellin Doyle, 2003*)

(2) → οι άνθρωποι καταναλώνουν ωμά ή ελαφρά μαγειρεμένα σαλιγκάρια ή γυμνοσάλιαγκες που περιέχουν προνύμφες

Παράδειγμα: *Angiostrongylus*

(*M. Ellin Doyle, 2003*)

Οστρακοειδή ως ξενιστές

Παράσιτο στο ανθρώπινο έντερο → κύστες στα κόπρανα που εναποτίθενται ή πλένονται στο νερό → κύστες που προσλαμβάνονται από μύδια, όστρακα, στρείδια κ.λπ. → οι άνθρωποι καταναλώνουν ωμά ή ελαφρά μαγειρεμένα, μολυσμένα οστρακοειδή

Παράδειγμα: *Cryptosporidium*

(*M. Ellin Doyle, 2003*)

Θηλαστικό ως μοναδικός ενδιάμεσος ξενιστής

Παράσιτο στο ανθρώπινο έντερο → αυγά ή κύστες στα κόπρανα που εναποτίθενται στο περιβάλλον → αυγά ή κύστες που καταναλώνονται από χοίρους ή βοοειδή → προνύμφες ή πρωτόζωα μεταναστεύουν στους μυς → ο άνθρωπος καταναλώνει μολυσμένο κρέας

Παραδείγματα: *Taenia* spp., *Toxoplasma*

(*M. Ellin Doyle, 2003*)

Δύο ενδιάμεσοι ξενιστές

Σαλιγκάρια, οστρακοειδή και ψάρια ως ενδιάμεσοι ξενιστές

Παράσιτο στο ανθρώπινο έντερο ή στον πνεύμονα → αυγά απελευθερώνονται στα κόπρανα ή στα πτύελα → τα αυγά εκκολάπτονται σε μινικίδια (προνύμφες) στο νερό → τα μινικίδια διεισδύουν σε σαλιγκάρια και υφίστανται ανάπτυξη → οι προνύμφες βγαίνουν από το σαλιγκάρι και διεισδύουν σε οστρακοειδή (καβούρια, γαρίδες ή καραβίδες) ή ψάρια → οι άνθρωποι καταναλώνουν ωμά ή ελαφρά μαγειρεμένα ψάρια ή οστρακοειδή

Παραδείγματα: *Clonorchis/Opisthorchis*

(*M. Ellin Doyle, 2003*)

Θηλαστικά ως ενδιάμεσοι ξενιστές

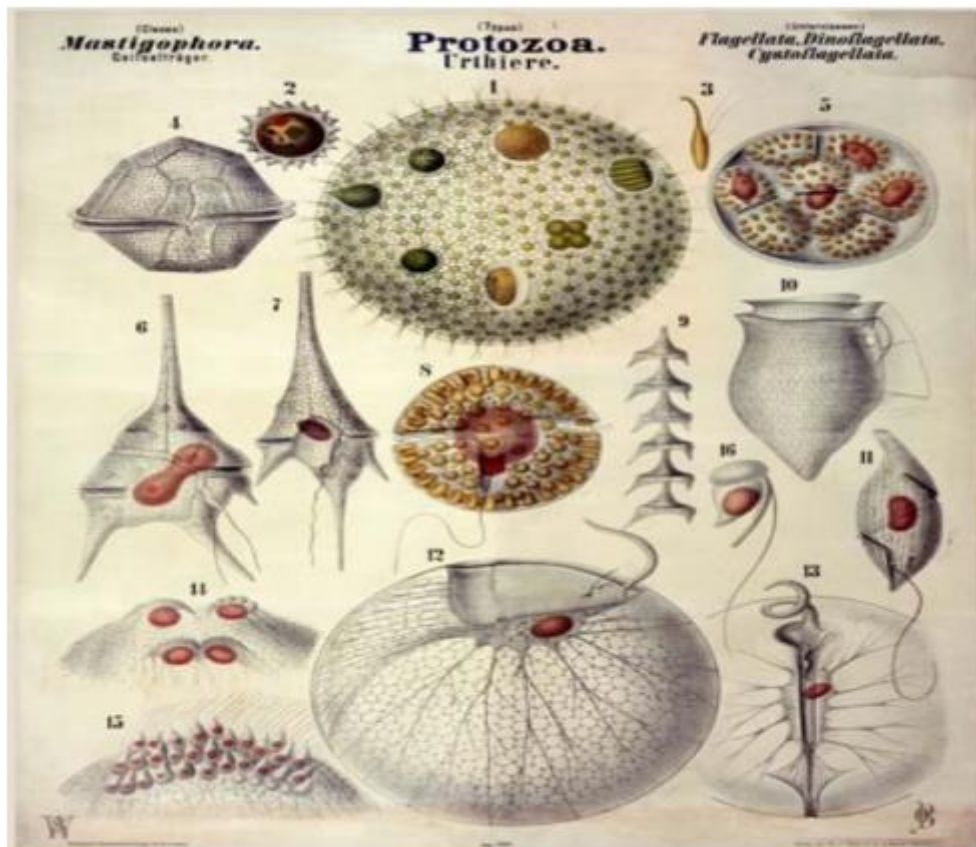
Παράσιτο στο έντερο ανθρώπου ή ζώου → κύστες στα κόπρανα που εναποτίθενται στο περιβάλλον → κύστες που καταναλώνονται από χοίρους ή άλλα ζώα → μολυσμένο κρέας (π.χ. χοιρινό) που καταναλώνεται από γάτες → ωοκύστες στα κόπρανα της γάτας → ωοκύστες που εισπνέονται ή καταπίνονται από τον άνθρωπο

Παράδειγμα: *Toxoplasma*

(*M. Ellin Doyle, 2003*)

Πρωτόζωα παράσιτα

Τα εντερικά πρωτόζωα παράσιτα στον άνθρωπο προκαλούν συνήθως ήπια έως μέτρια διάρροια, αν και τα υποσιτισμένα παιδιά, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι μπορεί να υποφέρουν από παρατεταμένα και έντονα γαστρεντερικά συμπτώματα που μπορεί να είναι απειλητικά για τη ζωή. Ορισμένα πρωτόζωα μπορούν να διαπεράσουν το εντερικό τοίχωμα και να προκαλέσουν συμπτώματα σε άλλα σημεία του σώματος. Ορισμένες λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές. Οι παχύτοιχες κύστες ή οι ωοκύστες περνούν με τα κόπρανα και μπορεί να αποβάλλονται για εβδομάδες μετά την υποχώρηση των συμπτωμάτων. Πολλά πρωτόζωα μπορούν να ζουν και να αναπαράγονται σε περισσότερα από ένα είδος ζώου, αλλά δεν αναπτύσσονται και δεν αναπαράγονται στα τρόφιμα ή στο περιβάλλον. (M. Ellen Doyle, 2003)



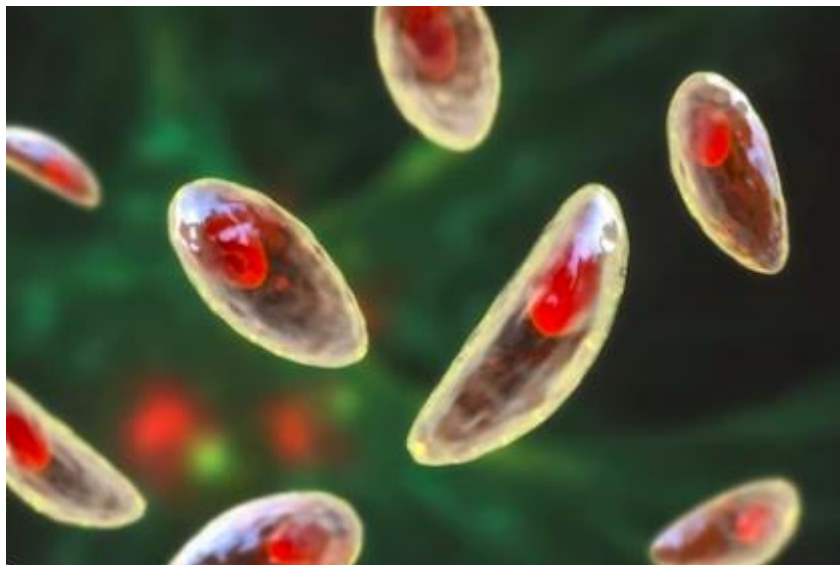
Σχηματική αναπαράσταση πρωτοζώων (Hickman, C.P. 2013)

Toxoplasma gondii

Το τοξόπλασμα (*Toxoplasma gondii*), που προκαλεί την τοξοπλάσμωση, είναι ένα πρωτόζωο που

συναντάμε σε όλο τον κόσμο. Ανήκει στην τάξη των *Coccidia* της συνομοταξίας των *Sporozoa* και αναπτύχθηκε αρχικά στις γάτες μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Οι γάτες συνιστούν τον τελικό ξενιστή όπου ολοκληρώνεται ο κύκλος ζωής του παρασίτου, ενώ ο άνθρωπος, καθώς και άλλα θηλαστικά, πτηνά και τρωκτικά αποτελούν τους ενδιάμεσους ξενιστές.

Το *Toxoplasma gondii* είναι ένα πρωτόζωο παράσιτο που μολύνει θερμόαιμους ξενιστές, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Τα αιλουροειδή είναι οι μόνοι γνωστοί οριστικοί ξενιστές τα οποία μολύνονται μέσω της σεξουαλικής αναπαραγωγής. Τα τρόφιμα που έχουν μολυνθεί με ωοκύστες (συχνά από μολυσμένα περιττώματα γάτας) ή το άψητο ή ωμό κρέας που περιέχει βιώσιμες ιστικές κύστες είναι οι δύο κύριοι τρόποι εξάπλωσης της λοίμωξης. Η υδατογενής τοξοπλάσωση, που κάποτε θεωρούνταν σπάνια, έχει γίνει πιο διαδεδομένη λόγω των πολλαπλών κρουσμάτων που συνδέονται με τα περιττώματα άγριων αιλουροειδών που μολύνουν τις πηγές νερού. (M Bouzid, 2014)



Toxoplasma gondii

Μόλυνση από *Toxoplasma gondii*

Το *Toxoplasma gondii* είναι ένα διαδεδομένο πρωτόζωο παράσιτο ικανό να μολύνει σχεδόν όλα τα θερμόαιμα ζώα (Aguirre AA *et al.*, 2019). Σύμφωνα με ένα νέο σύστημα ονοματολογίας, οι γονότυποι του *T. gondii* ταξινομούνται ως Τύπος I, Τύπος II ή Τύπος III. Άλλοι άτυποι ή εξωτικοί γονότυποι περιλαμβάνουν τους τύπους Chinese 1, Type Br I, Type Br II, Type Br III, Type IV και Type 12 (Sharif M *et al.*, 2017; Hosseini SA *et al.*, 2018). Μεταξύ των τριών κύριων οδών

μετάδοσης της τοξοπλάσμωσης, η κατανάλωση μη πλυμένων λαχανικών και φρούτων που έχουν μολυνθεί με περιττώματα γάτας είναι μια πολύ σημαντική οδός που μπορεί μερικές φορές να οδηγήσει σε τροφιμογενείς επιδημίες (Hussain MA et al., 2017).

Η ανίχνευση του *Toxoplasma gondii* σε μολυσμένα λαχανικά και φρούτα γίνεται συνήθως με ενίσχυση PCR (Caradonna T et al., 2017; Lass A et al., 2012; Marchioro AA et al., 2016; Lass A et al., 2019). Η μόλυνση λαχανικών και φρούτων με *T. gondii* παρατηρήθηκε στη Βραζιλία, την Κίνα, την Ιταλία και την Πολωνία και ο μέσος επιπολασμός της μόλυνσης εκτιμήθηκε σε 3,8% (63/1676; 95% CI: 2,9-4,7%). Οι απομονώσεις του *T. gondii* που ελήφθησαν από λαχανικά και φρούτα ανήκαν στους γονότυπους τύπου I και II. (Caradonna T et al., 2017; Lass A et al., 2012; Slany M et al., 2019)

Το *Toxoplasma gondii* μπορεί να είναι το πιο διαδεδομένο από τα ανθρώπινα πρωτόζωα παράσιτα, καθώς εκτιμάται ότι έχει μολυνθεί έως και το 40% των ατόμων στις ανεπτυγμένες χώρες και έως και το 80% των ατόμων στις υποανάπτυκτες περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Hill D and Dubey JP. 2002). Σε μέρη όπως η Γαλλία, όπου συνηθίζεται η κατανάλωση κάποιου ωμού ή ελαφρώς μαγειρεμένου κρέατος, υπάρχει μεγαλύτερη συχνότητα μόλυνσης. Μια έρευνα διαπίστωσε ότι το 84% των εγκύων γυναικών στο Παρίσι είχαν εκτεθεί στο *T. gondii* πριν μείνουν έγκυες σε σύγκριση με το 32% των εγκύων γυναικών στη Νέα Υόρκη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές, αλλά οι συνέπειες μπορεί να είναι καταστροφικές για τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα και για τα αγέννητα παιδιά των γυναικών που μολύνονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Smith JL. 1997). Ενώ μια έγκυος γυναίκα σπάνια αντιλαμβάνεται ότι έχει μολυνθεί, το *Toxoplasma* μπορεί να διασχίσει τον πλακούντα και να μολύνει το έμβρυο. Η πιο συνηθισμένη επίπτωση μιας τέτοιας λοίμωξης στα παιδιά είναι η μειωμένη όραση ή η τύφλωση μετά τη γέννηση, οι πιο σοβαρές επιπτώσεις περιλαμβάνουν υδροκέφαλο, σπασμούς και εναποθέσεις ασβεστίου στον εγκέφαλο. Η τοξοπλάσμωση είναι υπεύθυνη για το θάνατο του 10-30% των ασθενών με AIDS στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες και προκαλεί εγκεφαλίτιδα σε πολλούς ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (Hill D and Dubey JP. 2002). Οι ανοσοκατασταλμένοι ενήλικες μπορεί επίσης να εμφανίσουν συμπτώματα αμφιβληστροειδίτιδας και διογκωμένων λεμφαδένων μετά από έκθεση σε μολυσμένο κρέας ή νερό (Bowie WR et al., 1997; Choi WY et al., 1997).

Το *T. gondii* μπορεί να μολύνει σχεδόν όλα τα θερμόαιμα ζώα, αλλά μόνο οι γάτες (άγριες και κατοικίδιες) αποτελούν τον οριστικό ξενιστή και μπορούν να αποβάλουν έως και 800 εκατομμύρια μολυσματικές ωκύστες στα κόπρανά τους (Dubey JP et al., 2002). Μια πρόσφατη έρευνα σε γάτες

σε κλινικές σπειρώσεων στο Οχάιο αποκάλυψε ότι το 48% όλων των γατών ήταν μολυσμένες με *T. gondii*, με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης σε γάτες εξωτερικού χώρου (Dubey JP et al., 2002). Αυτές οι ωοκύστες μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον και μπορούν να μεταδοθούν με τον άνεμο ή με διάφορα έντομα και γαιοσκώληκες και να μολύνουν τρόφιμα που προσλαμβάνονται από ανθρώπους και άλλα ζώα. Οι κύστες *Toxoplasma* που προφανώς βρέθηκαν σε μια δεξαμενή στη Βρετανική Κολομβία μετά από έντονες βροχοπτώσεις προκάλεσαν τη μεγαλύτερη αναφερόμενη επιδημία τοξοπλάσμωσης που μεταδόθηκε με το νερό το 1994-1995 (Bowie WR et al., 1997). Τουλάχιστον 100 άτομα παρουσίασαν οξεία συμπτώματα και είκοσι από αυτά υπέστησαν αμφιβληστροειδίτιδα διαφορετικού βαθμού σοβαρότητας (Burnett AJ et al., 1998). Υπολογίζεται ότι αρκετές χιλιάδες άνθρωποι στην πόλη της Βικτώριας μολύνθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της επιδημίας, αλλά οι περισσότεροι ήταν ασυμπτωματικοί. Οι οικόσιτες και οι άγριες γάτες και τα κούγκαρ της περιοχής βρέθηκαν θετικά για τοξοπλάσμωση. Εκείνη την εποχή, το νερό του υδραγωγείου είχε υποστεί επεξεργασία με χλωρίωση, αλλά δεν είχε φιλτραριστεί.

Στα ζώα εκτός από τις γάτες, τα κύτταρα *Toxoplasma* μεταναστεύουν από το έντερο και συσσωρεύονται στον μυϊκό ιστό. Αυτές οι μυϊκές κύστες μπορεί να παραμείνουν για όλη τη ζωή του ζώου και αποτελούν επίσης πηγή μόλυνσης, είτε πρόκειται για κύστες στους μυς ποντικών και άγριων πτηνών που μολύνουν τις γάτες του σπιτιού είτε για κύστες στο χοιρινό ή το αρνίσιο κρέας που μολύνουν τον άνθρωπο. Το χοιρινό κρέας θεωρείται το κύριο μέσο έκθεσης του ανθρώπου στο *T. gondii*. Τα ποσοστά ορολογικού επιπολασμού μεταξύ των χοίρων, ιδίως των νεαρών ζώων, φαίνεται να έχουν μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες (Lundén A et al., 2002), αλλά ορισμένες έρευνες εξακολουθούν να δείχνουν υψηλό επιπολασμό της μόλυνσης από *T. gondii* στους χοίρους αγοράς (Dubey JP et al., 2002). Ορισμένες πρόσφατες έρευνες σε κρέας από παντοπωλεία έδειξαν την παρουσία *Toxoplasma* σε μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων αρνιού από ό,τι χοιρινού κρέατος (Aspinall TV et al., 2002). Κύστες *Toxoplasma* βρίσκονται επίσης στο κρέας κουνελιών και ορισμένων άλλων οικόσιτων ζώων, αλλά σπάνια παρατηρούνται στο κρέας βοοειδών ή αλόγων. Οι κύστες στο νωπό κατσικίσιο γάλα έχουν προκαλέσει λοιμώξεις στον άνθρωπο, αλλά το βοδινό γάλα δεν φαίνεται να αποτελεί φορέα μόλυνσης.

Έρευνες σε άγρια ζώα δείχνουν ότι έως και το 80% των μαύρων αρκούδων και των ελαφιών με λευκή ουρά στις ΗΠΑ περιέχουν κύστες *T. gondii* στους μύες τους (Hill D and Dubey JP. 2002). Τα θαλάσσια θηλαστικά φιλοξενούν επίσης *Toxoplasma*, και μια πιθανή πηγή μόλυνσης στο θαλάσσιο περιβάλλον περιλαμβάνει τα οστρακοειδή που μπορούν να φιλτράρουν τις ωοκύστες από το θαλασσινό νερό. Τα ωμά, μολυσμένα στρείδια θα μπορούσαν επίσης να προκαλέσουν μολύνσεις

στον άνθρωπο (*Lindsay DS et al., 2001*).

Οι κύστες *T. gondii* στο κρέας μπορούν να παραμείνουν βιώσιμες για εβδομάδες σε θερμοκρασίες ψύξης (1-4°C), αλλά μπορούν να καταστραφούν με κατάψυξη σε θερμοκρασία <-12°C, θερμότητα >67°C και ακτινοβολία (*Lindsay DS et al., 2002*). Ωστόσο, οι ωοκύστες που εξαπλώνονται στο περιβάλλον από τις γάτες μπορεί να είναι πιο δύσκολο να ελεγχθούν, καθώς μπορούν να αποτελέσουν πηγή μόλυνσης για τους ιδιοκτήτες γατών που επιτρέπουν στις γάτες τους να περιφέρονται έξω και οι ωοκύστες μπορούν να προσκολληθούν σε μούρα και λαχανικά που τρώγονται ωμά (*Kniel KE et al., 2002*).

Cryptosporidium spp.

Το *Cryptosporidium* είναι ένα απικοσυμπλεγματοειδές παράσιτο που περιγράφηκε για πρώτη φορά από το γαστρικό επιθήλιο εργαστηριακών ποντικών από τον Tyzzer το 1907 και αργότερα ονομάστηκε *Cryptosporidium muris*. Το πρώτο είδος *Cryptosporidium* που σχετίζεται με διάρροια και θνησιμότητα περιγράφηκε από τον Slavin από γαλοπούλες το 1955. Μέχρι το 1970, τα είδη *Cryptosporidium* δεν θεωρούνταν οικονομικά ή ιατρικά σημαντικά, αλλά η κτηνιατρική σημασία του *Cryptosporidium* αναδείχθηκε από τη συσχέτιση του *Cryptosporidium parvum* με τη διάρροια των βοοειδών. Η σημασία του κρυπτοσποριδίου για τη δημόσια υγεία κατέστη σαφής μετά την περιγραφή σοβαρών και απειλητικών για τη ζωή συμπτωμάτων σε ασθενείς με AIDS. Σε μια ανασκόπηση των παγκόσμιων υδατογενών κρουσμάτων που συνέβησαν μεταξύ 2004 και 2010, οι Baldursson και Karanis διαπίστωσαν ότι το *Cryptosporidium* είναι το πιο κοινό υδατογενές παράσιτο, υπεύθυνο για περισσότερο από το 60% των κρουσμάτων. Το χαρακτηριστικό αυτό συνδέεται κυρίως με την ανθεκτική στο περιβάλλον ωοκύστη που επιβιώνει από τις περισσότερες διαδικασίες απολύμανσης του νερού. Μόνο λίγα είδη *Cryptosporidium spp.* μολύνουν τον άνθρωπο, εκ των οποίων τα *C. parvum* και *Cryptosporidium hominis* είναι τα πιο διαδεδομένα. (*M Bouzid, 2014*)



Cryptosporidium

Μόλυνση από *Cryptosporidium*

Τα *Cryptosporidium* spp. είναι ευρέως διαδεδομένα πρωτόζωα παράσιτα που μολύνουν ανθρώπους και ζώα και αποτελούν τη δεύτερη συχνότερη αιτία διάρροιας στα παιδιά μετά τον ροταϊό (Bouzid M et al., 2018). Το *Cryptosporidium* χαρακτηρίζεται από την εκτεταμένη γενετική παραλλαγή του που έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη 38 ειδών και περισσότερων από 60 γονοτύπων αυτού του παρασίτου (Feng Y et al., 2018). Τουλάχιστον 20 διαφορετικά είδη προκαλούν μέτριες ή σοβαρές λοιμώξεις στον άνθρωπο, εκ των οποίων τα *C. hominis* και *C. parvum* είναι οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες. (Khan A et al., 2018)

Η ανίχνευση ωοκύστεων *Cryptosporidium* σε δείγματα λαχανικών και φρούτων με μικροσκοπία φωτός είναι απλή, βολική και άμεση (Utaaker KS et al., 2017; Ahmed SA, Karanis P 2018), αλλά απαιτεί υψηλό επίπεδο εμπειρογνωμοσύνης για την ερμηνεία των αντικειμενοφόρων πλακών, ενώ η δοκιμασία ανοσοφθορισμού είναι συνήθως πρακτική και πιο ευαίσθητη (Ahmed SA, Karanis P 2018). Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (IMS) χρησιμοποιείται για τη συγκέντρωση των ωοκύστεων του *Cryptosporidium* για την αποτελεσματική ανίχνευση με μικροσκόπιο ή PCR (Duedu KO et al., 2014; Rzezutka A et al., 2010; Robertson LJ, Gjerde B 2001). Η ενίσχυση με PCR και η αλληλουχία συγκεκριμένων γονιδίων του *Cryptosporidium* που ανακτήθηκαν από μολυσμένα λαχανικά και φρούτα είναι η πιο ακριβής μέθοδος ταυτοποίησης των παθογόνων για τον άνθρωπο και των ζωνοσογόνων ειδών (Utaaker KS et al., 2017; Caradonna T et al., 2017; Sim S et al., 2017; Rzezutka A et al., 2010). Ωστόσο, η PCR χρησιμοποιείται συνήθως στις ανεπτυγμένες χώρες, αλλά οι περισσότερες μελέτες παρακολούθησης στις αναπτυσσόμενες χώρες περιλαμβάνουν μικροσκόπηση.

Η μόλυνση των λαχανικών και των φρούτων με *Cryptosporidium* spp. έχει καταγραφεί σε πολλές χώρες και ο μέσος επιπολασμός υπολογίζεται σε 6,0% (375/6210; 95% διάστημα εμπιστοσύνης, CI: 5,4-6,6%). Μεταξύ των ειδών *Cryptosporidium*, στα μολυσμένα δείγματα λαχανικών και φρούτων ανιχνεύθηκαν τα είδη *C. parvum*, *C. hominis* και *C. Ubiquitum* (Duedu KO et al., 2014; Caradonna T et al., 2017; Rzezutka A et al., 2010; Li J et al., 2019). Τα είδη *Cryptosporidium* είναι σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα και κύρια αίτια της ανθρώπινης κρυπτοσποριδίωσης, αποτελώντας απειλή για τη δημόσια υγεία μέσω των τροφίμων ως φορέα.

Κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν περιγραφεί πολυάριθμα κρούσματα κρυπτοσποριδίασης. Ίσως η πιο διαβόητη επιδημία εκδηλώθηκε στο Μιλγουόκι το 1993, όπου περισσότεροι από 400.000 άνθρωποι υπέστησαν γαστρεντερικά συμπτώματα και εκτιμάται ότι 69 πέθαναν. Οι θάνατοι σημειώθηκαν κυρίως μεταξύ ασθενών με AIDS ή άλλες διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος (Fox KR and Lytle DA. 1996; Hoxie NJ et al., 1997; Mac Kenzie WR et al., 1994). Οι ηλικιωμένοι είχαν επίσης αυξημένο κίνδυνο σοβαρής νόσου (Naumova EN et al., 2003). Το συνολικό οικονομικό κόστος, λόγω των ιατρικών δαπανών και των απωλειών παραγωγικότητας, εκτιμήθηκε σε 96,2 εκατομμύρια δολάρια (Corso PS et al., 2003).

Το *Cryptosporidium* μπορεί να προκαλέσει ήπια ή σοβαρά συμπτώματα, ανάλογα με τη δόση των προσλαμβανόμενων ωοκύστεων, τη μολυσματικότητα του στελέχους του *C. parvum* και την ανοσοανεπάρκεια των προσβεβλημένων ατόμων (Okhuysen PC and Chappell CL. 2002). Σε υγιείς ενήλικες εθελοντές, η μέση μολυσματική δόση προσδιορίστηκε σε 132 ωοκύστες (DuPont HL et al., 1995).

Οι τροφιμογενείς εστίες του *Cryptosporidium* έχουν συνδεθεί με ωμά προϊόντα που προφανώς έχουν μολυνθεί από μολυσμένους χειριστές τροφίμων και μη παστεριωμένο γάλα που μπορεί να έχουν έρθει σε επαφή με περιττώματα βοοειδών. Οι ωοκύστες *Cryptosporidium* μπορούν να επιβιώσουν σε επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα για αρκετές ώρες και είναι ανθεκτικές σε διάλυμα χλωρίνης 5%, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα διασταυρούμενης μόλυνσης (Deng MQ and Cliver DO. 1999).

Το νερό που περιέχει ωοκύστες μπορεί να αποτελέσει πηγή μόλυνσης όταν χρησιμοποιείται για το πλύσιμο φρέσκων φρούτων και λαχανικών και όταν χρησιμοποιείται ως συστατικό στην επεξεργασία τροφίμων. Όταν το μολυσμένο νερό χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή μπύρας και ανθρακούχου ποτού κόλα, υπήρξε απώλεια βιωσιμότητας κατά 85% εντός 24 ωρών. Αντίθετα, παρατηρήθηκε απώλεια βιωσιμότητας μόνο 35% σε χυμό πορτοκαλιού και βρεφικό γάλα που

παρασκευάστηκε με μολυσμένο νερό (Friedman DE et al., 1997).

Οι ωοκύστες μπορούν να επιβιώσουν σε γλυκό, υφάλμυρο και αλμυρό νερό στους 15 και 30°C για αρκετούς μήνες, φιλτράρονται εύκολα από το νερό και προσλαμβάνονται από μύδια, στρείδια και άλλα οστρακοειδή (Fayer R et al., 1998;Freire-Santos F et al., 2002;Gomez-Couso H et al., 2003;Graczyk TK et al., 1998;Nasser AM et al., 2003). Μέχρι στιγμής δεν έχουν αναφερθεί κρούσματα κρυπτοσποριδίασης που να σχετίζονται με οστρακοειδή, αλλά έρευνες σε οστρακοειδή από διάφορες υδάτινες μάζες, αποκαλύπτουν ότι το *Cryptosporidium* είναι συχνά παρόν (65-81% των θέσεων ή των περιόδων δειγματοληψίας κατά μήκος της ακτής του Ατλαντικού) (Fayer R et al., 2003;Fayer R et al., 2002;Gomez-Bautista M et al., 2000;Lowery CJ et al., 2001). Το μαγείρεμα θα σκοτώσει αυτά τα παράσιτα, αλλά όσοι προτιμούν τα ωμά οστρακοειδή θα πρέπει να ανησυχούν για ένα άλλο τροφικό παθογόνο.

Οι ωοκύστες του *C. parvum* έχουν επίσης ανιχνευθεί σε μύγες, οι οποίες μπορεί να χρησιμεύουν ως φορείς μεταφέροντας ωοκύστες από τα κόπρανα στα τρόφιμα (Graczyk TK et al., 2003).

Giardia

Η *Giardia* είναι ένα πρωτόζωο παράσιτο. Το είδος που αφορά τη δημόσια υγεία είναι το *Giardia duodenalis* (συνώνυμο του *Giardia intestinalis*). Η *Giardia duodenalis* θεωρείται η δεύτερη πιο συχνή αιτία επιδημιών που μεταδίδονται με το νερό παγκοσμίως (>35%). Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί οκτώ ομάδες *G. duodenalis* (Α έως Η), από τις οποίες μόνο δύο (ομάδες Α και Β) μολύνουν τον άνθρωπο. Οι κύστες *Giardia*, ενώ είναι ανθεκτικές στο περιβάλλον, είναι πιο ευαίσθητες στα ευρέως χρησιμοποιούμενα απολυμαντικά (χλώριο, ιώδιο και διοξείδιο του χλωρίου) από ό,τι το *Cryptosporidium*. (M Bouzid, 2014)



Giardia intestinalis

Μόλυνση από *Giardia duodenalis*

Το *Giardia duodenalis* (συνώνυμα: *G. intestinalis*, *G. lamblia*) είναι ένα μη διεισδυτικό πρωτόζωο παράσιτο που προσκολλάται και αποικίζει στο ανώτερο λεπτό έντερο, προκαλώντας οξεία υδαρή διάρροια σε ανθρώπους και ζώα (Einarsson E et al., 2016). Πρόκειται για ένα σημαντικό ζωονοσογόνο πρωτόζωο και την κύρια αιτία της ανθρώπινης γιαρδίασης, η οποία, ως εκ τούτου, αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία (Feng Y, Xiao L 2011). Έχουν οριστεί οκτώ γενετικά διακριτές ομάδες (Α έως Η) του *G. duodenalis*, με την εμφάνιση των ζωνοτύπων Α και Β τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Ωστόσο, τα άλλα σύνολα είναι ως επί το πλείστον ειδικά για ζωικούς ξενιστές (Feng Y, Xiao L 2011). Το παράσιτο αυτό εκτιμάται ότι προκαλεί ~28,2 εκατομμύρια περιπτώσεις διάρροιας ετησίως μέσω της κατάποσης μολυσμένων τροφίμων (Ryan U et al., 2018). Τα κρούσματα της γιαρδίασης έχουν επίσης συνδεθεί με μια ποικιλία επεξεργασμένων τροφίμων. Οι ανθρώπινες λοιμώξεις από το *G. duodenalis* συνδέονται συχνά με την κατανάλωση μολυσμένων ωμών λαχανικών και φρούτων. (Colli CM et al., 2015; Figgatt M et al., 2017; Sitotaw B et al., 2019)

Οι κύστες *Giardia duodenalis* μπορούν να ανιχνευθούν με ελαφριά μικροσκόπηση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (Tefera T et al., 2014; Shahnazi M, Jafari-Sabet M 2010; Bekele F, Shumbej T 2019), και η χρώση με τυπικό ιώδιο Lugol χρησιμοποιείται παγκοσμίως για την ανίχνευση των κύστεων *G. Duodenalis* (Duedu KO et al., 2014; Alemu G et al., 2019; Gabre RM, Shakir A 2016; Eraky MA et al., 2014; Mohamed MA et al., 2016). Ωστόσο, για την ανίχνευση των κύστεων *Giardia* σε τρόφιμα εφαρμόζεται συνήθως ανοσοφθορισμός με μεγαλύτερη ευαισθησία

(Ryan U et al., 2018). Η μέθοδος IMS εφαρμόζεται επίσης για τη συγκέντρωση των κύστεων *G. duodenalis* για περαιτέρω ανίχνευση. Η ενίσχυση με PCR και η αλληλουχία συγκεκριμένων γονιδίων του *G. duodenalis* που ανακτώνται από μολυσμένα τρόφιμα χρησιμοποιούνται επίσης συνήθως για τη συγκριτική ανίχνευση αυτού του παρασίτου. (Amorós I et al., 2010; Robertson LJ, Gjerde B 2001)

Η μόλυνση λαχανικών και φρούτων με κύστες *G. duodenalis* έχει αναφερθεί σε πολλές χώρες και ο μέσος επιπολασμός εκτιμάται σε 4,8 (276/5739; 95% CI: 4,2-5,4%). Σε μολυσμένα δείγματα λαχανικών και φρούτων ανιχνεύθηκαν γενικά οι ζωνόσοι Α και Β του *G. Duodenalis*. (Tiyo R et al., 2016; Colli CM et al., 2015; Rafael K et al., 2017)

Σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου Ασθενειών, το *Giardia lamblia (intestinalis)* είναι το πιο συχνά διαγνωσμένο εντερικό παράσιτο και προκαλεί περίπου δύο εκατομμύρια περιπτώσεις διάρροιας στις ΗΠΑ κάθε χρόνο (Centers for Disease Control. 2000). Οι κύστες *Giardia* μπορεί να απελευθερώνονται στα κόπρανα για εβδομάδες ή και μήνες και μπορεί να υπάρχουν σε συγκεντρώσεις έως και $10^7/g$ (Nichols R and Smith H. 2002).

Η τροφιμογενής γιαρδίαση μπορεί να προκύψει από τη χρήση μολυσμένου νερού για την άρδευση ή το πλύσιμο φρούτων και λαχανικών. Μια έρευνα, στις ΗΠΑ και την Κεντρική Αμερική, σε 25 δείγματα νερού που χρησιμοποιήθηκαν για την άρδευση καλλιεργειών τροφίμων, αποκάλυψε ότι το 60% περιείχε *Giardia* (Thurston-Enriquez JA et al., 2002). Κύστες *Giardia* ανιχνεύθηκαν στο 2% των σπόρων που εξετάστηκαν στη Νορβηγία. Πηγή της μόλυνσης στους σπόρους δεν ήταν το νερό που χρησιμοποιήθηκε για το φύτεμα, αλλά οι ίδιοι οι μη φυτρωμένοι σπόροι (Robertson LJ et al., 2002).

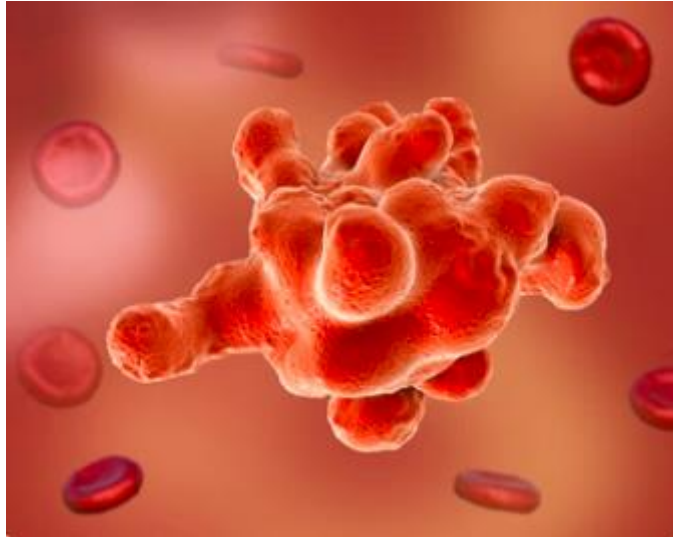
Οι χειριστές τροφίμων που έχουν μολυνθεί οι ίδιοι ή έχουν έρθει σε επαφή με τα περιττώματα μολυσμένων παιδιών έχουν εμπλακεί σε ορισμένες τροφιμογενείς επιδημίες. Μια επιδημία το 1996 εντοπίστηκε σε μολυσμένο παγωτό και η κακή προσωπική υγιεινή αναφέρθηκε ως παράγοντας που συνέβαλε (Centers for Disease Control and Prevention. 2000). Παρασκευασμένα τρόφιμα όπως σάντουιτς, σαλάτες, κονσερβοποιημένος σολομός και πάγος έχουν επίσης συσχετιστεί με τροφιμογενείς επιδημίες (Nichols GL. 2000; Rose JB and Slifko TR. 2000). Κύστες του *G. lamblia* έχουν επίσης ανιχνευθεί σε μύγες που μπορεί να αποτελέσουν φορέα μόλυνσης των τροφίμων (Graczyk TK et al., 2003).

Οι κύστες *Giardia* είναι παρούσες στα επιφανειακά ύδατα, ακόμη και σε περιοχές

απομακρυσμένες από σημαντική ανθρώπινη δραστηριότητα, και προφανώς προέρχονται από άγρια ζώα. (Η γιαρδίαση στους ταξιδιώτες με σακίδιο πλάτης αποκαλείται "beaver fever".) Οι κύστες έχουν επίσης ανιχνευθεί σε ορισμένα δείγματα υπόγειων υδάτων (Hancock CM et al., 1998), σε νερό πηγής που σχετίζεται με οξείες πεπτικές διαταραχές (Gofti-Laroche L et al., 2003) και σε συστήματα διανομής νερού σε πόλεις της Αυστραλίας (Cox P et al., 2003) και του Καναδά (Wallis PM et al., 1996). Η μόλυνση των επιφανειακών υδάτων και των πηγαδιών με *Giardia* μπορεί να προέρχεται από άγρια ζώα, οικόσιτα ζώα και ανθρώπινα λύματα. Οι κύστες *Giardia* είναι ιδιαίτερα συγκεντρωμένες σε ορισμένα περιττώματα βοοειδών (5800 κύστες/g) (Heitman TL et al., 2002) αν και ορισμένα στελέχη *Giardia* δεν μολύνουν εύκολα τον άνθρωπο (Appelbee AJ et al., 2003). Από τα 39 κρούσματα αυτής της νόσου που σχετίζονται με το πόσιμο νερό που αναφέρθηκαν στο CDC την περίοδο 1999-2000, 6 κρούσματα, που αφορούσαν 52 άτομα, εντοπίστηκαν στην παρουσία του *G. intestinalis* σε ανεπαρκώς επεξεργασμένο νερό πηγής ή ποταμού ή σε νερό που μολύνθηκε από διασταυρούμενες συνδέσεις με σωλήνες που περιείχαν λύματα ή πόσιμο νερό για ζώα (Campbell AT and Wallis P. 2002; Hayes SL et al., 2003; Lee SH et al., 2002).

Entamoeba histolytica

Μεταξύ έξι *Entamoeba* spp., μόνο το *Entamoeba histolytica* θεωρείται παθογόνος για τον άνθρωπο και είναι το παθογόνο που ευθύνεται για τη διεισδυτική "αμοιβάδωση". Με περίπου 5 εκατομμύρια μολύνσεις ετησίως, η ασθένεια είναι κυρίως διαδεδομένη στις τροπικές περιοχές και αποτελεί τη μεγαλύτερη αιτία θνησιμότητας από παρασιτικές ασθένειες παγκοσμίως. Η συντριπτική πλειονότητα των λοιμώξεων από *Entamoeba* spp. οφείλεται στο μη παθογόνο είδος *Entamoeba dispar*, το οποίο είναι μορφολογικά πανομοιότυπο με το *E. Histolytica*. (M Bouzid, 2014)



Entamoeba histolytica

Μόλυνση από *Entamoeba*

Μεταξύ των *Entamoeba* spp., το *E. histolytica* είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινης αμοιβάδωσης και παραμένει μία από τις τρεις κύριες αιτίες παρασιτικής θνησιμότητας παγκοσμίως (Cui Z *et al.*, 2019). Αν και ορισμένες από τις λοιμώξεις από *E. histolytica* είναι ασυμπτωματικές, πολλές λοιμώξεις μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρή διάχυτη νόσο (Kantor M *et al.*, 2018). Οι λοιμώξεις από *Entamoeba* spp. συνδέονται σημαντικά με την κατανάλωση μολυσμένων λαχανικών και φρούτων. (Gabre RM, Shakir A 2016; Sitotaw B *et al.*, 2019; Anuar TS *et al.*, 2012; Azim A *et al.*, 2018)

Οι κύστες *Entamoeba* spp. μπορούν να ανιχνευθούν με ελαφριά μικροσκόπηση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (Mohamed MA *et al.*, 2016; Shahnazi M, Jafari-Sabet M 2010; Bekele F, Shumbej T 2019). Η χρώση με ιώδιο Lugol χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των κύστεων *Entamoeba* spp. (Duedu KO *et al.*, 2014; Alemu G *et al.*, 2019; Gabre RM, Shakir A 2016; Tefera T *et al.*, 2014; Azim A *et al.*, 2018). Η τεχνική PCR χρησιμοποιείται επίσης συνήθως για την ανίχνευση του *Entamoeba* spp. σε τρόφιμα με βάση την ενίσχυση και την αλληλουχία συγκεκριμένων γονιδίων. (Caradonna T *et al.*, 2017; M'rad S *et al.*, 2020)

Πολλές αναφορές έχουν επιβεβαιώσει τη μόλυνση ωμών λαχανικών και φρούτων με κύστες *Entamoeba* spp. παγκοσμίως. Ο μέσος επιπολασμός της μόλυνσης από *Entamoeba* υπολογίζεται σε 3,5% (199/5647; 95% ΔΕ: 3,0-4,0%). Το *Entamoeba histolytica*, το *E. dispar* και το *E. coli* ήταν τα

πιο συχνά ανιχνευόμενα είδη μεταξύ των απομονώσεων από μολυσμένα λαχανικά και φρούτα. (Duedu KO et al., 2014; Gabre RM, Shakir A 2016; Mohamed MA et al., 2016; Shahnazi M, Jafari-Sabet M 2010)

Το *Entamoeba histolytica* αποτελεί σημαντική αιτία διάρροιας στους ανθρώπους στις τροπικές και υποτροπικές χώρες. Τα κρούσματα στις ΗΠΑ εμφανίζονται γενικά σε μετανάστες, ταξιδιώτες που επιστρέφουν από ενδημικές περιοχές και σε άτομα που ζουν σε πολιτείες κατά μήκος των συνόρων με το Μεξικό. Το στενά συγγενικό και μορφολογικά αδιάφορο είδος *E. dispar* βρίσκεται επίσης στο ανθρώπινο έντερο αλλά δεν προκαλεί διάρροια. Ορισμένα παλαιότερα δεδομένα σχετικά με τον επιπολασμό και την επιδημιολογία του *E. histolytica* μπορεί να είναι ανακριβή, επειδή οι εξετάσεις δεν ήταν ικανές να διακρίνουν τα δύο είδη μέχρι πρόσφατα. Το *E. histolytica* είναι η δεύτερη κυριότερη παρασιτική αιτία θανάτου (μετά την ελονοσία) και εκτιμάται ότι μολύνει 50.000.000 άτομα παγκοσμίως, εκ των οποίων 40.000 έως 100.000 πεθαίνουν ετησίως. Πάνω από ένα εκατομμύριο κρούσματα αμοιβίασης αναφέρθηκαν στο Μεξικό το 1996 (Stanley SL. 2003).

Πολλά άτομα που εκτίθενται στο *E. histolytica* παραμένουν ασυμπτωματικά, αλλά ακόμη και αυτά τα άτομα μπορεί να είναι πηγές μόλυνσης. Πρόσφατα δεδομένα από το Μεξικό έδειξαν ότι 340 ασυμπτωματικοί φορείς απέκκριναν κατά μέσο όρο σχεδόν 4.000 κύστες *Entamoeba/g* κοπράνων. Οι κύστες από ορισμένα από αυτά τα άτομα ήταν πιθανόν να ήταν *E. dispar*, αλλά ο μεγάλος αριθμός των παραγόμενων κύστεων υποδεικνύει σημαντική δυνατότητα μετάδοσης εάν οι συνθήκες υγιεινής είναι ανεπαρκείς. Τα αρσενικά παρήγαγαν έξι φορές περισσότερες κύστες από τα θηλυκά και οι κύστες αυτές ήταν σημαντικά μικρότερες (Garrido-Gonzalez E et al., 2002).

Μελέτες σε μια ενδημική περιοχή του Μπαγκλαντές αποκάλυψαν ότι ορισμένα παιδιά αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στο *E. histolytica*, ενώ άλλα είναι γενετικά πιο ευαίσθητα στην αμοιβάδωση (Haque R et al., 2002). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι μπορεί να είναι δυνατή η παραγωγή ενός αποτελεσματικού εμβολίου. Το στρώμα βλεννογόνου στο έντερο αναστέλλει την προσκόλληση των αμοιβάδων, αλλά αν παραβιαστεί, το *Entamoeba* μπορεί να προκαλέσει κολίτιδα και να εισβάλει σε άλλους ιστούς, ιδίως στο ήπαρ (Haque R et al., 2003; Stanley SL. 2003). Η διεισδυτική αμοιβάδωση εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε ενήλικες και αναφέρεται ότι είναι έως και δεκαπλάσια συχνή στους άνδρες (Blessmann J et al., 2002; Shamsuzzaman SM and Hashiguchi Y. 2002).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το μολυσμένο πόσιμο νερό αποτελεί σημαντικό μέσο μετάδοσης στις υποανάπτυκτες χώρες. Επιδημίες έχουν εμφανιστεί σε ανεπτυγμένες χώρες όταν

υπήρξε βλάβη στο σύστημα καθαρισμού του νερού ή διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των σωλήνων αποχέτευσης και του πόσιμου νερού (Barwick RS et al., 2002). Η τροφιμογενής μετάδοση συνδέεται συχνά με μολυσμένο χειριστή τροφίμων και συμβαίνει επίσης όταν τα προϊόντα ανανεώνονται ή οι καλλιέργειες αρδεύονται με μολυσμένο νερό. Οι μύγες, οι κατσαρίδες και άλλα έντομα μπορούν επίσης να μεταφέρουν κύστες από τα κόπρανα στα τρόφιμα (Leber AL. 2000).

Cyclospora cayetanensis

Το *Cyclospora cayetanensis* είναι ένα κοκκιδιακό παράσιτο το οποίο γρήγορα αναγνωρίστηκε ως σημαντική αιτία υδατογενών και τροφιμογενών ασθενειών. Προκαλεί μια διαρροϊκή ασθένεια στον άνθρωπο που ονομάζεται κυκλοσπορίαση. Είναι το μοναδικό είδος του γένους που μολύνει τον άνθρωπο. Ένα σημαντικό βιολογικό χαρακτηριστικό του *C. cayetanensis* είναι ότι, σε αντίθεση με το *Cryptosporidium* και το *Giardia*, οι φρέσκες ωκύστες που απεκκρίνονται είναι μη μολυσματικές και χρειάζονται αρκετές ημέρες ή εβδομάδες υπό ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες για να αναπτυχθούν και να γίνουν μολυσματικές. Αυτό το χαρακτηριστικό επηρεάζει την επιδημιολογία του *C. cayetanensis*, διότι εμποδίζει την εξάπλωση του ιού μέσω της μετάδοσης από άτομο σε άτομο και της έντονης μόλυνσης των χειριστών τροφίμων. (M Bouzid, 2014)



Cyclospora

Μόλυνση από *Cyclospora cayetanensis*

Το *Cyclospora cayetanensis* είναι ένα άλλο σημαντικό πρωτόζωο παράσιτο, που μεταδίδεται

συνήθως μέσω των τροφίμων και προκαλεί γαστρεντερική κυκλοσπορίαση στον άνθρωπο (*Gianguaspero A, Gasser RB 2019; Ortega YR, Sanchez R 2010*). Σε παγκόσμιο επίπεδο, το *C. cayentanesis* είναι ένα σημαντικό τροφιμογενές ανθρώπινο πρωτόζωο (*Gianguaspero A, Gasser RB 2019; Ortega YR, Sanchez R 2010*). Πολλές αναφορές έχουν τεκμηριώσει τα τροφιμογενή κρούσματα κυκλοσπορίασης που σχετίζονται με την κατανάλωση μολυσμένων ωμών λαχανικών ή φρούτων.

Οι ωκύστες του *Cyclospora cayetanensis* μπορούν να ανιχνευθούν απλά και άμεσα με ελαφριά μικροσκόπηση, εφόσον υπάρχει μεγάλος αριθμός ωκύστεων στα λαχανικά και τα φρούτα (*Caradonna T et al., 2017; Einarsson E et al., 2016*). Για την ανίχνυσή τους χρησιμοποιούνται επίσης συνήθως τροποποιημένη χρώση Ziehl-Neelsen και αναλύσεις ανοσοφθορισμού ή ανοσοφθορισμού (*Duedu KO et al., 2014; Alemu G et al., 2019; Tefera T et al., 2014; Tram NT et al., 2008*). Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαθέσιμες στο εμπόριο αναλύσεις ανοσοφθορισμού για το *Cyclospora*. Επιπλέον, η ενίσχυση με PCR και η αλληλουχία των γονιδίων του *C. cayetanensis* χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την ειδική ανίχνευση αυτού του οργανισμού σε μολυσμένα δείγματα τροφίμων. (*Caradonna T et al., 2017; Sim S et al., 2017; Gianguaspero A et al., 2015*)

Η μόλυνση λαχανικών και φρούτων με ωκύστες *C. cayetanensis* έχει καταγραφεί σε πολλές χώρες. Ο μέσος επιπολασμός της μόλυνσης με *C. cayetanensis* υπολογίζεται σε 3,9% (180/4628; 95% CI: 3,3-4,5%).

Μόλις πρόσφατα το *Cyclospora cayetanensis* αναγνωρίστηκε ως αιτία τροφιμογενών ασθενειών. Τη δεκαετία του 1990 εκδηλώθηκαν αρκετές μεγάλες, πολυκρατικές επιδημίες που σχετίζονται με την κατανάλωση εισαγόμενων βατόμουρων. Άλλες επιδημίες ενέπλεξαν τα χόρτα σαλάτας, τον βασιλικό ή άλλα μούρα ως φορείς μόλυνσης. Αυτές οι πρόσφατες τροφιμογενείς επιδημίες θεωρείται ότι προήλθαν από τη χρήση μολυσμένου νερού κατά την άρδευση ή την εφαρμογή φυτοφαρμάκων ή λιπασμάτων στις καλλιέργειες. Όταν οι ωκύστες αποβάλλονται για πρώτη φορά με τα κόπρανα του ξενιστή τους, είναι μη γονιμοποιημένες και δεν είναι άμεσα μολυσματικές. Ως εκ τούτου, θεωρείται ότι οι μολυσμένοι χειριστές τροφίμων δεν είναι πιθανότατα ικανοί να μεταδώσουν αυτή τη νόσο. Ωστόσο, οι περιβαλλοντικές συνθήκες που είναι απαραίτητες για την πρόκληση της σπορίωσης είναι άγνωστες και είναι πιθανό ότι η σπορίωση θα μπορούσε να συμβεί γρήγορα υπό ορισμένες συνθήκες. (*M. Ellin Doyle, 2003*)

Το *Cyclospora* ενδημεί σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η έλλειψη καθαρού νερού και εγκαταστάσεων υγιεινής διευκολύνει τη μετάδοση μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Ορισμένες

επιδημιολογικές μελέτες έχουν διαπιστώσει συσχέτιση μεταξύ της ιδιοκτησίας κατοικίδιων ζώων και της κυκλοσπορίασης. Ωστόσο, ο άνθρωπος είναι ο μόνος γνωστός ξενιστής του *C. cayetanensis*. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι άνθρωποι που ζουν σε ενδημικές περιοχές και τρώνε τοπικά τρόφιμα αναπτύσσουν ανοσία στο *Cyclospora*. Οι άνθρωποι μπορεί να προσβληθούν με ωκύστες αλλά δεν εμφανίζουν γαστρεντερικά συμπτώματα (Bern C et al., 2002). Το *Cyclospora* προκαλεί παρατεταμένη διάρροια που μπορεί να είναι εξουθενωτική ιδίως σε βρέφη και ανοσοκατεσταλμένους (Bern C et al., 1999; Fryauff DJ et al., 1999). Έχουν υπάρξει λίγες αναφορές σοβαρών επιπλοκών των λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένου του συνδρόμου Guillain-Barré (Richardson RF et al., 1998) και του συνδρόμου αντιδραστικής αρθρίτιδας (Reiter) (Connor BA et al., 2001).

Microsporidia

Τα *Microsporidia* είναι μονοκύτταρα παράσιτα που σχηματίζουν σπόρια και σχετίζονται με τους μύκητες. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 1000 είδη, που μολύνουν κυρίως ασπόνδυλα και ψάρια. Όπως και το *Cryptosporidium*, η σημασία των *Microsporidia* για τη δημόσια υγεία αναδείχθηκε από τα σοβαρά κλινικά αποτελέσματα ("εξάντληση" και διάρροια) σε ασθενείς με AIDS. Τα πιο συχνά αναφερόμενα παθογόνα για τον άνθρωπο *Microsporidia*, περιλαμβάνουν τα *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis* και *Encephalitozoon cuniculi*. Τα σπόρια *Microsporidia* είναι ανθεκτικά και μπορούν να επιβιώσουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα *Microsporidia* μεταδίδονται με την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων ή νερού, καθώς και με την εισπνοή σπορίων. Οι αναφορές κρουσμάτων που μεταδίδονται με το νερό είναι σπάνιες, παρά την ανίχνευση σπορίων *Microsporidia* από πηγές νερού. Πρόσφατα, αναφέρθηκε το πρώτο κρούσμα μικροσποριδίασης που μεταδόθηκε μέσω τροφίμων στη Σουηδία και σχετίζεται με την κατανάλωση αγγουριού. (M Bouzid, 2014)

Παρασιτικά σκουλήκια – Νηματώδεις

***Anisakis* και *Pseudoterranova* (Sealworm, Codworm)**

Η ανισακίαση αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως ανθρώπινη ασθένεια πριν από περίπου εξήντα

χρόνια, αλλά έγινε πιο γνωστή στους Αμερικανούς καταναλωτές πριν από περίπου τριανταπέντε χρόνια, όταν οι άνθρωποι παρατήρησαν κατά καιρούς, ζωντανά σκουλήκια σε ψάρια που είχαν μαγειρευτεί σε φούρνο μικροκυμάτων. Η αυξανόμενη δημοτικότητα των ιαπωνικών και άλλων εθνοτικών πιάτων που περιέχουν ωμά ψάρια προκάλεσε μεγαλύτερη ανησυχία για τα παράσιτα των ψαριών (Schuster R et al., 2003). Τα ψάρια που εντοπίζονται συχνότερα ως φορείς του *Anisakis* είναι το σκουμπρί και το ιπτάμενο καλαμάρι στην Ιαπωνία και ο γαύρος τουρσί, οι ωμές σαρδέλες, ο σολομός κρύου καπνίσματος, οι ωμές ή παστωμένες ρέγγες στη Δυτική Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Το *Pseudoterranova* μολύνει τον μπακαλιάρo προκαλώντας απώλειες 26-50 εκατομμυρίων δολαρίων ετησίως στους παραγωγούς ιχθυηρών στον Ατλαντικό Καναδά (McClelland G 2002). Άλλα ψάρια, συμπεριλαμβανομένων του μπακαλιάρου, του σκουμπριού, του σφυρίδας και της φάλαινας, μπορεί επίσης να περιέχουν αυτά τα παράσιτα (Audicana MT et al., 2002; Foti C et al., 2002; Piccolo G et al., 1999; Podolska M and Horbowy J. 2003; Szostakowska B et al., 2002). Μια έρευνα σε ψάρια μιας βελγικής αγοράς έδειξε ότι περίπου το 11% ήταν μολυσμένα (Piccolo G et al., 1999), ενώ μια έρευνα σε σολομό εκτροφής στη Νορβηγία δεν βρήκε μολυσμένα ψάρια (Lunestad BT. 2003). Ορισμένες έρευνες έδειξαν ότι το ποσοστό μόλυνσης με προνύμφες ανισακίδων ποικίλλει ανάλογα με την εποχή και αυξάνεται με το μέγεθος των ψαριών (Karl H et al., 2002). Οι θερμοκρασίες του νερού και οι πληθυσμοί φώκιας μπορεί επίσης να επηρεάζουν την αφθονία αυτών των παρασίτων (McClelland G et al., 2000).

Τα δελφίνια και οι φάλαινες είναι οι συνήθεις τελικοί ξενιστές για το *Anisakis*, ενώ οι φώκιες και τα θαλάσσια λιοντάρια είναι τελικοί ξενιστές για το *Pseudoterranova*. Τα ενήλικα σκουλήκια σε αυτά τα θαλάσσια θηλαστικά παράγουν αυγά που περνούν με τα κόπρανα, εκκολάπτονται και οι προνύμφες καταναλώνονται από τις γαρίδες. Όταν τα ψάρια ή τα καλαμάρια τρώνε τις γαρίδες, οι προνύμφες απελευθερώνονται, διαπερνούν το τοίχωμα του στομάχου και μπορεί να παραμείνουν στην κοιλιακή κοιλότητα ή να διεισδύσουν στους κοντινούς μύες. Ο κύκλος ζωής ολοκληρώνεται όταν μολυσμένα ψάρια ή καλαμάρια καταναλώνονται από θαλάσσια θηλαστικά (McClelland G 2002; Sakanari JA and McKerrow JH. 1989).

Ο άνθρωπος είναι τυχαίος ξενιστής και οι προνύμφες αυτές δεν μπορούν να ωριμάσουν στο ανθρώπινο έντερο. Αντ' αυτού τα σκουλήκια εισχωρούν στα εντερικά ή στομαχικά κύτταρα και μπορεί να περιπλανηθούν στο ήπαρ, στους πνεύμονες ή σε άλλους ιστούς, προκαλώντας γαστρικές διαταραχές και αλλεργικές αντιδράσεις. Στην πραγματικότητα, ορισμένοι άνθρωποι που εμφανίζονται να είναι αλλεργικοί στα "ψάρια" είναι στην πραγματικότητα αλλεργικοί στο *Anisakis* στο μυ των ψαριών (Audicana MT et al., 2002). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμη και αν οι προνύμφες θανατώνονται με το μαγείρεμα, αυτό δεν εξαλείφει εντελώς το ενδεχόμενο πρόκλησης

αλλεργικών αντιδράσεων σε ευαίσθητα άτομα (Audicana MT et al., 2002; Daschner A et al., 2002; Falcão H et al., 2002; Foti C et al., 2002; Kimura S et al., 1999; Magnaval JF et al., 2002; McClelland G. 2002; Pecquet C et al., 2002).



Anisakis



Pseudoterranova

Ascaris

Το *Ascaris lumbricoides* είναι ένα κοινό εντερικό παράσιτο (στρογγυλό σκουλήκι) που μολύνει περίπου το ένα τέταρτο του παγκόσμιου πληθυσμού (Han ET et al., 2003). Σε ορισμένες περιοχές

χωρίς επαρκή υγιεινή, τα μωρά μπορεί να μολυνθούν μέσα σε μήνες μετά τη γέννηση και η επακόλουθη ανάπτυξη των σκουληκιών, εμποδίζει την ανάπτυξη και συμβάλλει σε διαρροϊκές λοιμώξεις και θνησιμότητα στην πρώιμη παιδική ηλικία (*Crompton DWT and Nesheim MC. 2002; Moore SR et al., 2001*). Πολλοί μολυσμένοι ενήλικες δεν παρουσιάζουν συμπτώματα αν και είναι γνωστό ότι τα σκουλήκια αυτά ερεθίζουν την εντερική κοιλότητα και παρεμποδίζουν την απορρόφηση των λιπών και των πρωτεϊνών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το *Ascaris* προκαλεί πιο σοβαρές λοιμώξεις στο ήπαρ ή στους πνεύμονες (*Kim SR et al., 2002; Sakakibara A et al., 2002*).

Ο άνθρωπος είναι ο μόνος γνωστός ξενιστής αυτού του σκουληκιού. Τα αυγά που περνούν με τα κόπρανα μπορεί να καταποθούν από το ίδιο ή άλλο άτομο που πίνει μολυσμένο νερό, τρώει με βρώμικα χέρια ή τρώει άψητα λαχανικά που έχουν μολυνθεί με μολυσμένα ανθρώπινα απόβλητα. Μετά την κατάποση, τα αυγά εκκολάπτονται στο έντερο και τα σκουλήκια μπορεί να μεταναστεύσουν στους πνεύμονες ή στο ήπαρ πριν επιστρέψουν στο έντερο και ωριμάσουν. Έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για την ανίχνευση και την καταμέτρηση των αυγών *Ascaris* στα λαχανικά και μπορεί να είναι χρήσιμες για τον έλεγχο των φρέσκων λαχανικών για μόλυνση (*Robertson LJ and Gjerde B. 2000*).



Ascaris lumbricoides

***Trichinella spiralis* (Trichinosis)**

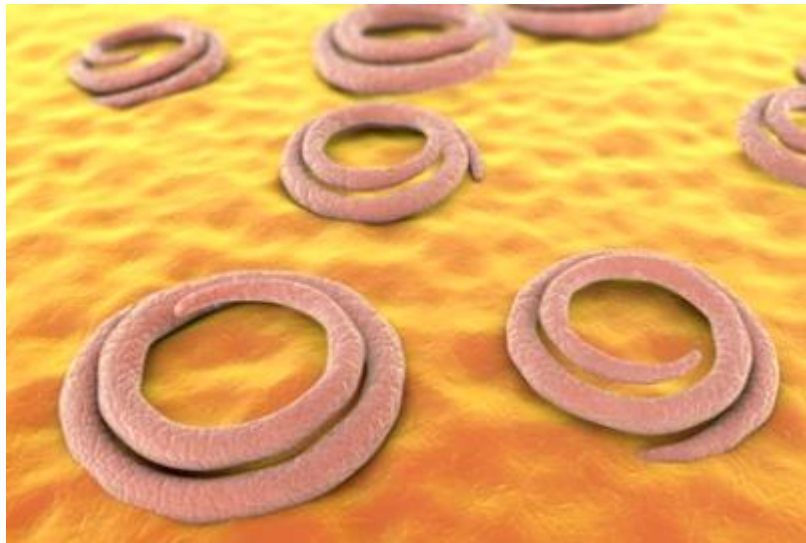
Το *T. spiralis* είναι ένα παγκοσμίως διαδεδομένο παράσιτο που εμφανίζεται σε πολλά σαρκοφάγα και παμφάγα ζώα. Οι άνθρωποι στις ΗΠΑ αποκτούν αυτόν τον νηματώδη μικροοργανισμό, τρώγοντας ενθυλακωμένες προνύμφες σε ωμό ή ελαφρά μαγειρεμένο χοιρινό κρέας. Οι

βελτιωμένες πρακτικές διατροφής των χοίρων και οι τακτικές επιθεωρήσεις στα σφαγεία έχουν μειώσει δραστικά τη συχνότητα εμφάνισης τριχινών στο ωμό χοιρινό κρέας στις ΗΠΑ. Κατά την περίοδο 1997-2001, μόνο το 17% των κρουσμάτων σχετιζόταν με εμπορικό χοιρινό κρέας και το 13% των κρουσμάτων εντοπίστηκαν σε μη εμπορικό χοιρινό κρέας (*Centers for Disease Control and Prevention. 2003*). Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό εμπορικών χοίρων, που υπολογίζεται σε 0,1% (*Lund BM et al., 2000*), εξακολουθεί να περιέχει αυτό το παράσιτο. Περιστασιακά εξακολουθούν να εκδηλώνονται μεγάλες εστίες, υπενθυμίζοντας να μαγειρεύεται καλά το ενδεχομένως μολυσμένο κρέας. Το 1990, 105 άτομα στις ΗΠΑ προσβλήθηκαν από τριχίνωση σε δύο επιδημίες που εντοπίστηκαν σε ωμά λουκάνικα από χοιρινό κρέας εμπορικών χοίρων (*Phabmixay V et al., 1991*). Εμπορικά παρασκευασμένα ωμά λουκάνικα και μολυσμένος κιμάς ήταν υπεύθυνα για 52 κρούσματα τριχίνωσης στη Γερμανία το 1998-1999 (*Centers for Disease Control. 1999*). Σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες, το ωμό κρέας αλόγου, που αποτελεί επίσης φορέα μόλυνσης (*Annelle T et al., 1986*), αποτελεί συστατικό σε παραδοσιακά τρόφιμα.

Η τριχίνωση στις ΗΠΑ είναι ασθένεια που πρέπει να δηλώνεται, τα κρούσματα μειώνονται σταθερά από τα τέλη της δεκαετίας του 1940, όταν υπήρχαν κατά μέσο όρο 400 κρούσματα εμφανών ασθενειών ανά έτος, έως το 1997-2001 με μέσο όρο 14 κρούσματα ανά έτος (*Centers for Disease Control and Prevention. 2003*). Ορισμένα πρόσφατα κρούσματα έχουν εντοπιστεί στο κρέας αγριόχοιρου, θαλάσσιου ίππου ή αρκούδας (*Greenbloom SL et al., 1997*), ενώ το κρέας άγριων θηραμάτων αναφέρθηκε ως η πιο κοινή πηγή μόλυνσης στις ΗΠΑ κατά την περίοδο 1997-2001 (*Anon. 1990;Centers for Disease Control and Prevention. 2003;Hill M. 2003;Vollbrecht A et al., 1996*). Το κρέας αρκούδας ήταν υπεύθυνο για πέντε κρούσματα που αντιστοιχούσαν σε 29 (40%) περιπτώσεις, ενώ το κρέας κούγκαρ και αγριογούρουνου συνδέθηκε με ένα κρούσμα το καθένα. Τα άγρια θηράματα αποτελούν πηγή τριχίνωσης και σε άλλες χώρες. Το 2002 αναφέρθηκαν τουλάχιστον 16 κρούσματα που σχετίζονται με κρέας θαλάσσιου ελέφαντα από τον Καναδά (*Hill M. 2003*). Τον Φεβρουάριο του 2003, μια επιδημία στην Πολωνία που αφορούσε τουλάχιστον 124 άτομα πιστεύεται ότι προκλήθηκε από μολυσμένο κρέας αγριογούρουνου, αν και μπορεί να εμπλέκονται και άλλα άγρια θηράματα (*Paul M. 2003*).

Το *Trichinella* ολοκληρώνει έναν κύκλο ζωής σε ένα ζώο ξενιστή. Μετά την κατάποση μολυσματικών προνυμφών στο κρέας, αυτές εκκολάπτονται στο έντερο, ωριμάζουν και παράγεται μια νέα γενιά μολυσματικών προνυμφών. Αυτές σκάβουν έξω από το έντερο και ταξιδεύουν σε όλο το σώμα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προνυμφών στους χοίρους εντοπίζονται στο διάφραγμα και τη γλώσσα, αλλά υπάρχουν επίσης σε διάφορους σκελετικούς μύες. Οι ενθυλακωμένες προνύμφες μπορεί να παραμείνουν ζωντανές για πολλά χρόνια, αλλά συχνά ασβεστοποιούνται και

πεθαίνουν μέσα σε 6-12 μήνες. Για να ωριμάσουν οι προνύμφες, ο μολυσμένος μύς πρέπει να καταναλωθεί από άλλο σαρκοφάγο. (M. Ellin Doyle, 2003)



Trichinella spiralis

Παρασιτικά σκουλήκια - Κεστώδεις

Taenia spp.

Οι ταινιοσκώληκες του γένους *Taenia* μπορεί να είναι τα πιο γνωστά τροφίμογενή παρασιτικά σκουλήκια, με τα ενήλικα να φτάνουν σε μήκος τα 3-5 μέτρα στο έντερο των ανθρώπινων ξενιστών. Τρία είδη είναι πρωταρχικής σημασίας για τον άνθρωπο και όλα έχουν ενδιάμεσα στάδια σε οικόσιτα ζώα: *Taenia saginata* στα βοοειδή και *Taenia solium* και *Taenia asiatica* στους χοίρους. Υπάρχουν αναφορές ότι άλλα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων των σκύλων και της αρκούδας (Ito A et al., 2002; Theis JH et al., 1996), μπορούν να χρησιμεύσουν ως ενδιάμεσοι ξενιστές για το *T. solium*, οι τάρανδοι μπορούν να φιλοξενήσουν το *T. saginata* και οι κατσίκες και οι πίθηκοι μπορούν να φιλοξενήσουν το *T. Asiatica* (Cabaret J et al., 2002).

Αν και το *Taenia* spp. είναι κοσμοπολίτικο, οι σύγχρονες εγκαταστάσεις υγιεινής και οι πρακτικές εκτροφής ζώων στις ανεπτυγμένες χώρες έχουν μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο μόλυνσης (van der logt PB et al., 1997). Ωστόσο, σε ορισμένες περιοχές του κόσμου τα παράσιτα αυτά αποτελούν σημαντικό πρόβλημα. Ειδικότερα, το *T. solium* μπορεί να είναι παρόν σε ποσοστό έως και 20% των χοίρων (με αποτέλεσμα την απώλεια παραγωγικότητας) και προκαλεί εξουθενωτική ασθένεια στον

άνθρωπο που είναι δύσκολο και κοστοβόρο να αντιμετωπιστεί (*Fan PC. 1997;Hoberg EP. 2002;Phiri IK et al., 2002*).

Ο κύκλος ζωής του *Taenia* περιλαμβάνει δύο ξενιστές θηλαστικά. Τα ενήλικα άτομα στο ανθρώπινο έντερο μπορεί να ζήσουν για περισσότερα από είκοσι χρόνια, παράγοντας καθημερινά αρκετές χιλιάδες αυγά που αποβάλλονται με τα κόπρανα. Εάν αυτά καταναλωθούν από έναν ενδιάμεσο ξενιστή, εξελίσσονται σε προνύμφες (cysticerci) που μεταναστεύουν στους μύες. Η κατανάλωση ωμού ή ανεπαρκώς μαγειρεμένου, μολυσμένου μοσχαρίσιου ή χοιρινού κρέατος εισάγει τις προνύμφες στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα όπου ωριμάζουν σε ενήλικα σκουλήκια. Οι λοιμώξεις μπορεί να είναι ασυμπτωματικές ή να προκαλούν συμπτώματα, όπως μεταβολή της όρεξης, κοιλιακό άλγος, διάρροια ή δυσκοιλιότητα. (*M. Ellin Doyle, 2003*)

Ο άνθρωπος μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως ενδιάμεσος ξενιστής για το *T. solium* (αλλά όχι για το *T. saginata* ή το *T. asiatica*). Όταν τα αυγά του *T. solium* προσλαμβάνονται μέσω βρώμικων χειρών ή μολυσμένων με κόπρανα λαχανικών, οι προνύμφες εκκολάπτονται στο λεπτό έντερο και ταξιδεύουν σε διάφορους ιστούς και όργανα του σώματος, όπου εγκλωβίζονται προκαλώντας κυστικέρκωση. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι έως και το 40% των φορέων ενήλικων σκουληκιών έχουν επίσης κυστικέρκωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κοπρανο-στοματική μετάδοση, είτε άμεσα είτε μέσω μολυσμένων τροφίμων ή νερού, είναι συχνή. Η χρήση ανεπεξέργαστης λάσπης αστικών λυμάτων σε βοσκοτόπια μπορεί να προκαλέσει κυστικέρκωση σε βοοειδή ή χοίρους, ενώ τα ανεπεξέργαστα ανθρώπινα απόβλητα που περιέχουν αυγά *T. solium*, εάν χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα κήπων, θα μπορούσαν να προκαλέσουν κυστικέρκωση στον άνθρωπο (*Cabaret J et al., 2002*).

Οι πιο σοβαρές συνέπειες εμφανίζονται όταν οι προνύμφες φτάσουν στον εγκέφαλο, προκαλώντας νευροκυστικέρκωση που συχνά προκαλεί πονοκεφάλους, επιληπτικές κρίσεις και άλλα νευρολογικά συμπτώματα (*Garcia HH et al., 2002*). Πρόκειται για την πιο συχνή παρασιτική νόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος και αποτελεί μείζον πρόβλημα σε ορισμένες περιοχές της Λατινικής Αμερικής, της Αφρικής, της Ασίας και της Ανατολικής Ευρώπης (*Fleury A et al., 2003;Garcia HH et al., 2003;Nguekam JP et al., 2003;Nicoletti A et al., 2002;Noormahomed EV et al., 2003;Prasad KN et al., 2002*). Ακόμη και στις ΗΠΑ, όπου η μόλυνση με ενήλικους ταινιοσκώληκες είναι σχετικά σπάνια, εμφανίζονται κάθε χρόνο περισσότερες από 1000 περιπτώσεις νευροκυστικέρκωσης (*Carpio A. 2002*). Οι περισσότερες περιπτώσεις εντοπίζονται σε μετανάστες από ενδημικές περιοχές και περίπου το 10-12% των επισκέψεων στα επείγοντα περιστατικά για επιληπτικές κρίσεις στη νότια Καλιφόρνια και το Νέο Μεξικό οφείλονται σε αυτή

τη νόσο. Τα κρούσματα που αποκτώνται στις ΗΠΑ μπορούν μερικές φορές να εντοπιστούν σε επαφές με μετανάστες, συμπεριλαμβανομένων των μαγείρων, που έχουν μολυνθεί από το χοιρινό ταινιοσκώληκα, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν τροφιμογενείς επιδημίες νευροκυστικέρκωσης (*Centers for Disease Control. 1992; Ong S et al., 2002*).



Taenia solium

Echinococcus spp.

Το ενήλικο στάδιο αυτού του ταινιοσκώληκα ζει σε σκύλους, αλεπούδες και άλλα κυνόδοντα και τα ενδιάμεσα στάδια μολύνουν συνήθως πρόβατα, κατσίκες, χοίρους, άλογα και βοοειδή. Ο άνθρωπος μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως ενδιάμεσος ξενιστής εάν καταπιεί αυγά ταινίας σε μολυσμένο νερό ή σε ωμά, μολυσμένα λαχανικά. Οι προνύμφες των ταινιοσκώληκων σχηματίζουν κύστες γεμάτες με υγρό (που ονομάζονται hydatid cysts) στο ήπαρ, τους πνεύμονες και άλλα όργανα των ενδιάμεσων ξενιστών. Η βλάβη των ιστών μπορεί να είναι σοβαρή σε ορισμένες περιπτώσεις (*Gottstein B and Reichen J. 2002; Torgerson PR and Budke CM. 2003*). Η νόσος αυτή ενδημεί σε ορισμένες περιοχές της βόρειας Αφρικής, της Ασίας, της Μέσης Ανατολής (*Altintas N. 2003; Torgerson PR et al., 2003*) και σε ορισμένες ευρωπαϊκές μεσογειακές χώρες (*Kern P et al., 2002; Seimenis A. 2003*), ενώ περιστασιακά μπορεί να παρατηρηθούν κρούσματα στις ΗΠΑ, συνήθως μεταξύ μεταναστών.



Echinococcus granulosus

***Diphyllobothrium* spp. (ταινία των ψαριών)**

Το *Diphyllobothrium* spp. συνδέεται εδώ και καιρό με πολιτισμούς που καταναλώνουν ωμά ή ελαφρώς μαγειρεμένα ψάρια (Reinhard K and Urban O. 2003). Επί του παρόντος, οι ανθρώπινες λοιμώξεις είναι συχνότερες στη Φινλανδία, τη Σκανδιναβία, την Αλάσκα, τον Καναδά, την Ιαπωνία και το Περού (Dick TA et al., 2001).

Ο άνθρωπος είναι ένας από τους κύριους οριστικούς ξενιστές και ο ενήλικος ταινιοσκώληκας μπορεί να φτάσει σε μήκος δέκα μέτρων στο έντερο. Τα αυγά περνούν με τα κόπρανα, εκκολάπτονται στο νερό και οι προνύμφες τρώγονται από ένα κωπήποδο. Τα ψάρια που τρώνε κωπήποδα μολύνονται και στη συνέχεια μεταδίδουν τα παράσιτα στους ανθρώπους που τρώνε ωμά ψάρια. Το *D. latum* είναι ευρέως διαδεδομένο σε λούτσους και, σε μικρότερο βαθμό, σε κίτρινες πέρκες στον κεντρικό Καναδά και έχει επίσης βρεθεί σε ψάρια στη βόρεια Μινεσότα και στο βόρειο Μίσιγκαν. Η πέστροφα και ο σολομός μπορεί να μεταφέρουν τις προνύμφες του *D. latum* στη Νότια Αμερική αλλά όχι στη Βόρεια Αμερική. Ορισμένα άλλα είδη του *Diphyllobothrium* έχουν απομονωθεί από σολομούς στην Ιαπωνία και την Αλάσκα. Οι λύκοι, οι αρκούδες και άλλα ιχθυοφάγα θηλαστικά και πτηνά μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως οριστικοί ξενιστές για ορισμένα είδη του *Diphyllobothrium*. Τα περιττώματά τους θα περιέχουν αυγά παρασίτων που μπορεί να μεταφερθούν σε λίμνες ή ρυάκια. (M. Ellin Doyle, 2003)

Συνήθως η παρουσία ενός σκουληκιού δεν προκαλεί συμπτώματα, αλλά πολλά σκουλήκια μπορούν να προκαλέσουν κοιλιακό πόνο, διάρροια και αναιμία. Ο άνθρωπος δεν μπορεί να

χρησιμεύσει ως πραγματικός ενδιάμεσος ξενιστής για αυτό το παράσιτο (όπως συμβαίνει με το χοιρινό ταινιοσκώληκα). Ωστόσο, η κατανάλωση νερού που περιέχει νεοεκκολαπτόμενες προνύμφες ή μολυσμένα κωπήποδα μπορεί να προκαλέσει μια κατάσταση που ονομάζεται σπαργάνωση. Οι προσλαμβανόμενες προνύμφες διαπερνούν το εντερικό τοίχωμα και μεταναστεύουν στους ιστούς ακριβώς κάτω από το δέρμα προκαλώντας κάποια δυσφορία πριν πεθάνουν. (M. Ellin Doyle, 2003)



Diphyllbothrium

Παρασιτικά σκουλήκια - Τρηματώδεις

Clonorchis/Opisthorchis (Liver flukes)

Στην ανατολική και νοτιοανατολική Ασία, διάφορα συγγενικά παρασιτικά σκουλήκια των γενών *Clonorchis* και *Opisthorchis* κατακάθονται στο ήπαρ μολυσμένων ανθρώπων και άλλων ζώων προκαλώντας απόφραξη και υπερπλασία των χολικών οδών. Οι ελαφρές μολύνσεις μπορεί να προκαλέσουν ήπια συμπτώματα ηπατικής δυσλειτουργίας, ενώ οι ισχυρότερες μολύνσεις οδηγούν σε ηπατίτιδα και πεπτικές διαταραχές. Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της χρόνιας λοίμωξης με τα Liver flukes και ενός τύπου καρκίνου του ήπατος, του χολαγγειοκαρκινώματος (Watanapa P and Watanapa WB. 2002).

Τα Liver flukes έχουν έναν πολύπλοκο κύκλο ζωής που περιλαμβάνει δύο ενδιάμεσους ξενιστές, τα σαλιγκάρια και τα ψάρια. Οι άνθρωποι και άλλα ζώα που τρώνε ψάρια ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τρώγοντας ωμά, μολυσμένα ψάρια και χωνεύοντας τις κύστες. Στη συνέχεια, οι προνύμφες

μεταναστεύουν στο συκώτι, ωριμάζουν και παράγουν αυγά. (M. Ellin Doyle, 2003)

Παραδοσιακά, τα κρούσματα αυτής της νόσου περιορίζονταν στην Ασία. Τα παράσιτα έχουν ανιχνευθεί σε ψάρια, γάτες και άλλα ζώα στις περισσότερες ασιατικές χώρες και επίσης στη Σιβηρία, το Καζακστάν, την Ουκρανία και τη Γερμανία. Με την εισροή ασιατών μεταναστών στην Αυστραλία και σε άλλες δυτικές χώρες από τη δεκαετία του 1970, έχουν διαγνωστεί ανθρώπινες λοιμώξεις από ηπατίτιδα σε πολλές χώρες όπου η νόσος δεν ενδημεί (De Silva S et al., 2002).

Ωστόσο, τα παράσιτα αυτά μπορεί να υπάρχουν σε μετανάστες από χώρες της Ασίας και υπάρχει πιθανότητα εισαγωγής μολυσμένων ψαριών γλυκού νερού από ενδημικές περιοχές. (M. Ellin Doyle, 2003)



Clonorchis sinensis

***Fasciola hepatica* (Liver fluke)**

Το *F. hepatica* είναι γνωστό παράσιτο των οικόσιτων μηρυκαστικών που προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες στις βιομηχανίες βοοειδών και προβάτων ορισμένων χωρών (Haseeb AN et al., 2002; Kithuka JM et al., 2002; Onu JE. 2001). Τα ανθρώπινα κρούσματα εμφανίζονται συνήθως σε μέρη των χωρών της Νότιας Αμερικής, της Βόρειας Αφρικής και της Μέσης Ανατολής όπου οι εγκαταστάσεις υγιεινής είναι ανεπαρκείς και δεν υπάρχει καθαρό νερό. Σε ορισμένες περιοχές της

Βολιβίας έχει μολυνθεί πάνω από το 60% του τοπικού πληθυσμού, ενώ το 1988 σημειώθηκε στο Ιράν μια μεγάλη επιδημία που αφορούσε 10.000 άτομα (*Farag HF. 1998; Mas-Coma MS et al., 1999; Roig GVG. 2002*). Ανθρώπινες εστίες και κρούσματα μπορεί να εμφανιστούν εκεί όπου το παράσιτο αυτό αποτελεί κτηνοτροφικό πρόβλημα, αλλά εμφανίζονται επίσης και σε περιοχές όπου η επιβάρυνση από ζωικά παράσιτα είναι χαμηλή (*Mas-Coma MS et al., 1999*). Οι άνθρωποι στις ανεπτυγμένες χώρες μολύνονται επίσης περιστασιακά εάν έχουν μολυνθεί τα χόρτα σαλάτας (*Guichard D et al., 2002; Hughes AJ et al., 2003*).

Τα συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν πυρετό, κοιλιακό άλγος, απώλεια βάρους και διόγκωση του ήπατος. Ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι οι βαριές ή χρόνιες λοιμώξεις από αυτό το παράσιτο σχετίζονται με όγκους στο ήπαρ (*Haseeb AN et al., 2002*). Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι οι λοιμώξεις από *Fasciola* σε ποντίκια μπορούν να προκαλέσουν αύξηση των μεταλλάξεων σε κοντινά ηπατικά κύτταρα (*Gentile JM et al., 1998*).

Τα ενήλικα *Fasciola* κατοικούν στο ήπαρ, παράγοντας αυγά που αποβάλλονται με τα κόπρανα. Τα αυγά εκκολάπτονται στο νερό, οι προνύμφες διεισδύουν σε σαλιγκάρια και υφίστανται περαιτέρω ανάπτυξη πριν εγκαταλείψουν το σαλιγκάρι και εγκλωβιστούν στο νερό ή μέσα στη βλάστηση ή κοντά στο νερό. Κατά τη διάρκεια βροχερών περιόδων, κύστες μπορεί επίσης να υπάρχουν σε φυτά του αγρού, όπως φύλλα πικραλίδας. Οι κύστες του *Fasciola* μπορούν να επιβιώσουν σε τρεχούμενο νερό για 122 ημέρες, σε βοσκότοπους για έως και ένα έτος και ακόμη και για μερικούς μήνες σε άχυρο (*Haseeb AN et al., 2002*). Οι άνθρωποι συχνά μολύνονται από την κατανάλωση νεροκάρδαμου (*Guichard D et al., 2002; Hughes AJ et al., 2003*) και μιας ποικιλίας άλλων φυτών (*Farag HF. 1998; Haseeb AN et al., 2002*) που αναπτύσσονται κοντά σε μολυσμένα χωράφια και από την κατανάλωση μολυσμένου νερού (*Esteban JG et al., 2002; Holm P and Kristoffersen EK. 2002*).



Fasciola hepatica

***Fasciolopsis buski* (Fasciolopsiasis, Intestinal fluke)**

Το *F. buski* είναι το μεγαλύτερο τριματώδες που μολύνει τον άνθρωπο, με ενήλικα σκουλήκια τυπικού μήκους 8-10 cm. Τα σκουλήκια κατοικούν συχνότερα στα έντερα των χοίρων εκτροφής και των παιδιών σχολικής ηλικίας στις ασιατικές χώρες. Η αναιμία, ο πονοκέφαλος και η γαστρική δυσφορία χαρακτηρίζουν τις ήπιες λοιμώξεις, ενώ οι βαρύτερες λοιμώξεις προκαλούν έντονο κοιλιακό άλγος, υποσιτισμό, οίδημα και μερικές φορές εντερική απόφραξη. (M. Ellin Doyle, 2003)

Αυτό το παράσιτο απαιτεί έναν μόνο ενδιάμεσο ξενιστή. Τα αυγά εναποτίθενται στα κόπρανα, εκκολάπτονται στο νερό και οι προνύμφες διεισδύουν σε σαλιγκάρια και αναπτύσσονται. Μετά από 4-6 εβδομάδες τα παράσιτα βγαίνουν από τα σαλιγκάρια και εγκλωβίζονται στο νερό ή σε υδρόβια φυτά. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού ή ωμών υδρόβιων λαχανικών επιτρέπει την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής (Graczyk TK et al., 2001).

Αυτό το παράσιτο δεν είναι πιθανό να αποτελέσει πρόβλημα στις ΗΠΑ, εκτός από τους μετανάστες και τους ξένους ταξιδιώτες. Τα μολυσμένα λαχανικά που ενδέχεται να εισαχθούν από ενδημικές περιοχές πιθανόν να αποξηραθούν ή να κονσερβοποιηθούν, και οι δύο διαδικασίες θα καταστρέψουν το παράσιτο. (M. Ellin Doyle, 2003)



Fasciolopsis buski

***Paragonimus* (Lung fluke)**

Εννέα είδη του τρηματοειδούς *Paragonimus* κατοικούν σε πολλά μέρη του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης της Βόρειας Αμερικής, και μολύνουν τον ανθρώπινο πνεύμονα και περιστασιακά άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου. Συμπτώματα διάρροιας, κοιλιακού πόνου και πυρετού μπορεί να εμφανιστούν νωρίς μετά τη μόλυνση και να εξελιχθούν σε βήχα και θωρακικό πόνο καθώς τα σκουλήκια εγκαθίστανται στους πνεύμονες. Οι λοιμώξεις μερικές φορές αρχικά διαγνώσκονται λανθασμένα ως φυματίωση, γεγονός που μπορεί να καθυστερήσει την αποτελεσματική θεραπεία (Nakamura-Uchiyama F et al., 2002; Vélez ID et al., 2002).

Ο κύκλος ζωής αυτού του παρασίτου περιλαμβάνει δύο ή περισσότερους ενδιάμεσους ξενιστές: ένα σαλιγκάρι του γλυκού νερού, στη συνέχεια ένα καβούρι ή καραβίδα και μερικές φορές ένα ζώο που τρώει τα καβούρια και στη συνέχεια καταναλώνεται από τον άνθρωπο. Τα σκουλήκια μπορούν να ωριμάσουν μόνο στον άνθρωπο και σε ορισμένα άγρια σαρκοφάγα ζώα. Όταν άλλα θηλαστικά, όπως τα αγριογούρουνα, καταναλώνουν μολυσμένα καβούρια, το *Paragonimus* δεν μπορεί να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του, αλλά μεταναστεύει στους μύες και εγκλωβίζεται. Εάν οι άνθρωποι καταναλώσουν μολυσμένο κρέας αγριόχοιρου, τα σκουλήκια βγαίνουν από την κύστη και μεταναστεύουν στους πνεύμονες όπου ζευγαρώνουν και παράγουν αυγά. (M. Ellin Doyle, 2003)

Συνήθως, οι άνθρωποι μολύνονται τρώγοντας ωμά ή παστά καβούρια, συμπεριλαμβανομένου ενός κινεζικού εδέσματος που το αποκαλούν "drunken crab" (Cornejo W et al., 2000; Cui J et al., 1998; Junichi G. 1994). Ωστόσο, ορισμένα κρούσματα στην Ιαπωνία έχουν εντοπιστεί σε ατελώς

μαγειρεμένο κρέας αγριογούρουνου (*Nakamura-Uchiyama F et al., 2002; Sasaki M et al., 2002*), ενώ το ατελώς μαγειρεμένο κρέας ινδικού χοίρου πιστεύεται ότι αποτελεί φορέα σε ορισμένες χώρες της Νότιας Αμερικής (*Hillyer GV and Apt W. 1997*). Πολλά από τα κρούσματα που έχουν διαγνωστεί στις ΗΠΑ εμφανίζονται σε μετανάστες που είχαν ήδη μολυνθεί όταν ήρθαν στη χώρα αυτή ή συνεχίζουν να τρώνε εισαγόμενα ωμά οστρακοειδή (*Meehan AM et al., 2002*). Τα κρούσματα που εκδηλώθηκαν στις ΗΠΑ έχουν εντοπιστεί σε κατανάλωση ωμών караβίδων (*DeFrain M and Hooker R. 2002; Procop GW et al., 2000*). Ούτε το πάστωμα ούτε το αλάτισμα καταστρέφει το *Paragonimus*, αλλά το κατάλληλο μαγείρεμα καθιστά τα καβούρια, τις караβίδες και το κρέας ασφαλή για κατανάλωση.



Paragonimus

Μεθοδοι ανίχνευσης τροφιμογενών παρασίτων

Η ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών αποτελεί ένα κρίσιμο πρώτο βήμα στη διαχείριση των μολυσματικών ασθενειών. Η απόδοση μιας μεθόδου ανίχνευσης εξαρτάται από εσωτερικές ιδιότητες, όπως η ευαισθησία και η ειδικότητα, καθώς και από εξωγενείς παράγοντες, όπως το φορτίο παθογόνου, η παρουσία ανασταλτικών ουσιών και ο τύπος του δείγματος. Το τελευταίο είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που πρέπει να ληφθεί υπόψη, διότι αναπόφευκτα επηρεάζει τα βήματα που απαιτούνται για την προετοιμασία του δείγματος και θα μπορούσε να περιορίσει την καταλληλότητα ορισμένων τεχνικών. (*M Bouzid, 2014*)

Συμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης

Μικροσκοπία

Η μικροσκοπία ήταν η καλύτερη μέθοδος επιλογής για την ανίχνευση μικροοργανισμών και είναι πιθανό να παραμείνει, ιδίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Ως εκ τούτου, η αξία της συγκεκριμένης μεθόδου δεν πρέπει να υποτιμάται στη σημερινή εποχή των μοριακών και τεχνολογικών εξελίξεων. Το κύριο πλεονέκτημα της μικροσκοπίας είναι το χαμηλό κόστος και η ευκολία χρήσης. Η μικροσκοπία, ωστόσο, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα και την εμπειρία του τεχνικού για την αποτελεσματική ανίχνευση και ταυτοποίηση των παρασίτων. Χρησιμοποιούνται διάφορα μικροσκοπικά παρασκευάσματα - υγρά, ξηρά, στεραία και με χρώσεις - το καθένα με περιορισμούς και πλεονεκτήματα. Οι χημικές χρώσεις που χρησιμοποιούνται συχνά για την ανίχνευση παρασίτων περιλαμβάνουν την αιματοξυλίνη, το acid fast, την Giemsa και το μπλε της τολουιδίνης. Η χρώση μπορεί να βελτιώσει την ειδικότητα ανίχνευσης, ωστόσο, η πρόσληψη χρωστικής μπορεί να συμβεί σε άλλους μικροοργανισμούς και υπολείμματα. Επομένως, η εκ των προτέρων γνώση της μορφολογίας και της διάστασης των παρασίτων θα βοηθούσε στη σωστή ταυτοποίηση. Η μικροσκοπική παρατήρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσης, διαφορικής αντίθεσης παρεμβολής (DIC) καθώς και μικροσκοπίας φθορισμού. Το φωτεινό πεδίο είναι μια βασική τεχνική μικροσκοπίας και εξαρτάται από δείγματα καλής ποιότητας για την ταυτοποίηση (ιδίως για μη χρωματισμένες αντικειμενοφόρους πλάκες). Η αντίθεση φάσης και η DIC έχουν το πλεονέκτημα της έντονης αντίθεσης μεταξύ του δείγματος και του υποβάθρου, επιτρέποντας έτσι τη δυνατότητα δομικής παρατήρησης και ταυτοποίησης της εσωτερικής μορφολογίας των σταδίων ζωής των παρασίτων. Για τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού (IFA), τα παράσιτα μπορούν να χρωματιστούν άμεσα όταν επωάζονται με ένα ειδικό αντίσωμα που συνδέεται χημικά με ένα φθοριοφόρο (άμεση IFA), εναλλακτικά, τα παράσιτα επωάζονται με ένα ειδικό μη επισημασμένο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζεται από ένα δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (έμμεση IFA). Η έμμεση IFA προτιμάται γενικά λόγω του χαμηλού φθορισμού υποβάθρου και της ευέλικτης χρήσης των αντιδραστηρίων. Τα χρωματισμένα παράσιτα παρατηρούνται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού και κατάλληλου φίλτρου. Ειδικά αντισώματα επισημασμένα με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη διατίθενται στο εμπόριο για τα περισσότερα παράσιτα δημόσιας υγείας και χρησιμοποιούνται ευρέως για διαγνωστικούς σκοπούς. Γενικά, η IFA παρέχει εξαιρετική εξειδίκευση επειδή τα αντισώματα είναι ειδικά για το γένος ή το είδος. Ορισμένοι μικροοργανισμοί και υπολείμματα στο δείγμα, θα

μπορούσαν να διασταυρωθούν και να εμφανιστούν ως φθορίζοντα. Σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι ωφέλιμο να καταφεύγετε σε βασικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος και η εσωτερική δομή του παρασίτου. Επιπλέον, η προσθήκη πρόσθετων χρωστικών ουσιών, όπως η χρώση νουκλεϊκών οξέων 4', 6'-διαμιδινο-2 φαινυλλινδόλη (DAPI), θα μπορούσε να διευκολύνει την ταυτοποίηση. Η χρώση DAPI περιλαμβάνεται στην πρότυπη μέθοδο 1623 της EPA των ΗΠΑ. Όταν χρησιμοποιείται με ωκύστες *Cryptosporidium*, το DAPI χρωματίζει τους τέσσερις πυρήνες των σποροζωιτών, επιτρέποντας έτσι την απόλυτη ταυτοποίηση. Ωστόσο, μερικές φορές είναι αδύνατο να δει κανείς και τους τέσσερις σποροζωίτες. Ως αποτέλεσμα, αρκετά πρωτόκολλα διευκρινίζουν ότι η παρατήρηση των σποροζωιτών αποτελεί επαρκές κριτήριο για την ταυτοποίηση.

Η μικροσκοπία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη μορφολογία και τη μορφομετρία των παρασίτων. Ο Πίνακας 1 συνοψίζει τα χαρακτηριστικά των παρασίτων που μεταδίδονται με τα τρόφιμα και το νερό. Η διάγνωση του *Cryptosporidium* γίνεται συνήθως με μικροσκοπική παρατήρηση επιχρισμάτων κοπράνων, συμπυκνωμάτων νερού και παρασκευασμάτων από τρόφιμα. Λόγω του μικρού μεγέθους και των κοινών χαρακτηριστικών των ωκύστεων του κρυπτοσποριδίου, η ταυτοποίηση μπορεί να είναι χρονοβόρα και να συνδέεται με χαμηλό βαθμό εξειδίκευσης. Η χρώση του παρασιτικού παρασκευάσματος βελτιώνει την ειδικότητα. Η τροποποιημένη όξινη ταχεία χρώση έχει υιοθετηθεί ευρέως για την ανίχνευση κοκκιδίων παρασίτων (*Cryptosporidium* και *Cyclospora*) και εμφανίζει ερυθρά χρωματισμένες ωκύστες σε γαλαζοπράσινο φόντο. Η προτεινόμενη τυποποιημένη διαδικασία για την ανίχνευση κρυπτοσποριδίου έχει εκδοθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο από την Υπηρεσία Προστασίας της Υγείας ως μέρος των βρετανικών προτύπων για μικροβιολογικές έρευνες. Δύο έγγραφα ισχύουν για το *Cryptosporidium*: "Investigation of Specimens Other Than Blood for Parasites" και "Staining Procedures". Στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει καθιερωθεί και χρησιμοποιείται ευρέως η τυποποιημένη μέθοδος 1623 για την ανίχνευση *Cryptosporidium* και *Giardia*. Για το *Giardia*, η διάγνωση βασίζεται στη μικροσκοπική ταυτοποίηση των κύστεων ή των τροφοζωιτών *Giardia*. Τα δείγματα κοπράνων μπορούν να εξεταστούν απευθείας ή να σταθεροποιηθούν και να χρωματιστούν με ιώδιο, τρίχρωμο ή αιματοξυλίνη. Το παράσιτο *Entamoeba histolytica* μπορεί επίσης να ταυτοποιηθεί με μικροσκόπιο-ωστόσο, επειδή αυτό το παράσιτο είναι μορφολογικά πανομοιότυπο με άλλα μη παθογόνα είδη *Entamoeba*, είναι αποδεκτό να αναφέρεται η ταυτοποίηση του συμπλέγματος *E. histolytica/E. dispar* από υγρό παρασκεύασμα ή από σταθεροποιημένα δείγματα. Για την οριστική ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό του είδους θα απαιτηθούν πρόσθετες τεχνικές. Η διάγνωση της μικροσποριδίασης βασίζεται στη μικροσκοπική διαπίστωση των σπορίων μετά από χρώση. Η τριχοειδής χρώση χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τη χρώση των σπορίων *Microsporidia*, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες χρώσεις όπως η Calcofluor. Το Calcofluor είναι ένας

χημειοφθορίζων παράγοντας που χρωματίζει τα σπόρια *Microsporidia* σε κυανόλευκο χρώμα. Η ανίχνευση για *Microsporidia* με μικροσκοπία είναι δύσκολη λόγω του μικρού μεγέθους των σπορίων και του μη ειδικού προτύπου χρώσης όταν χρησιμοποιούνται χημικές ή φθορίζουσες χρωστικές. Για το *C. cayetanensis*, η μικροσκοπική ταυτοποίηση βασίζεται στην παρατήρηση των ωοκύστεων. Το *Cyclospora* έχει ένα χαρακτηριστικό μοτίβο χρώσης και αυτοφθορίζεται κάτω από ειδικά διχρωματικά φίλτρα (Πίνακας 1). Η συνήθης διαδικασία για την ταυτοποίηση του *C. cayetanensis* περιλαμβάνει συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα με φορμόλη, ακολουθούμενη από υπεριώδη επιφθορισμό και μικροσκοπία φωτεινού πεδίου ή χημική χρώση των επιχρισμάτων (χρησιμοποιούνται τροποποιημένες τεχνικές με βάση το acid-fast ή την τροποποιημένη σαφρανίνη). Οι ωοκύστες *Cyclospora* μοιάζουν πολύ με τις ωοκύστες *Cryptosporidium*, αλλά έχουν διπλάσιο μέγεθος. Επομένως, η ακριβής μέτρηση του μεγέθους είναι σημαντική για τη σωστή ταυτοποίηση. Μία από τις άλλες δυσκολίες που σχετίζονται με τη μικροσκοπική ταυτοποίηση του *C. cayetanensis* είναι η διαφορετική και ανομοιομορφη χρώση με πολλές παραδοσιακές χημικές χρώσεις, όπως η Giemsa, η αιματοξυλινοσίνη και η τροποποιημένη Zielh-Neelsen. Οι ωοκύστες *Toxoplasma gondii* μπορούν να αναγνωριστούν με μικροσκοπική παρατήρηση συμπυκνωμένων δειγμάτων νερού, ωστόσο, αυτό δεν φαίνεται να είναι συνηθισμένη πρακτική. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην έλλειψη τυποποιημένου πρωτοκόλλου για την ανίχνευση του *T. gondii* από περιβαλλοντικά δείγματα. Το εν λόγω ζήτημα ισχύει και για άλλα παράσιτα που έχουν μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία. Για την ανίχνευση του *T. gondii* από περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιούνται βιοδοκιμές και μοριακές τεχνικές, ενώ για την ανίχνευση του παρασίτου στον άνθρωπο και σε άλλους ξενιστές χρησιμοποιούνται ορολογικές μέθοδοι. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η μικροσκοπική παρατήρηση παρασίτων ιατρικής σημασίας με τη χρήση παραδοσιακών χημικών χρώσεων. (M Bouzid, 2014)

Table 1 Morphologic and morphometric characteristics of food- and waterborne parasites of medical importance

Parasite	Size	Description
<i>C. parvum</i>	4–6 μm	Round to oval oocyst, refractile in wet preparation, oocyst contains four sporozoites, of fusiform shape and measuring $3.5\text{--}4.2 \times 0.53\text{--}0.6 \mu\text{m}$. Sporozoites and merozoites have an apical complex (pellicle, rhoptries, micronemes, electron-dense granules, conoid).
<i>G. duodenalis</i>	8–14 \times 7–10 μm	Oval shape cyst with thick and refractile wall; four nuclei are present in a mature cyst. Trophozoites are pear shaped and motile due to their four pairs of flagella. They are $10\text{--}12 \times 5\text{--}7 \mu\text{m}$ and have a sucking disk on the ventral side. Trophozoites have two nuclei and axonemes.
<i>E. histolytica</i>	10–16 μm	Round to oval cyst with four nuclei, with chromatoid bodies in the immature cyst. Trophozoites may range in size from 10 to 40 μm in diameter, movement is rapid gliding by means of single pseudopodium. The nucleus is big, spherical and contains a small central karyosome (0.5 μm diameter).
<i>Microsporidia</i> <i>C. cayetanensis</i>	1–4 μm 8–10 μm	Oval-shaped spore with a characteristic coiled polar tube, layered polarplast, and a posterior vacuole. Spherical oocysts with a 'wrinkly' coat. <i>Cyclospora</i> oocysts are similar to <i>Cryptosporidium</i> oocysts but are double the size. Each sporulated oocyst has two sporocysts, with two sporozoites each. <i>Cyclospora</i> autofluoresce under UV light (blue with 330–380 nm dichromatic filter and green with 450–490 nm filter).
<i>T. gondii</i>	9 \times 14 μm	Round to oval unsporulated oocyst (only in felids). Sporulated oocysts have two sporocysts, each containing four sporozoites. <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites are crescent shaped of $2 \times 6 \mu\text{m}$.

(M Bouzid, 2014)

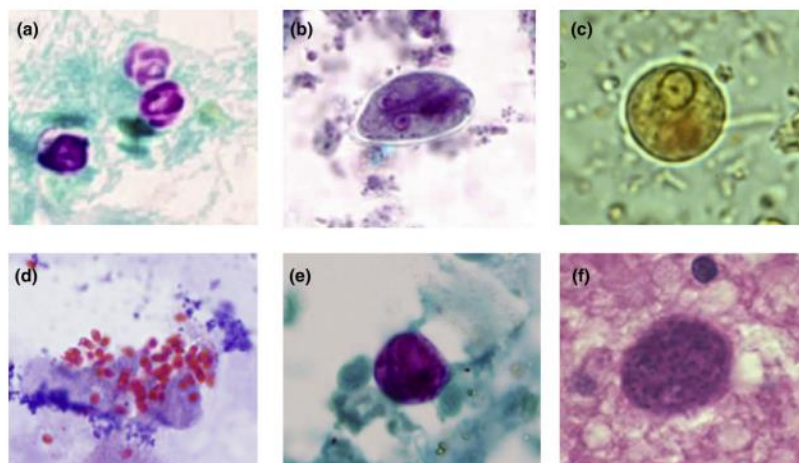


Figure 1 Water- and foodborne parasites of medical importance. (a) *Cryptosporidium parvum* oocysts stained with modified acid fast. Inside the oocysts on the right, sporozoites are visible. (b) *Giardia duodenalis* cyst stained with trichrome. (c) Cysts of *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* stained with iodine. (d) Spores of *Encephalitozoon cuniculi* (*Microsporidia*) stained with modified trichrome stain. Image courtesy of Mayo Clinic, Rochester, MN. (e) Oocyst of *Cyclospora cayetanensis* stained with modified acid-fast. (f) *Toxoplasma gondii* cyst stained with hematoxylin and eosin. The images are derived from the CDC-DPDx image library http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm and are used with permission.

(M Bouzid, 2014)

Ανοσολογικές μέθοδοι

Ανοσολογικές τεχνικές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση είτε των αντιγόνων του παρασίτου είτε της αντίδρασης αντισωμάτων του ξενιστή. Οι ανοσοδοκιμές για την ανίχνευση αντιγόνων παρέχουν αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα σε σύγκριση με τη μικροσκοπία. Οι

ενζυμικοί ανοσοπροσδιορισμοί (EIA) είναι διαθέσιμοι σε μορφή μικροπλάκας, επιτρέποντας τον έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων, γεγονός που τους καθιστά δημοφιλείς στα διαγνωστικά εργαστήρια. Επιπλέον, πολλά στάδια της EIA μπορούν να αυτοματοποιηθούν (διοχέτευση με πιπέτα, πλύσιμο, ανάγνωση μικροπλάκας), μειώνοντας δραματικά το χρόνο εξέτασης. Διατίθενται διάφορα εμπορικά κιτ για την ανίχνευση παρασίτων. Για παράδειγμα, το τεστ *Giardia* SNAP που επιτρέπει την ανίχνευση ειδικών αντιγόνων από δείγματα κοπράνων χρησιμοποιείται ευρέως σε κτηνιατρικά περιβάλλοντα λόγω της εύκολης χρήσης και της εξαιρετικής ευαισθησίας και ειδικότητας (95 και 99%, αντίστοιχα, σύμφωνα με τον κατασκευαστή). Ορισμένα εμπορικά κιτ επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών παρασίτων - για παράδειγμα, το Triage parasite panel EIAs έχει αποδειχθεί ότι επιτρέπει την ανίχνευση των *G. duodenalis*, *E. histolytica*/ *E. dispar* και *C. parvum* από δείγματα κοπράνων, με την ακόλουθη ευαισθησία και ειδικότητα: 95,9 και 97,4%, 96,0 και 99,1% και 98,3 και 99,7%, αντίστοιχα. Εκτός από την EIA, η ανίχνευση αντιγόνων μπορεί να πραγματοποιηθεί με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας εμπορικά ή εσωτερικά ειδικά αντισώματα. Η ανοσοχρωματογραφία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντιγόνου. Είναι συνήθως διαθέσιμη σε μορφή ενός δείγματος (dipstick) και παρέχει τη δυνατότητα ταχείας ανίχνευσης, η οποία μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δοκιμές πεδίου. Το *Giardia*-strip dipstick είναι η μέθοδος ρουτίνας για τη διάγνωση του *G. duodenalis* σε νοσοκομεία και κτηνιατρικές κλινικές. Η ανίχνευση αντιγόνου με EIA για άλλα παράσιτα που έχουν μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία δεν χρησιμοποιείται ευρέως. Η EIA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντισωμάτων σε μολυσμένους ξενιστές. Η ανίχνευση αντισωμάτων μπορεί να είναι βοηθητική για την επιβεβαίωση της διάγνωσης, ιδίως για τα παράσιτα που δεν ανιχνεύονται εύκολα, συμπεριλαμβανομένων των *Microsporidia* και *Toxoplasma*, για τα οποία οι ορολογικές εξετάσεις παραμένουν ως μέθοδος επιλογής σε κλινικές εγκαταστάσεις. Αυτή η διαγνωστική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο αναδρομικά λόγω της φύσης της αντίδρασης των αντισωμάτων, παρόλο που έχει επιδημιολογική χρησιμότητα. (M Bouzid, 2014)

Καλλιέργεια

Δεδομένου ότι τα παράσιτα είναι ενδοκυτταρικά, είναι κάπως προφανές ότι η καλλιέργεια δεν αποτελεί συχνή μέθοδο ανίχνευσης παρασίτων σε καθημερινές συνθήκες. Για πολλά παράσιτα που μεταδίδονται με το νερό και τα τρόφιμα, έχουν πραγματοποιηθεί καλλιέργειες, κυρίως σε ερευνητικά πλαίσια, για τη διαλεύκανση των μηχανισμών κυτταρικής και λειτουργικής βιολογίας, καθώς και της παθογένειας και της μολυσματικότητας. Ωστόσο, η *in vitro* καλλιέργεια όλων των

σταδίων ζωής και η μακροχρόνια διατήρηση στο εργαστήριο παραμένουν ανέφικτες για αρκετά παράσιτα που έχουν σημασία για τη δημόσια υγεία. (M Bouzid, 2014)

Αξιολόγηση βιωσιμότητας

Ο κίνδυνος μόλυνσης από παράσιτα που υπάρχουν στο νερό ή στα τρόφιμα σχετίζεται άμεσα με τη βιωσιμότητά τους. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για τη διάκριση μεταξύ βιώσιμων και μη βιώσιμων παρασίτων. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν τη συμπερίληψη ή τον αποκλεισμό ζωτικών χρωστικών ουσιών, όπως το DAPI και το ιωδιούχο προπίδιο (PI). Για το *Cryptosporidium*, οι πυρήνες των σποροζωιτών που προσλαμβάνουν το DAPI αλλά δεν χρωματίζονται με το PI, είναι βιώσιμοι, ενώ το πυρηνικό υλικό που χρωματίζεται και με τα δύο φθοριοχρώματα δεν είναι βιώσιμο. Μια ένδειξη βιώσιμης κατάστασης για τις κύστες *Giardia* είναι η παρουσία διακετατικής φλουορεσκεΐνης και η απουσία PI. Η ταυτοποίηση της βιώσιμης *E. histolytica* βασίζεται στον αποκλεισμό της χρωστικής Trypan blue. Η βιωσιμότητα για *Microsporidia* δεν αξιολογείται συνήθως, αλλά μπορεί επίσης να βασίζεται στον αποκλεισμό του PI. Για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των σπορίων του *E. cuniculi* έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες χρωστικές, συμπεριλαμβανομένων των SYTOX Green και SYTO 9. Τα βιώσιμα σπόρια δεν προσλαμβάνουν τη χρωστική, ενώ τα εξασθενημένα σπόρια προσλαμβάνουν τη χρωστική. Αυτές οι χρωστικές χρησιμοποιούνται συνήθως σε συνδυασμό με άλλη χρώση, όπως το Calcofluor white. Επειδή οι μέθοδοι ζωτικών χρωστικών δεν συμφωνούν με άλλες μεθόδους αξιολόγησης της βιωσιμότητας, η ακρίβειά τους αμφισβητείται. Ο κύριος περιορισμός είναι ότι η μέθοδος λειτουργεί μόνο όταν η μεμβράνη είναι εκτεθειμένη. Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βιωσιμότητας είναι η *in vitro* εκσυστολή, όταν οι οωκύστες επωάζονται με κατάλληλα ένζυμα (θρυψίνη, χολικό άλας ή διττανθρακικό νάτριο) προκαλώντας την εκσυστολή τους. Διατίθενται διάφορα βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα *in vitro* εκχύλισης για τα *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba* και *Toxoplasma*. Η *in vitro* εκχύλιση, ωστόσο, τείνει να υπερεκτιμά τη βιωσιμότητα των οωκύστεων. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εφεδρική μεταγραφάση (RT-PCR) έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της βιωσιμότητας με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA που στοχεύει σε διάφορους δείκτες. Ως μοριακή τεχνική, έχει το πλεονέκτημα της ακριβούς αξιολόγησης της βιωσιμότητας, ωστόσο, μπορεί να περιοριστεί από το κόστος και τη δυσκολία που σχετίζονται με την εξαγωγή και τη χειραγώγηση του RNA. Ο υβριδισμός με φθορισμό *in situ* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της βιωσιμότητας των οωκύστεων όταν οι ανιχνευτές σχεδιάζονται για να υβριδίζουν με rRNA (το 18S rRNA έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς). Η

κυτταρομετρία ροής έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της βιωσιμότητας και αποτελεί επί του παρόντος τη μέθοδο ρουτίνας για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των ωοκύστεων του *T. Gondii*. Για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν βιοφυσικές τεχνικές. Η ηλεκτροτροφοδότηση βασίζεται στο χαρακτηριστικό ότι ο μοναδικός ρυθμός περιστροφής και η κατεύθυνση συνδέονται με ένα δεδομένο σωματίδιο υπό προκαθορισμένη συχνότητα τάσης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τη διαφοροποίηση μεταξύ βιώσιμων και νεκρών ωοκύστεων *C. parvum*, κάνοντάς τα να περιστρέφονται δεξιόστροφα και αριστερόστροφα, αντίστοιχα. Η *in vitro* μολυσματικότητα έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας, αλλά εξαρτάται από αποτελεσματικές κυτταρικές σειρές ικανές να μιμηθούν την πορεία της μόλυνσης *in vivo*. Τέλος, η *in vivo* μολυσματικότητα (που εξακολουθεί να θεωρείται το χρυσό πρότυπο) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας, αλλά περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα κατάλληλου ζωικού μοντέλου, το αυξημένο κόστος, τον χρονοβόρο χαρακτήρα και τη σχετική επικινδυνότητα. Αξίζει να ληφθεί υπόψη ότι η παρουσία ωοκύστεων στο νερό ή στα τρόφιμα, είτε ζωντανών είτε νεκρών, αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, επομένως, θα πρέπει να διερευνηθεί και να αντιμετωπιστεί ώστε να αποφευχθεί η μελλοντική μόλυνση. (M Bouzid, 2014)

Σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Έχουν εφαρμοστεί διάφορες μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών. Η χρήση της PCR για διαγνωστικούς σκοπούς γίνεται όλο και πιο δημοφιλής λόγω της εξαιρετικής ειδικότητας και ευαισθησίας, της ευκολίας χρήσης, του μειωμένου κόστους και των γρήγορων αποτελεσμάτων. Η PCR αναμένεται να αντικαταστήσει (ή τουλάχιστον να συμπληρώσει) τη μικροσκοπία ως τη μέθοδο επιλογής για την ανίχνευση παρασίτων, μόλις αποκτήσει μεγαλύτερη αποδοχή από τα διαγνωστικά εργαστήρια. Ωστόσο, η PCR έχει ορισμένους περιορισμούς, όπως η ανάγκη για εξειδικευμένο εξοπλισμό, το κόστος σε σύγκριση με τις κλασικές (μη μοριακές) τεχνικές, η ανάγκη για επαρκές υλικό ελέγχου και ορισμένα ζητήματα που σχετίζονται με την παρουσία αναστολέων (ιδιαίτερα σημαντικά για περιβαλλοντικά και κοπρανώδη δείγματα). Οι αρνητικά φορτισμένοι αναστολείς θα μπορούσαν να συζευχθούν με το DNA και είναι πιθανό να αναστείλουν την αντίδραση PCR. Η παρουσία αναστολέων μπορεί να ελεγχθεί με τη

συμπερίληψη ενός εσωτερικού ελέγχου στο μείγμα αντίδρασης. Η εξάλειψη των αναστολέων μπορεί να είναι μια χρονοβόρα εργασία. Όπως, τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου, όπως αραίωση, προσθήκη ενισχυτών ενίσχυσης (αλβουμίνη ορού βοοειδών, θειικό νάτριο, διμεθυλοσουλφοξείδιο, γλυκερόλη, πολυβινυλοπολυπυρρολιδόνη) και υπερδιήθηση πριν από την ενίσχυση, θα μπορούσαν να επιχειρηθούν για τη μείωση των αναστολέων. Για τα δείγματα νερού, έχει αναφερθεί ότι η διήθηση με μεμβράνες εξαλείφει τις οργανικές και ανόργανες ενώσεις που μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της PCR. Η εκχύλιση του DNA απαιτείται πριν από την ενίσχυση της PCR, η οποία περιλαμβάνει την κυτταρική λύση, την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των μολυσματικών ουσιών και, τέλος, την ανάκτηση του DNA. Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα εκχύλισης που κυμαίνονται από παραδοσιακές μεθόδους, όπως η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και η βαθμίδωση πυκνότητας χλωριούχου καισίου, οι οποίες μπορεί να είναι ιδιαίτερα κοπιαστικές, χρονοβόρες, χρησιμοποιούν τοξικά αντιδραστήρια και δεν μπορούν να αυτοματοποιηθούν, έως πιο εξελιγμένες μεθόδους που περιλαμβάνουν δέσμευση του DNA σε φορέα στερεάς φάσης και επακόλουθη έκλυση με κατακρήμνιση με αιθανόλη ή ισοπροπανόλη. Η χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου DNA και της θετικά φορτισμένης επιφάνειας του φορέα και επιτρέπει τον καθαρισμό DNA υψηλού μοριακού βάρους. Διάφορα άμεσα διαθέσιμα εμπορικά κιτ για την εκχύλιση του DNA που βασίζονται στην προσρόφηση των νουκλεϊκών οξέων σε μεμβράνη πηκτής πυριτίας χρησιμοποιούνται από διαγνωστικά εργαστήρια. Προσφέρουν μια γρήγορη, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδο απομόνωσης DNA. Τα κιτ διατίθενται σε μορφή μεμονωμένου δείγματος (χαμηλή απόδοση) και σε μορφή πολλαπλών φρεατίων (υψηλή απόδοση). Επιπλέον, τα εν λόγω κιτ έχουν βελτιστοποιηθεί ανά τύπο δείγματος, μεγιστοποιώντας έτσι την απόδοση και αυξάνοντας την ποιότητα των καθαρισμένων νουκλεϊκών οξέων. Η PCR βασίζεται στην εκθετική ενίσχυση της αλληλουχίας του DNA-στόχου με τη χρήση θερμοσταθερής *Taq* DNA πολυμεράσης και ενός ζεύγους εκκινητών που συμπληρώνουν και πλαισιώνουν την περιοχή-στόχο. Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες παραλλαγές της PCR για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων διαγνωστικών και ερευνητικών ερωτημάτων, όπως η φωλιασμένη PCR, η RT-PCR, η PCR αφής και η πολλαπλή PCR, που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών μικροοργανισμών που έχουν ενδιαφέρον. Ίσως η πιο σημαντική εξέλιξη είναι η ανάπτυξη της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, που επιτρέπει όχι μόνο την αξιολόγηση του ενισχυμένου υλικού σε πραγματικό χρόνο χωρίς μετα-PCR χειρισμούς, αλλά και την ποσοτικοποίηση. Κατά τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA στο δείγμα με PCR πραγματικού χρόνου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο μέθοδοι - είτε απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός (προσδιορισμός των αριθμών αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου με τη χρήση καμπύλης βαθμονόμησης) είτε σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός (προσδιορίζεται με σύγκριση με ένα γονίδιο αναφοράς ή οικοδεσπότη). Για σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό, μπορεί να

χρησιμοποιηθεί μια πρότυπη καμπύλη ενός γονιδίου ελέγχου (βαθμονομητής)- εναλλακτικά, η ποσότητα του DNA μπορεί να προσδιοριστεί με βάση τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για να επιτευχθεί μια ένταση κατωφλίου (τιμή C_i), που ονομάζεται επίσης συγκριτική μέθοδος C_i . Ο σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός είναι ευκολότερος από τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό και γενικά επαρκεί για τους περισσότερους σκοπούς ποσοτικοποίησης. Οι μέθοδοι ανίχνευσης για την PCR πραγματικού χρόνου περιλαμβάνουν είτε μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που παρεμβάλλονται σε δίκλωνο DNA (SYBRGreen) είτε ειδικούς ανιχνευτές επισημασμένους με φθοριοφόρο (TaqMan probes, molecular beacons, FRET probes). Για αυτές τις μεθόδους, ο φθορισμός αυξάνεται με την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος PCR. Η θερμοκρασία τήξης του δίκλωνου προϊόντος PCR είναι συνάρτηση του μεγέθους του θραύσματος, της διαμόρφωσης και της περιεκτικότητας σε GC. Η χρήση του SYBRGreen επιτρέπει την κατασκευή καμπυλών τήξης, οι οποίες είναι χρήσιμες για την ανάλυση αλληλουχιών (πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου) και την ανίχνευση αναστολέων. Οι κύριοι περιορισμοί της PCR πραγματικού χρόνου είναι το υψηλό κόστος των αναλώσιμων και του εξοπλισμού, η εξάρτηση από αξιόπιστα πρότυπα. Η ποιότητα των αποτελεσμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις τεχνικές δεξιότητες καθώς και η ακρίβεια (η συνεπής διοχέτευση με πιπέτα είναι κρίσιμος παράγοντας). Επί του παρόντος, η PCR πραγματικού χρόνου δεν χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση παρασίτων, αλλά αυτό είναι πιθανό να αλλάξει όταν η μέθοδος γίνει πιο προσιτή, διότι προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την PCR (υψηλότερη ευαισθησία, μη επεξεργασία μετά την PCR, αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο και ποσοτικοποίηση του DNA). Διάφορα γονίδια έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση παρασίτων με PCR. Στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται γονίδια φύλαξης, επαναλαμβανόμενα στοιχεία και γονίδια άγνωστης λειτουργίας. Για το *Cryptosporidium*, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς οι ακόλουθοι στόχοι: 18S rDNA, εσωτερικοί μεταγραφόμενοι διαχωριστές rDNA, πρωτεΐνη τοιχώματος ωκύστης *Cryptosporidium* (COWP), διυδροφωλική αναγωγή, πρωτεΐνη προσκόλλησης που σχετίζεται με τη θρομβοσπονδίνη και πρωτεΐνη θερμικού σοκ (Hsp70). Για την *Giardia*, τα γονίδια της γλουταμινικής αφυδρογονάσης (gdh), της μικρής υπομονάδας (SSU) rDNA, της τριφωσφορικής ισομεράσης (tpi), της β-giardin και της HSP70 έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση με PCR. Για το *E. histolytica*, η ανίχνευση με PCR ενισχύει κυρίως το γονίδιο SSU rDNA- ωστόσο, τα γονίδια ιστόνης και αιμολυσίνης έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως στόχοι PCR. Επιπλέον, για την ανίχνευση του *E. histolytica* χρησιμοποιείται ο ενζυμοσυνδεδεμένος ανοσολογικός προσδιορισμός PCR-solution hybridization (PCR-SHELA) που επιτρέπει τη χρωματομετρική ανίχνευση του ενισχυμένου DNA. Η τεχνική αυτή στοχεύει σε μια εξαιρετικά επαναλαμβανόμενη ειδική αλληλουχία που προσδιορίζεται με το προφίλ ισοενζύμου και την ανάλυση κηλίδων. Για τα σπόρια *Microsporidia* (*E. bienersi*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*) και *C. cayetanensis*, η ανίχνευση με PCR βασίζεται στην ενίσχυση ειδικών αλληλουχιών του

γονιδίου 18S rDNA. Η ανίχνευση με PCR του *T. gondii* στοχεύει είτε σε πολύ επαναλαμβανόμενες ειδικές αλληλουχίες (γονίδιο B1 και θραύσμα 529 bp άγνωστης λειτουργίας) είτε σε γονίδια με ένα αντίγραφο (οικογένειες πρωτεϊνών SAG και GRA των σποροζωιτών και των ταχυζωιτών). Κατά την επιλογή στόχων PCR, προτιμώνται συνήθως γονίδια πολλαπλών αντιγράφων λόγω αυξημένης ευαισθησίας, ιδίως όταν εξετάζονται δείγματα που περιέχουν χαμηλή συγκέντρωση γενετικού υλικού.

Η ανάπτυξη και η επικύρωση της πολυπλεξίας PCR και της πολυπλεξίας PCR πραγματικού χρόνου αποτέλεσαν στόχους διαφόρων ερευνητικών δημοσιεύσεων λόγω των χρονικών περιορισμών και των σύντομων χρόνων απόκρισης που απαιτούν οι σημερινές διαγνωστικές διαδικασίες. Αυτές στοχεύουν συνήθως σε ιατρικά σημαντικά παράσιτα, τα οποία είναι πιθανό να υπάρχουν σε παρόμοιες θέσεις. Η πολλαπλή PCR πραγματικού χρόνου έχει γίνει όλο και πιο δημοφιλής για την ανίχνευση εντερικών παρασίτων επειδή προσφέρει μειωμένο κόστος και επιτρέπει τη γρήγορη ταυτοποίηση με εξαιρετικά καλή ευαισθησία και ειδικότητα. Έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς μια multiplex PCR πραγματικού χρόνου που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση των *C. parvum*, *G. duodenalis*, *E. histolytica* και *E. dispar*, ενώ άλλοι ερευνητές επικεντρώθηκαν μόνο στην ανίχνευση του *Cryptosporidium* και του *Giardia*. Μπορούν να προστεθούν ειδικοί εκκινητές και ανιχνευτές για την επέκταση της ανίχνευσης σε άλλα παράσιτα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. (M Bouzid, 2014)

Ανάλυση αλληλουχίας DNA

Η διαφοροποίηση της αλληλουχίας του DNA έχει αξιοποιηθεί για τη διάκριση μεταξύ ειδών και απομονώσεων. Έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές όπως η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA, η ανάλυση ισοενζύμων, η ανάλυση μεγέθους θραυσμάτων και ο πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού. Στη συνέχεια, η αλληλουχία του DNA έγινε μια κοινή και προσιτή τεχνική, επιτρέποντας έτσι τον ολοκληρωμένο και συστηματικό χαρακτηρισμό του γονιδιωματικού υλικού. Αρκετές γονιδιωματικές περιοχές έχουν αποτελέσει στόχο, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων οικιακής φύλαξης και των ιδιαίτερα πολυμορφικών γονιδίων. Η ανάλυση της αλληλουχίας έχει γίνει κυρίως για φυλογενετικές εφαρμογές. Ωστόσο, σύντομα έγινε σαφές ότι η τυποποίηση στελεχών μπορεί να αξιοποιηθεί για πολλές άλλες εφαρμογές, όπως ο εντοπισμός πηγών, η κλινική εκδήλωση, οι αναλύσεις ιογένεσης και η δομή του πληθυσμού. Επιπλέον, η τυποποίηση ανθρώπινων μολυσματικών στελεχών επέτρεψε την ανάδειξη των γονότυπων ή υποτύπων που

έχουν σημασία για τη δημόσια υγεία. Καθώς διατίθενται περισσότερα δεδομένα τυποποίησης, η κατανόηση της βιολογίας, της επιδημιολογίας, της παθολογίας, της μολυσματικότητας και της εξέλιξης του παρασίτου είναι πιθανό να βελτιωθεί. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η εκτεταμένη υποτυποποίηση κλινικών απομονωμένων στελεχών ανθρώπινων μολυσματικών στελεχών *Cryptosporidium*, με βάση την ανάλυση αλληλουχίας του εξαιρετικά μεταβλητού γονιδίου GP60, δημιουργώντας έτσι μια παγκόσμια χαρτογράφηση της κατανομής των υποτύπων. Επιπλέον, ορισμένοι υπότυποι GP60 έχουν συνδεθεί με κλινικές εκδηλώσεις και, επομένως, με την ιωτικότητα. Η παγίδα της εκτεταμένης τυποποίησης, ωστόσο, είναι η δημιουργία μεγάλου όγκου δεδομένων που ενδέχεται να μην είναι χρήσιμα από βιολογική άποψη. Η αξιοποίηση γονιδίων που βρίσκονται υπό επιλεκτική πίεση (μικροσατελίτες, γονίδια ενδεχόμενης επιλογής) για την τυποποίηση έχει συζητηθεί, διότι μπορεί να μην αντικατοπτρίζει απαραίτητα την απόκλιση αλληλουχιών σε άλλες γονιδιωματικές περιοχές. Συνιστάται η χρήση ανάλυσης αλληλουχίας πολλαπλών τόπων για την κάλυψη μεγαλύτερης απόκλισης των γονιδιωματικών αλληλουχιών. (M Bouzid, 2014)

Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση και διαλογή μεμονωμένων σωματιδίων με βάση τα φυσικά χαρακτηριστικά τους, αιωρώντας τα σε ρεύμα υγρού που διέρχεται από δέσμη φωτός. Το κύριο πλεονέκτημα της κυτταρομετρίας ροής είναι η δυνατότητα εξέτασης μεγάλου αριθμού σωματιδίων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, η ικανότητα κυτταρικής διαλογής επιτρέπει το διαχωρισμό μεμονωμένων κυττάρων (ή ομάδας κυττάρων) από έναν μικτό πληθυσμό. Στα μειονεκτήματα της τεχνικής περιλαμβάνονται το υψηλό κόστος, ο ειδικός εξοπλισμός, η βελτιστοποίηση και τα ζητήματα βαθμονόμησης. Παρ' όλα αυτά, η κυτταρομετρία ροής έχει πολλές εφαρμογές στη διάγνωση, τα φαρμακευτικά προϊόντα, την κυτταρική βιολογία, την αναπαραγωγική ιατρική και την έρευνα. Για να αντικατοπτρίζεται αυτή η δημοτικότητα, έχουν αναπτυχθεί και επικυρωθεί δοκιμασίες κυτταρομετρίας ροής για την ανίχνευση παρασίτων. Για παράδειγμα, μια μέθοδος για την ανίχνευση *Cryptosporidium* και *Giardia* από δείγματα νερού που βασίζεται στη συγκέντρωση κροκίδωσης ακολουθούμενη από κυτταρομετρία ροής αναπτύχθηκε από τον Vesey το 1994 και αποδείχθηκε ότι είναι πιο ευαίσθητη και λιγότερο χρονοβόρα από τη μικροσκοπία φθορισμού. Παρά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, η κυτταρομετρία ροής δεν χρησιμοποιείται συχνά στα διαγνωστικά εργαστήρια, πιθανότατα επειδή οι εναλλακτικές τεχνικές ανίχνευσης θεωρούνται πιο πρακτικές. (M Bouzid, 2014)

Νέες τεχνικές

Μικροσυστοιχίες

Οι μικροσυστοιχίες DNA (επίσης γνωστές ως τσιπ DNA) αποτελούνται από σημεία cDNA ή ολιγονουκλεοτιδίων που είναι προσαρτημένα σε ένα φορέα, είτε σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου είτε σε τσιπ πυριτίου. Αυτά τα τμήματα DNA είναι ανιχνευτές με τους οποίους ο στόχος θα υβριδοποιηθεί ειδικά. Ο σύνθετος ανιχνευτής-στόχος ανιχνεύεται στη συνέχεια παρουσία ενός φθοριοφόρου και το φθορίζον σήμα ψηφιοποιείται για ποσοτική ανάλυση. Συνήθως, τα δείγματα ενισχύονται με PCR πριν από τον υβριδισμό για να αυξηθεί η ευαισθησία. Επιπλέον, το στάδιο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη σήμανση του γονιδιωματικού DNA με τη συμπερίληψη φθορίζοντος επισημασμένου εκκινητή ή νουκλεοτιδίων. Τα κύρια μειονεκτήματα των μικροσυστοιχιών συνδέονται με την κατασκευή των συστοιχιών, τον εξειδικευμένο εξοπλισμό, το σχετικό κόστος και την επεξεργασία των δεδομένων. Παρ' όλα αυτά, η τεχνική των μικροσυστοιχιών θεωρείται ότι βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο αλλά με τεράστιες δυνατότητες. Οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων χρησιμοποιήθηκαν από τον Wang και τους συνεργάτες του (2004) για την ανίχνευση των *C. parvum*, *C. hominis*, *G. duodenalis* (ομάδες A, B και C), *E. histolytica* και *E. dispar*. Για κάθε είδος ή σύνολο, χρησιμοποιήθηκε μια ομάδα εκκινητών και τα προφίλ υβριδισμού χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των δειγμάτων. Ομοίως, έχουν αναπτυχθεί μικροσυστοιχίες για την ανίχνευση του *Cryptosporidium*, του *Giardia*, του *Entamoeba* και άλλων εντεροβακτηρίων. Οι μόνοι παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των συμπεριληφθέντων ειδών είναι το ενδιαφέρον του ερευνητή καθώς και οι υλικοτεχνικοί και πειραματικοί περιορισμοί. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε από τον Liu και τους συνεργάτες του μια κάρτα TaqMan array (384 φρεατίων single-plex real-time PCR) για την ταυτόχρονη ανίχνευση 19 παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων ιών, βακτηρίων, πρωτόζωων και ελμινθίων. Τα πρωτόζωα που συμπεριλήφθηκαν ήταν τα *Cryptosporidium*, *G. duodenalis* και *E. histolytica*, για τα οποία ενισχύθηκε το DNA με τη χρήση ειδικών εκκινητών και ανιχνευτών 18S. Η κάρτα συστοιχίας έδειξε ευαισθησία 85% και ειδικότητα 77% σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Αν και τα χαρακτηριστικά αυτά δεν είναι βέλτιστα, η τεχνική προσφέρει γρήγορη, ακριβή και ποσοτική ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος εντερικών παθογόνων. (M Bouzid, 2014)

Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές που συνδυάζουν μια βιολογική ένωση, ένα βιολογικά παραγόμενο υλικό (ένζυμο, αντίσωμα, νουκλεϊκό οξύ) ή βιομιμητικό που αλληλεπιδρά με τον αναλύτη και ένα σύστημα φυσικοχημικού μετατροπέα, επιτρέποντας την ανίχνευση μιας μεγάλης ποικιλίας αναλυτών. Το σύστημα μετατροπής καθορίζει τον τύπο του βιοαισθητήρα (οπτικός, ηλεκτροχημικός, μηχανικός, πιεζοηλεκτρικός) και μετατρέπει το σήμα που προκύπτει από την αλληλεπίδραση του αναλύτη με τη βιολογική ένωση σε άλλο σήμα, το οποίο στη συνέχεια επεξεργάζεται από τη συσκευή ανάγνωσης βιοαισθητήρων. Οι βιοαισθητήρες επιτρέπουν την εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση του εξεταζόμενου δείγματος σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται ευρέως στον ιατρικό, περιβαλλοντικό, τοξικολογικό και βιομηχανικό τομέα. Η χρήση βιοαισθητήρων για την ανίχνευση παρασίτων είναι ενδιαφέρουσα λόγω των χαρακτηριστικών της ανάλυσης. Έχουν αναπτυχθεί ηλεκτροχημικοί, πιεζοηλεκτρικοί και οπτικών ινών βιοαισθητήρες για την ανίχνευση του *Cryptosporidium*. Η απόδοση αυτών των βιοαισθητήρων φαίνεται να βελτιώνεται με τις νεότερες εκδόσεις (από 10^5 ωοκύστες ανά ml σε 1 ωοκύστη ανά ml). Ένας αυτοματοποιημένος φορητός βιοαισθητήρας οπτικών ινών (RAPTOR) για την ανίχνευση του *Giardia* έχει αναπτυχθεί και αποτελεί πολύτιμη συσκευή ελέγχου. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια πλατφόρμα βιοαισθητήρων πολλαπλών αναλύσεων με βάση το διασταυρωμένο πολυδιακετυλένιο για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *C. parvum*, *G. duodenalis*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* και *E. intestinalis*. Το όριο ανίχνευσης είναι 100 μικρόβια ανά ml, ωστόσο, τα πρώτα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά. Οι κύριοι περιορισμοί της χρήσης μικροσυστοιχιών και βιοαισθητήρων για την ανίχνευση παρασίτων από περιβαλλοντικά δείγματα συνδέονται με τη χαμηλή συγκέντρωση παθογόνων, την παρουσία οργανικών και ανόργανων ενώσεων που μπορούν να δράσουν ως αναστολείς, αυξάνοντας έτσι το όριο ανίχνευσης. Αυτοί οι περιορισμοί, ωστόσο, μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση μεθόδων συγκέντρωσης και καθαρισμού του δείγματος πριν από τη δοκιμή. (M Bouzid, 2014)

Φασματομετρία μάζας

Πολλές διαγνωστικές πρωτεΐνες έχουν βρεθεί χάρη στον αυξανόμενο όγκο δεδομένων που έχουν παραχθεί από την πρωτεωμική και τη μεταβολωμική. Η φασματομετρία μάζας με ιονισμό ιονισμού εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενης μήτρας (MALDI-TOF) χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για

την υψηλής απόδοσης, εξαιρετικά γρήγορη, πολύ ειδική, συνεπή και ακριβή ανίχνευση τέτοιων διαγνωστικών πρωτεϊνών. Αυτή η υψηλή απόδοση ενθάρρυνε χρήστες να αναφέρουν ότι το MALDI-TOF θα έφερνε επανάσταση στη μικροβιολογική διάγνωση. Ωστόσο, η τεχνική αυτή έχει περιορισμούς, όπως το υψηλό κόστος εξοπλισμού και συντήρησης και, το σημαντικότερο, η εξάρτηση από τον προηγούμενο χαρακτηρισμό (χαρακτηριστικά φασματομετρίας μάζας) των διαγνωστικών βιοδεικτών. Έχουν περιγραφεί δοκιμασίες MALDI-TOF για την ανίχνευση *Cryptosporidium*, *Giardia*, *E. histolytica* και *Microsporidia* (*E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*), αλλά βρίσκονται κυρίως σε φάση διερεύνησης με στόχο τον εντοπισμό μοναδικών φασματικών αποτυπωμάτων μάζας. (M Bouzid, 2014)

Συλλογή συνθετικού πολυμερούς

Τα συνθετικά πολυμερή είναι άμεσα διαθέσιμα και χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές πτυχές της καθημερινής μας ζωής. Με βάση την επιφανειακή πρωτεϊνική και υδατανθρακική δομή του παρασίτου που εξετάζεται, τα συνθετικά πολυμερή μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να επιτρέπουν συγκεκριμένη αλληλεπίδραση, δέσμευση και σύλληψη. Αυτή η τεχνολογία προσφέρει μεγάλη ευελιξία λόγω του πλήθους των διαθέσιμων πολυμερών. Παρά τις μεγάλες δυνατότητες, η τεχνική αυτή βρίσκεται ακόμη σε φάση ανάπτυξης. Δύο ξεχωριστές μελέτες από την ίδια ερευνητική ομάδα έχουν αναφέρει τη βελτιστοποίηση της αλληλεπίδρασης των *C. parvum* και *G. duodenalis* με μια πληθώρα συνθετικών πολυμερών σε μορφή μικροσυστοιχίας. Τα ευρήματα αυτά παρέχουν ένα χρήσιμο βήμα προς την ενσωμάτωση συνθετικών πολυμερών σε μεθοδολογίες ανίχνευσης παρασίτων. (M Bouzid, 2014)

Νανοτεχνολογίες

Η νανοτεχνολογία ορίζεται ως η υποβάθμιση των λειτουργικών συστημάτων σε μοριακή κλίμακα. Θεωρείται ένας τομέας με μεγάλες δυνατότητες στη διάγνωση λόγω της έννοιας του εργαστηρίου σε ένα τσιπ (LOC). Τα πλεονεκτήματα του LOC περιλαμβάνουν χαμηλό κόστος, χαμηλό όγκο αντιδράσεων, χαμηλό κόστος, στιβαρότητα και γρήγορη ανάλυση. Η μικρή κλίμακα, ωστόσο, μπορεί να οδηγήσει σε ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η ενισχυμένη επίδραση των φυσικοχημικών δυνάμεων σε μικροσκοπικό φορέα, χαμηλό signal-to-noise ratio, η ανακρίβεια, και όπως ορισμένες από τις άλλες αναδυόμενες τεχνικές, η LOC δεν έχει ακόμη αναπτυχθεί και επικυρωθεί πλήρως. Η

LOC για την ανίχνευση τροφιμογενών βακτηρίων (*E. coli* O157:H7 και *S. typhimurium*) έχει αναπτυχθεί, και η LOC για την ανίχνευση υδατογενών και τροφιμογενών παρασίτων είναι πιθανό να αναπτυχθεί σύντομα. (M Bouzid, 2014)

Ανίχνευση στο νερό

Επειδή τα παράσιτα είναι συχνά εμφανή σε πολύ μικρούς αριθμούς σε δείγματα νερού, το θεμελιώδες πρόβλημα είναι ότι η επαρκής ταυτοποίηση μπορεί να απαιτεί την εξέταση μεγάλων ποσοτήτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους παρόχους νερού, οι οποίοι πρέπει να διασφαλίζουν ότι τα βακτηριακά και παρασιτικά φορτία παρακολουθούνται τακτικά και βρίσκονται σε επίπεδα ασφαλή για κατανάλωση από τους ανθρώπους. Δεν υπάρχει συμφωνημένη ποσότητα νερού που πρέπει να συλλέγεται- αντίθετα, διάφοροι οργανισμοί ή μελέτες χρησιμοποιούν διαφορετικές ποσότητες. Ο όγκος καθορίζεται κατά κάποιο τρόπο κατά βούληση σε συνάρτηση με τις συνήθεις πρακτικές και τη σκοπιμότητα, αλλά γενικά θα περιλαμβάνει είτε δειγματοληψία μεγάλου όγκου (100-1000 l) για μια χρονική περίοδο με καθορισμένο ρυθμό ροής είτε δειγματοληψία μικρού όγκου (10-20 l) που θα μπορούσε να επαναληφθεί αρκετές φορές για τη δημιουργία ενός σύνθετου δείγματος. Ένα στάδιο συγκέντρωσης ακολουθεί συνήθως τη δειγματοληψία. Οι κύριες μέθοδοι συγκέντρωσης που χρησιμοποιούνται είναι η καθίζηση, η φυγοκέντρηση και η διήθηση. Η καθίζηση βασίζεται στο χαρακτηριστικό ενός σωματιδίου να διαχωρίζεται από το υγρό σε διάλυμα υπό την επίδραση της βαρύτητας του βάρους του και χρησιμοποιείται συχνά ως διαδικασία φυσικής επεξεργασίας για πόσιμα και υγρά απόβλητα. Η κροκιδώση είναι μια τεχνική καθίζησης που χρησιμοποιεί έναν παράγοντα διαύγασης (κροκιδωτικό) και ένα ρυθμισμένο pH για την επιτάχυνση της διαδικασίας καθίζησης. Οι δοκιμές σχετικά με τη συγκέντρωση παρασίτων σε διάφορα κροκιδωτικά αποκάλυψαν ότι το ανθρακικό ασβέστιο είχε τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης για τις κύστες *Giardia* και τις ωοκύστες *Cryptosporidium*. Η φυγοκέντρηση χρησιμοποιείται επίσης για τη συγκέντρωση παρασίτων- ωστόσο, η ταχύτητα, ο όγκος και ο χρόνος πρέπει να προσαρμόζονται και να καθορίζονται για κάθε είδος παρασίτου. Η τεχνική αυτή δεν είναι κατάλληλη για επεξεργασία μεγάλου όγκου- ως εκ τούτου, η φυγοκέντρηση συνεχούς ροής έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται για τη φυγοκέντρηση του νερού χωρίς διακοπή έως ότου ο όγκος του σφαιριδίου υπερβεί τη χωρητικότητα του ρότορα. Ωστόσο, επειδή απαιτεί χαμηλό ρυθμό ροής για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των σωματιδίων, θεωρείται χρονοβόρα μέθοδος, για αυτό δε χρησιμοποιείται συχνά. Τόσο οι τεχνικές καθίζησης όσο και οι τεχνικές φυγοκέντρωσης επιτρέπουν τον καθαρισμό των δειγμάτων καθώς και τη

συγκέντρωσή τους. Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής εξαρτάται από τη σύνθεση του νερού, όπως η παρουσία ορυκτών, χουμικών οξέων, οργανικών υλικών και ελεύθερων ζωντανών οργανισμών. Η τρίτη μέθοδος συγκέντρωσης είναι η διήθηση, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως λόγω των υψηλότερων ποσοστών ανάκτησης. Υπάρχουν δύο παραλλαγές: η διήθηση με μεμβράνη και η διήθηση με φυσίγγιο. Για τη διήθηση με μεμβράνη, το νερό αντλείται μέσω μιας επίπεδης μεμβράνης που συγκρατεί κύστες, ωοκύστες και σωματίδια παρόμοιου ή μεγαλύτερου μεγέθους. Διάφορα υλικά μεμβρανών είναι διαθέσιμα, με την οξική κυτταρίνη και το πολυκαρβονικό να είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα. Μετά τη διήθηση, το παγιδευμένο υλικό ανακτάται με απόξεση και έκλυση και στη συνέχεια μπορεί να συμπυκνωθεί με φυγοκέντρηση. Ο περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι η τάση της μεμβράνης να φράζει όταν γίνεται επεξεργασία νερού με υψηλή αναταραχή. Η τεχνική διήθησης με μεμβράνες διασταυρούμενης ροής έχει αναπτυχθεί για την ελαχιστοποίηση της συσσώρευσης ρύπων και έχει δείξει καλά ποσοστά ανάκτησης για το *Cryptosporidium* και το *Giardia*. Για την τεχνική αυτή, το δείγμα νερού (που ονομάζεται επίσης εισερχόμενο ρεύμα τροφοδοσίας) διέρχεται εφαπτομενικά από την επιφάνεια της μεμβράνης. Τα σωματίδια παγιδεύονται στο φίλτρο (ρεύμα retentate), ενώ το υπόλοιπο υγρό δείγμα διέρχεται από τη μεμβράνη (ρεύμα permeate). Κατά τη διήθηση με μεμβράνες διασταυρούμενης ροής, το φίλτρο ξεπλένεται συνεχώς με το εισερχόμενο ρεύμα, γεγονός που αυξάνει τη διάρκεια χρήσης του και καθιστά την τεχνική πιο οικονομική. Η διήθηση με φυσίγγια έχει αντικαταστήσει τη διήθηση με μεμβράνες και επιτρέπει τη διήθηση μεγάλων όγκων νερού (100-1000 l) με υψηλό ρυθμό ροής (1-5 l min⁻¹). Για τη μέθοδο αυτή έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία τόσο υψηλά όσο και χαμηλά ποσοστά ανάκτησης (1-30% και 75%, αντίστοιχα)- ωστόσο, αυτό φαίνεται να εξαρτάται από την ποιότητα του νερού και τη συγκέντρωση των παρασίτων. Ωστόσο, η θολερότητα του νερού παραμένει ο κύριος περιορισμός αυτής της τεχνικής. Επί του παρόντος, η διήθηση με φυσίγγιο αποτελεί μέρος της τυποποιημένης μεθόδου 1623 της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (US EPA) για την ανίχνευση του *Cryptosporidium* και του *Giardia* από δείγματα νερού. (M Bouzid, 2014)

Μετά τη συμπύκνωση, τα δείγματα υποβάλλονται σε καθαρισμό για την εξάλειψη των σωματιδίων που έχουν συμπυκνωθεί λόγω των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών. Οι μέθοδοι διαχωρισμού με διαβάθμιση πυκνότητας χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό συμπυκνωμένων δειγμάτων νερού, βασιζόμενες στις διαφορετικές πυκνότητες μεταξύ του παρασίτου και άλλων σωματιδίων. Διάφορα διαλύματα έχουν χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό με κλίση: σακχαρόζη, χλωριούχο νάτριο, χλωριούχο καίσιο (CsCl), βρωμιούχο κάλιο, θειικός ψευδάργυρος και percoll. Το διάλυμα διαχωρισμού χρησιμοποιείται σε προκαθορισμένη συγκέντρωση για βέλτιστο διαχωρισμό. Εναλλακτικά, μια βαθμίδα μπορεί να δημιουργηθεί με τη δημιουργία διαλυμάτων φθίνουσας

βαρύτητας, τα οποία συμπληρώνονται με το εναιώρημα των παρασίτων - η τεχνική αυτή ονομάζεται φυγοκέντρηση ασυνεχούς βαθμίδας. Μετά τη φυγοκέντρηση, τα παράσιτα σχηματίζουν μια διαφανή ζώνη που τα διαχωρίζει από βαρύτερους και ελαφρύτερους ρύπους. Για παράδειγμα, οι ωοκύστες του *C. parvum* μπορούν να καθαριστούν χρησιμοποιώντας μια ασυνεχή διαβάθμιση CsCl, που κυμαίνεται από 1,05 έως 1,4 g ml⁻¹, μετά από φυγοκέντρηση στα 10 000 g για 15 λεπτά, οι ωοκύστες σχηματίζουν μια ζώνη στη διεπιφάνεια 1,05-1,1 g ml⁻¹. Ο περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι ότι μπορούν να καθαριστούν μόνο μικροί όγκοι παρασίτων. Επιπλέον, η πυκνότητα των παρασίτων εξαρτάται άμεσα από τη βιωσιμότητα και την ποιότητα των οωκύστεων. Επιπλέον, η χρήση διαλυμάτων καθαρισμού θα μπορούσε να οδηγήσει σε απώλεια βιωσιμότητας, περιορίζοντας ενδεχομένως τις επακόλουθες αναλύσεις. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αναφερθεί ότι η φυγοκέντρηση με πυκνότητα σακχαρόζης επιτρέπει τον επιλεκτικό καθαρισμό των βιώσιμων και άθικτων ωοκύστεων του *Cryptosporidium*. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της ανάκτησης φαίνεται να μειώνεται δραματικά μετά από 48 ώρες επώασης με διάλυμα σακχαρόζης, πιθανότατα λόγω απώλειας της βιωσιμότητας. Πρόσφατα, η τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (IMS) χρησιμοποιήθηκε ευρέως για τον καθαρισμό παρασίτων λόγω της υψηλής εξειδίκευσης, της ευκολίας χρήσης και των υψηλών ποσοστών ανάκτησης. Η IMS βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων (που στρέφονται κατά επιφανειακών πρωτεϊνών) συνδεδεμένων με μαγνητικά σωματίδια για τη σύλληψη των παρασίτων στο δείγμα και στη συνέχεια την απομόνωσή τους με τη χρήση μαγνήτη. Η επιλογή του αντισώματος είναι καθοριστικής σημασίας για την απόδοση της IMS, με ιδιαίτερη σημασία για την εξειδίκευση και τη συγγένεια. Τα αντισώματα υψηλής συγγένειας μπορεί να είναι δύσκολο να διαχωριστούν από το παράσιτο, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της ανάκτησης. Όπως και άλλες μέθοδοι συγκέντρωσης και καθαρισμού, η IMS επηρεάζεται από τη θολερότητα του νερού. Αν και η υψηλότερη θολερότητα φαίνεται να μειώνει την αποτελεσματικότητα άλλων μεθόδων, έχει αναφερθεί ότι η μέτρια θολερότητα μπορεί να αυξήσει τα ποσοστά ανάκτησης IMS. Ωστόσο, άλλοι παράγοντες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα ποσοστά ανάκτησης, συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών του δείγματος νερού, της μεθοδολογίας και του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού. Η IMS αποτελεί επί του παρόντος μέρος της τυποποιημένης μεθόδου (US EPA) 1623 για την ανίχνευση *Cryptosporidium* και *Giardia*. (M Bouzid, 2014)

Μετά τη συμπύκνωση, τα δείγματα υποβάλλονται σε καθαρισμό για την εξάλειψη των σωματιδίων που έχουν συμπολλαπλασιαστεί λόγω των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών. Οι μέθοδοι διαχωρισμού με διαβάθμιση πυκνότητας χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό συμπυκνωμένων δειγμάτων νερού, βασιζόμενες στις διαφορετικές πυκνότητες μεταξύ του παρασίτου και άλλων σωματιδίων. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα διαλύματα για τον διαχωρισμό με κλίση:

Χλωριούχο καίσιο (CsCl), βρωμιούχο κάλιο, θειικός ψευδάργυρος και percoll. Το διάλυμα διαχωρισμού χρησιμοποιείται σε προκαθορισμένη συγκέντρωση για βέλτιστο διαχωρισμό. Εναλλακτικά, μια βαθμίδα μπορεί να δημιουργηθεί με τη διαστρωμάτωση διαλυμάτων φθίνουσας βαρύτητας, τα οποία συμπληρώνονται με το εναιώρημα των παρασίτων - η τεχνική αυτή ονομάζεται φυγοκέντρωση ασυνεχούς βαθμίδας. Μετά τη φυγοκέντρωση, τα παράσιτα σχηματίζουν μια διαφανή ζώνη που τα διαχωρίζει από βαρύτερους και ελαφρύτερους ρύπους. Για παράδειγμα, οι ωκύστες του *C. parvum* μπορούν να καθαριστούν χρησιμοποιώντας μια ασυνεχή κλίση CsCl, που κυμαίνονται από 1,05 έως 1,4 g ml⁻¹, μετά από φυγοκέντρωση στα 10 000 g για 15 λεπτά, οι ωκύστες σχηματίζουν μια ζώνη στη διαχωριστική επιφάνεια 1,05-1,1 g ml⁻¹. Ο περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι ότι μπορούν να προσδιοριστούν μόνο μικροί όγκοι παρασίτων. Επιπλέον, η πυκνότητα των παρασίτων εξαρτάται άμεσα από τη βιωσιμότητα και την ποιότητα των οωκύστεων. Επιπλέον, η χρήση διαλυμάτων καθορισμού θα μπορούσε να οδηγήσει σε απώλεια βιωσιμότητας, περιορίζοντας ενδεχομένως τις επακόλουθες αναλύσεις. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αναφερθεί ότι η φυγοκέντρωση με πυκνότητα σακχαρόζης επιτρέπει τον επιλεκτικό καθορισμό βιώσιμων και άθικτων ωοκύστεων *Cryptosporidium*. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της ανάκτησης φαίνεται να μειώνεται δραματικά μετά από 48 ώρες επώασης με διάλυμα σακχαρόζης, πιθανότατα λόγω απώλειας της βιωσιμότητας. Πρόσφατα, η τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (IMS) χρησιμοποιήθηκε ευρέως για τον προσδιορισμό παρασίτων λόγω της υψηλής ειδικότητας, της ευκολίας χρήσης και των υψηλών ποσοστών ανάκτησης. Η IMS βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων (που στρέφονται κατά επιφανειακών πρωτεϊνών) συνδεδεμένων με μαγνητικά σωματίδια για τη συγκράτηση των παρασίτων στο δείγμα και στη συνέχεια την απομόνωσή τους με τη χρήση μαγνήτη. Η επιλογή του αντισώματος έχει καθοριστικό ρόλο για την απόδοση της IMS, με ιδιαίτερη σημασία την ειδικότητα και τη συγγένεια. Τα αντισώματα υψηλής συγγένειας μπορεί να είναι δύσκολο να διαχωριστούν από το παράσιτο, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης. Όπως και άλλες μέθοδοι συγκέντρωσης και καθορισμού, η IMS επηρεάζεται από τη θολερότητα του νερού. Αν και η μεγαλύτερη θολερότητα φαίνεται να μειώνει την αποτελεσματικότητα άλλων μεθόδων, έχει διαπιστωθεί ότι η μέτρια θολερότητα μπορεί να αυξήσει τα ποσοστά ανάκτησης IMS. Ωστόσο, άλλοι παράγοντες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα ποσοστά ανάκτησης, συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών του δείγματος νερού, της μεθοδολογίας και του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού. Το IMS αποτελεί επί του παρόντος μέρος της τυποποιημένης μεθόδου 1623 της US EPA για την ανίχνευση *Cryptosporidium* και *Giardia*. (M Bouzid, 2014)

Ανίχνευση στα τρόφιμα

Τα παράσιτα μπορούν να μολύνουν τα τρόφιμα σε διάφορα στάδια της παραγωγής. Τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (δηλαδή τα φρούτα και τα λαχανικά) συνδέονται με υψηλό κίνδυνο μόλυνσης του ανθρώπου. Όπως και για άλλους τύπους δειγμάτων, τα τρόφιμα υποβάλλονται σε προπαρασκευαστικά στάδια πριν από την ανίχνευση, συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης, της συγκέντρωσης και του καθαρισμού. Η αφαίρεση των παρασίτων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μέσω ενός απλού πλυσίματος των φρούτων και των λαχανικών. Τα τρόφιμα αυτά θα μπορούσαν στη συνέχεια να συμπυκνωθούν με φυγοκέντρωση για να διαχωριστούν τα παράσιτα. Άλλα πρωτόκολλα περιλαμβάνουν πιο αυστηρές μεθόδους εκχύλισης, όπως η χρήση εκχυλιστικών διαλυμάτων (ήπια ρυθμιστικά και απορρυπαντικά) σε συνδυασμό με μηχανικές διεργασίες, όπως το στομάχισημα, η παλμοποίηση, η ανακίνηση και το κύλισμα. Μετά τη φυγοκέντρωση, τα συμπυκνωμένα παράσιτα μπορούν να προσδιοριστούν με IMS. Επειδή δεν υπάρχει τυποποιημένη μέθοδος για την ανίχνευση παρασίτων από τρόφιμα, στη βιβλιογραφία διατίθενται διάφορες βελτιστοποιημένες τεχνικές που προέρχονται από τυποποιημένες μεθόδους για την ανίχνευση παρασίτων σε δείγματα νερού. Μια τέτοια μελέτη εξέτασε την επίδραση διαφόρων μεθόδων εκχύλισης και καθαρισμού στην αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των ωοκύστεων του *C. parvum* από τρόφιμα που σχετίζονται με υψηλό γαστρεντερικό κίνδυνο (σμέουρα και μαρούλι). Τα αποτελέσματα της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό μιας βελτιστοποιημένης τεχνικής, η οποία δοκιμάστηκε με τη διεξαγωγή μιας διεργαστηριακής δοκιμής στο Ηνωμένο Βασίλειο. Η βελτιστοποιημένη μέθοδος αποτελείται από την εκχύλιση των ωοκύστεων του *C. parvum* με στομάχιση σε διάλυμα γλυκίνης 1 M, την ανάκτηση των ωοκύστεων με IMS, την επισημάνση με ανοσοφθορισμό με τη χρήση εμπορικού αντισώματος (Crypt-a-glo) και τη μικροσκοπική εξέταση. Η τεχνική έδειξε 89% ευαισθησία και 85% ειδικότητα για την ανίχνευση από μαρούλι, και 95% ευαισθησία και 83% ειδικότητα για την ανίχνευση από βατόμουρα. (M Bouzid, 2014)

Κλινικά δείγματα

Επειδή τα περισσότερα από αυτά τα παράσιτα προκαλούν γαστρεντερικά συμπτώματα, το κύριο κλινικό δείγμα που υποβάλλεται για ανάλυση είναι τα κόπρανα. Αυτό το δείγμα είναι, σύμφωνα με πληροφορίες, δύσκολο να εξεταστεί λόγω του υψηλού επιπέδου των μολυσματικών και ανασταλτικών ουσιών. Τα δείγματα κοπράνων δεν απαιτούν συμπύκνωση πριν από την εξέταση,

επειδή συνήθως περιέχουν υψηλό φορτίο παρασίτων. Παρόλα αυτά, μπορεί να απαιτείται καθαρισμός, ανάλογα με την επόμενη διαγνωστική τεχνική. (M Bouzid, 2014)

Μέθοδοι ανίχνευσης παρασίτων σε ορισμένα τρόφιμα

Μέθοδοι ανίχνευσης στα τρόφιμα (*Cryptosporidium*)

Οι πιο ευαίσθητες μέθοδοι για την ανίχνευση του *Cryptosporidium* στα τρόφιμα βασίζονται: 1) στον διαχωρισμό των ωοκυστών από τη μήτρα του δείγματος με μέθοδο που ελαχιστοποιεί τη συγκέντρωση των υπολειμμάτων (π.χ. επίπλευση ή ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (IMS)) και 2) στην ανίχνευση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (IFM). Άλλες πολλά υποσχόμενες μέθοδοι συγκέντρωσης ωοκύστεων περιλαμβάνουν τη μικροδιήθηση, αλλά μπορεί να απαιτείται κάποια προπαρασκευή για να μειωθεί η απόφραξη του φίλτρου. Μόνο η IMS-IFM έχει επικυρωθεί σε δοκιμές δακτυλίου και τότε μόνο για το μαρούλι iceberg και τα σμέουρα (Cook et al., 2006; Utaaker et al., 2017). Αυτό αποτελεί τη βάση της μόνης σχετικής πρότυπης μεθόδου, του ISO 18744 "Μικροβιολογία της τροφικής αλυσίδας - Ανίχνευση και απαρίθμηση του *Cryptosporidium* και του *Giardia* σε φρέσκα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και φρούτα μούρων".

Τα σχετικά εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια IMS και IFM είναι σε μεγάλο βαθμό ειδικά για τη σύλληψη και την ανίχνευση των ωοκύστεων του *Cryptosporidium* spp. Ωστόσο, οι αναλυτές πρέπει να γνωρίζουν ότι μπορεί να προκύψουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα γένη και να διασφαλίζουν ότι εφαρμόζονται μέτρα για την επιβεβαίωση των ωοκύστεων *Cryptosporidium*, με την απεικόνιση επιβεβαιωτικών εσωτερικών δομών. Ο IFM εξαρτάται από την εμπειρία και την εξειδίκευση των αναλυτών για την ορθή ταυτοποίηση των ωοκύστεων του *Cryptosporidium*. Εν απουσία επιβεβαίωσης, θα πρέπει να αναφέρονται μόνο "σώματα που μοιάζουν με ωοκύστες *Cryptosporidium*" ή "πιθανές ωοκύστες *Cryptosporidium*". (Koutsoumanis K et al., 2018)

Η IFM είναι επιθυμητή για την καταμέτρηση των ωοκύστεων του *Cryptosporidium*, αλλά καθώς οι βιώσιμες και οι μη βιώσιμες ωοκύστες είναι δυσδιάκριτες με τη δοκιμή αυτή, θα καταμετρηθούν και είδη που δεν είναι μολυσματικά για τον άνθρωπο και, επομένως, ο κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία μπορεί να υπερεκτιμηθεί. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Σε δείγματα που εξετάζονται με IFM ή IMS-IFM μπορούν να προστεθούν αδρανοποιημένες ωοκύστες για την παρακολούθηση των ποσοστών ανάκτησης και ανίχνευσης της μεθόδου δοκιμής. Τα ποσοστά ανάκτησης μπορεί να ποικίλλουν, ανάλογα με το μέγεθος των χρησιμοποιούμενων εμβολίων, τη μήτρα του δείγματος και την ικανότητα του αναλυτή, αλλά για πόσιμο νερό που έχει εμπλουτιστεί με 100 έως 500 ωοκύστες, $\geq 33\%$ θεωρείται αποδεκτό (US EPA, 2012). Για τα τρόφιμα, οι Utaaker et al. (2015) πρότειναν ως αποδεκτό όριο ανάκτησης το 20% για μαρούλι που έχει εμπλουτιστεί με 50 ωοκύστες. Κατά τη διάρκεια ορισμένων ερευνών δειγματοληψίας τροφίμων, έχουν αναφερθεί ποσοστά ανάκτησης ωοκυστών 25-47%, αλλά τα δεδομένα αυτά παρέχονται σπάνια. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Τα δεδομένα ανάκτησης από εμβολιασμένες ωοκύστες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εκτιμήσεις κινδύνου για την εκτίμηση του πραγματικού αριθμού των παρόντων ωοκυστεων που υποδεικνύεται από τις μετρήσεις των ωοκυστεων. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Η PCR για την ανίχνευση δεν έχει επικυρωθεί επαρκώς για τον ποσοτικό προσδιορισμό του *Cryptosporidium* spp. στα τρόφιμα και δεν έχουν γίνει δοκιμές δακτυλίου. Η απόδοση της PCR εξαρτάται από την προετοιμασία του δείγματος, την εκχύλιση του DNA, την αποτελεσματικότητα της PCR, τον περιορισμό των αναστολέων και το χρησιμοποιούμενο σύστημα ανίχνευσης. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Εάν εφαρμοστεί επικυρωμένη PCR σε συμπυκνώματα IMS, υπάρχει πρόσθετη διασφάλιση ότι τα αμπλικόνια προέρχονται από ωοκύστες και όχι από "ελεύθερο" DNA στο δείγμα. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Επισημαίνεται ότι οι εκκινητές PCR θα καθορίσουν, εν μέρει, την ειδικότητα της ανάλυσης *Cryptosporidium*. Για ορισμένα τρόφιμα, όπως το γάλα, όπου η μόλυνση προέρχεται πιθανότατα από το ζώο που παράγει το γάλα, μπορεί να είναι σημαντικό να στοχεύεται μόνο το είδος *Cryptosporidium* από τον εν λόγω ξενιστή που είναι πιθανό να είναι μολυσματικό για τον άνθρωπο (π.χ. αγελαδινό γάλα, *C. parvum*), ενώ για άλλα τρόφιμα όπου είναι πιθανές οι διάχυτες πηγές μόλυνσης, μπορεί να είναι χρήσιμοι εκκινητές με ευρύτερη ειδικότητα. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Επιπλέον, εκτός από την απλή ανίχνευση του γένους, οι μοριακές μέθοδοι επιτρέπουν την ταυτοποίηση του είδους (ή πέραν αυτού) του *Cryptosporidium* και αυτό μπορεί να είναι χρήσιμο για την απόδοση και τον εντοπισμό της πηγής. Η αλληλούχιση του γονιδίου SSU rRNA παρέχει το

σημείο αναφοράς για τη διαφοροποίηση των ειδών. Ένα θραύσμα του εξαιρετικά πολυμορφικού γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη γλυκοπρωτεΐνη 60 (gp60) αλληλουχείται μερικές φορές για την "υποτυποποίηση" των ειδών *Cryptosporidium*, συνηθέστερα των *C. parvum* και *C. hominis* από κλινικές περιπτώσεις, ωστόσο είναι επιθυμητό ένα σύστημα πολλαπλών εστιών για την επίλυση της ποικιλομορφίας που προκύπτει από τον γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής φάσης του κύκλου ζωής (συγκεκριμένα, της μειώσεως). Ωστόσο, δεν υπάρχει τυποποιημένο σύστημα γονοτύπων πολλαπλών εστιών. Επιπλέον, ο μικρός αριθμός ωοκύστεων που είναι πιθανό να ανακτηθεί από δείγματα τροφίμων θα αποτελούσε πρόκληση για την εφαρμογή ενός τέτοιου σχήματος για τα τρόφιμα, εάν αυτό τυποποιηθεί. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Το ISO 18744 δεν περιλαμβάνει την ταυτοποίηση των ειδών/γονοτύπων των παρασίτων ούτε την αξιολόγηση της βιωσιμότητας. Εάν τα τρόφιμα εμπλουτιστούν για δεδομένα ανάκτησης, οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν την αιχμή, αν και αυτό μπορεί να μειωθεί εάν χρησιμοποιούνται ωοκύστες που έχουν ακτινοβοληθεί με gamma, καθώς το DNA τους καταστρέφεται και ανιχνεύεται λιγότερο εύκολα με PCR. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Μέθοδοι ανίχνευσης σε νωπά προϊόντα (*Cryptosporidium*)

Η ανάπτυξη μεθόδων για τα νωπά προϊόντα, σε συνδυασμό με το ενδιαφέρον φορέων όπως ο Codex, οδήγησε στην παραγωγή ενός προτύπου ISO για τα φυλλώδη λαχανικά και τα σμέουρα. Βασίζεται σε επιφανειακή έκλουση, φυγοκέντρηση, IMS και IFM. Αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε τέσσερις μελέτες στην Ευρώπη, εκ των οποίων οι τρεις είχαν μεγάλα μεγέθη δειγμάτων που υποδεικνύουν συνολικό επιπολασμό του *Cryptosporidium* spp. έως και 8%. Η πιο πρόσφατη μελέτη, η οποία δεν χρησιμοποίησε IMS και βασίστηκε στη συγκέντρωση δειγμάτων, ανέφερε επιπολασμό *Cryptosporidium* < 1% (Caradonna et al., 2017).

Για το ISO και άλλες κατάλληλες μεθόδους, έχουν αναφερθεί μεταβλητά ποσοστά ανάκτησης τόσο εντός δοκιμών δακτυλίου όπου εξετάστηκε ο ίδιος τύπος προϊόντων (Cook et al., 2006; Utaaker et al., 2015), όσο και μεταξύ διαφορετικών τύπων προϊόντων (Robertson and Gjerde, 2001; Hohweyer et al., 2016). Το όριο ανίχνευσης (LOD) δόθηκε μόνο για μια ποσοτική μέθοδο βασισμένη στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) και ο αριθμός των ωοκυστεών που χρησιμοποιήθηκαν στα εμβόλια ήταν μεγαλύτερος από ό,τι θα αναμενόταν σε φυσική μόλυνση (Hohweyer et al., 2016). Πρέπει να γίνουν περισσότερες εργασίες για τη διερεύνηση των

επιδράσεων του τύπου του τροφίμου (μήτρα) και κατά πόσον το πρότυπο ISO είναι κατάλληλο για όλα τα φυλλώδη λαχανικά, καθώς οι δοκιμές επικύρωσης και δακτυλίωσης περιορίστηκαν σε μαρούλι iceberg.

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) έχει δημοσιεύσει μια μέθοδο στο εγχειρίδιο βακτηριολογικής ανάλυσης: BAM 19a "Detection of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* in Fresh Produce: Απομόνωση και ταυτοποίηση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και μικροσκοπική ανάλυση" (US FDA, 2004). Ωστόσο, έχουν δημοσιευθεί λίγες μελέτες που συγκρίνουν την ανίχνευση με IFM και PCR, ενώ σε μία μελέτη αναφέρεται χαμηλότερη ανίχνευση με PCR από μαρούλι σε σχέση με τη μικροσκοπική ανάλυση (Ripabelli et al., 2004). Εφόσον η προετοιμασία του δείγματος είναι κατάλληλη, η εκχύλιση του DNA είναι αποτελεσματική, η PCR είναι καλά σχεδιασμένη και αποτελεσματική, οι αναστολές ελέγχονται και η απόδοση επικυρώνεται, οι μέθοδοι αυτές θα πρέπει να είναι κατάλληλες για την ανίχνευση σε νωπά προϊόντα.

Η ταυτοποίηση και η εφαρμογή των απταμερών DNA που συνδέονται με το τοίχωμα της ωοκύστης του *C. parvum*, έχει υποδείξει τη δυνατότητα ανίχνευσης 100 ωοκύστεων που έχουν προστεθεί σε φρέσκα φρούτα και θα μπορούσαν να αυτοματοποιηθούν, αλλά απαιτείται περισσότερη ανάπτυξη για πρακτική εφαρμογή (Iqbal et al., 2015).

Μέθοδοι ανίχνευσης σε χυμούς φρούτων (*Cryptosporidium*)

Οι πρώτες έρευνες για το *Cryptosporidium* σε χυμούς φρούτων έγιναν ως απάντηση σε κρούσματα στις ΗΠΑ στις αρχές της δεκαετίας του 1990, όπου το μέσο ταυτοποιήθηκε ως μη ζυμωμένος μηλίτης μήλου. Οι μέθοδοι ανίχνευσης βασίστηκαν σε εκείνες που χρησιμοποιούνται για τα κόπρανα: καθίζηση με οξικό αιθυλεστέρα ή απλή καθίζηση-πλεύση σακχαρόζης και IFM (Millard et al., 1994), αλλά δεν δόθηκαν δεδομένα ανάκτησης, ευαισθησίας ή ειδικότητας, αν και ανιχνεύθηκαν υψηλοί αριθμοί ωοκύστεων, γεγονός που πιθανότατα οφειλόταν σε υψηλά επίπεδα μόλυνσης. Σε μια προσπάθεια παροχής συγκριτικών δεδομένων ανάκτησης και βελτίωσης της ανίχνευσης, μια μελέτη (Deng and Cliver, 2000) συνέκρινε την προετοιμασία των δειγμάτων με καθίζηση οξικού αιθυλεστέρα και επίπλευση σακχαρόζης με IMS και ανίχνευση με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και PCR (Laberge et al., 1996). Αυτό καθιέρωσε την επίπλευση σακχαρόζης και την IMS με ανίχνευση με IFM ως πιο ευαίσθητες, με 2/3 των απομονωμένων δειγμάτων θετικά

όταν εμπλουτίστηκαν με 10 ωοκύστες/100 ml, και επομένως κατάλληλες για την ανίχνευση μολυσματικής δόσης σε δείγμα προϊόντος μεγέθους μερίδας. Σε μια περαιτέρω εξέλιξη, χρησιμοποιήθηκε ένα εναλλακτικό σύστημα IMS και ανιχνεύθηκαν 10 ωοκύστες με την ίδια PCR (Laberge et al., 1996; Deng et al., 2000).

Καθώς δεν υπάρχουν στοιχεία από την Ευρώπη, είναι απαραίτητο να αναζητήσουμε από αλλού. Μια μελέτη στον Καναδά διερεύνησε μια διαδικασία παραγωγής μηλίτη μήλου (χυμού) με δειγματοληψία μήλων μέχρι το τελικό προϊόν και, χρησιμοποιώντας τις μεθόδους (Laberge et al. (1996) και Deng et al. (2000)), βρήκε υλικό θετικό για *Cryptosporidium* σε όλα τα στάδια (Garcia et al., 2006). Αυτή είναι πιθανώς η πιο σχετική διαθέσιμη μελέτη για την Ευρώπη. Άλλες μελέτες έχουν διεξαχθεί αλλού, ωστόσο το περιβάλλον τους (όπως οι στάβλοι χυμών ή οι φάρμες στην Αφρική) δεν θεωρήθηκε συναφές για την εκτίμηση κινδύνου στην Ευρώπη.

Οι Frazar και Orlandi (2007) μόλυναν τεχνητά διαφορετικούς τύπους τροφίμων για να συγκρίνουν την προετοιμασία προτύπου DNA για PCR, χρησιμοποιώντας προσρόφηση με χαρτί φίλτρου Whatman με εκχύλιση ολικού DNA με βάση κιτ μετά από IMS. Η εκχύλιση ολικού DNA παρείχε πιο αξιόπιστη ανίχνευση 50 ωοκύστεων/10 mL, με το LOD να ποικίλλει ανάλογα με τη μήτρα: για το χυμό μήλου, το LOD ήταν 50 ωοκύστες/10 mL- στο χυμό πορτοκαλιού με υψηλή περιεκτικότητα σε χυμό πολτού, 1/5 των επαναλήψεων ήταν θετικές σε 5 ωοκύστες/10 mL- και στο χυμό πορτοκαλιού με χαμηλή περιεκτικότητα σε πολτό, 2/5 των επαναλήψεων ήταν θετικές σε 5 ωοκύστες/10 mL. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Συνδυάζοντας μικροδιήθηση με λύση των ωοκύστεων και στήλες περιστροφής και PCR πραγματικού χρόνου (Guy et al., 2003), φωλιασμένη PCR και φωλιασμένη PCR πραγματικού χρόνου ενός σωλήνα, έχουν αναφερθεί σταθερά όρια ανίχνευσης 10 ωοκύστεων ανά 250 ml (Minarovicova et al., 2009, 2010).

Οι πρόσφατες εξελίξεις, ιδίως στην ανίχνευση με PCR, μπορεί να είναι χρήσιμες για μελλοντικές εργασίες. Η BAM19a του FDA των ΗΠΑ, περιλαμβάνει επίσης την απομόνωση του *Cryptosporidium* spp. από χυμούς, μη ζυμωμένο μηλίτη και γάλα με επεξεργασία όγκου 10 ml προϊόντος απευθείας με IMS και ανίχνευση με PCR ή IFM, αν και δεν παρέχονται ή δεν μπόρεσαν να βρεθούν δεδομένα απόδοσης. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Μέθοδοι ανίχνευσης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα

(Cryptosporidium)

Δεν έχουν διεξαχθεί προοπτικές δειγματοληπτικές έρευνες ή δεν έχουν εφαρμοστεί καλά περιγραφόμενες μέθοδοι κατά τη διάρκεια ερευνών για την εμφάνιση κρουσμάτων στην Ευρώπη. Σε τρία κρούσματα αλλού (Αυστραλία, Ρωσία και ΗΠΑ), το γάλα ή το προϊόν ζύμωσης γάλακτος (κεφίρ) ελέγχθηκε για την παρουσία κρυπτοσποριδίου και ανιχνεύθηκαν ωοκύστες ή αντιγόνα. Στην Αυστραλία, τα δείγματα γάλακτος φυγοκεντρήθηκαν και χρησιμοποιήθηκε IMS για τη συγκέντρωση των ωοκυστών, IFM για την ανίχνευση ωοκυστών και ELISA για την ανίχνευση αντιγόνων. Στη Ρωσία, χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπηση για την ανίχνευση σε φίλτρα κεφίρ και γάλακτος στο τυροκομείο. Στις ΗΠΑ χρησιμοποιήθηκε η PCR, αλλά κρίθηκε ότι έδωσε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα στο γάλα, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη επικύρωσης των μοριακών μεθόδων. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Έχουν αναφερθεί δοκιμές σποράς υγρού γάλακτος στο πλαίσιο της ανάπτυξης μεθόδων και οι μέθοδοι που βασίζονται στην PCR, ιδίως οι πιο πρόσφατες, είναι πιο ευαίσθητες από άλλες χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Βασικό στοιχείο είναι η προετοιμασία του δείγματος πριν από την PCR. Ωστόσο, καμία δεν έχει προχωρήσει σε δειγματοληπτικές έρευνες γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων, οπότε η εφαρμογή τους δεν είναι γνωστή/αποδεδειγμένη. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Μέθοδοι ανίχνευσης σε οστρακοειδή μαλάκια (*Cryptosporidium*)

Τα οστρακοειδή μαλάκια έχουν ελεγχθεί για *Cryptosporidium* για δύο κύριους σκοπούς: πρώτον, ως βιοπαρατηρητές της ποιότητας των γλυκών και θαλάσσιων υδάτων, αξιοποιώντας την ικανότητα διήθησής τους, και δεύτερον ως τρόφιμα. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Έχουν δοκιμαστεί διάφορα γένη μαλακίων, με τα πιο συχνά καταναλώσιμα και εκτρεφόμενα είδη να είναι τα στρείδια του Ειρηνικού (*Crassostrea gigas*). Άλλα κύρια είδη τροφής είναι τα ανατολικά στρείδια (*Crassostrea virginica*), τα ευρωπαϊκά στρείδια (*Ostrea edulis*), τα σκληρά μύδια (*Mercenaria mercenaria*), τα μαλακά μύδια (*Mya arenaria*), τα κοινά μύδια (*Mytilus edulis*), τα μεσογειακά μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) και τα κοινά cockles (*Cerastoderma edule*).

(*Koutsoumanis K et al., 2018*)

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι δοκιμών, οι οποίες εφαρμόζονται είτε σε ομογενοποιημένους ιστούς είτε σε πλύσεις ολόκληρων οστρακοειδών ή μεμονωμένων τμημάτων (π.χ. βράγχια, πεπτικό σύστημα, πλύσεις ολόκληρης σάρκας, αιμολέμφος), εξετάζονται χωριστά ή σε ομάδες και υποβάλλονται σε συγκέντρωση ή καθαρισμό μέσω κοσκίνισης, φυγοκέντρωσης, επίπλευσης ή IMS πριν από την ανίχνευση με μοριακές μεθόδους ή IFM. (*Koutsoumanis K et al., 2018*)

Οι Gomez-Couso κ.ά. (2005) εξέτασαν την κατανομή του *Cryptosporidium* εντός 60 μυδιών (*Tapes decussatus*) σε ημερήσια βάση μετά από σπορά σε δεξαμενή 20 L με 10^6 ωοκύστες *C. parvum* (περίπου $3,3 \cdot 10^5$ ωοκύστες/δείγμα). Η ιστολογική ανάλυση κατέδειξε την παρουσία ωοκύστεων στα σιφώνια, στα βράγχια, στο στομάχι, στα πεπτικά εκκολπώματα και στο έντερο, αλλά η συχνότητα ανίχνευσης ήταν υψηλότερη στα βράγχια και ιδιαίτερα στο έντερο, όπου ο αριθμός των ωοκύστεων ήταν μεγαλύτερος και τις 10 διαδοχικές ημέρες. Συνέστησαν να εξετάζονται τα βράγχια και οι εντερικές οδοί κατά προτίμηση σε μεμονωμένους ιστούς. Υπάρχουν πρόσθετες ενδείξεις ότι τα ομογενοποιημένα δείγματα ολόκληρων ιστών είναι το πιο χρήσιμο δείγμα για εξέταση σε έρευνες εμφάνισης ή επιπολασμού (*Fayer et al., 1997; Tamburrini and Pozio, 1999; MacRae et al., 2005; Li et al., 2006; Miller et al., 2006; Schets et al., 2007*).

Πειράματα σποράς, με ανίχνευση με IFM, έδειξαν αποτελεσματικότητα ανάκτησης που κυμαίνεται από 12% έως 50% για μύδια (*MacRae et al., 2005; Graczyk et al., 2007*), 48% έως 69,5% για χτένια (*MacRae et al., 2005*) και έως 77,2% από εμβολιασμό κοσκινισμένων και καθαρισμένων ομοιογενών προϊόντων μυδιών και εντερικού σωλήνα (*Gomez-Couso et al., 2006*). Ένας περιορισμός των εφαρμοζόμενων δοκιμών ήταν ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό δείγματος/ομογενούς μπορούσε να εξεταστεί.

Σε μια προσπάθεια να δημιουργήσουν μια μέθοδο που να είναι κατάλληλη για ένα εύρος οστράκων λόγω της μεταβλητής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και να επιτρέπει την εξέταση μεγαλύτερου ποσοστού υλικού, οι Robertson και Gjerde (2008) αξιολόγησαν μια μέθοδο πέψης με πεψίνη που επέτρεπε την εξέταση δειγμάτων 3 g με IFM με μικρή μόνο απώλεια βιωσιμότητας. Αναφέρθηκαν αποδόσεις ανάκτησης 70-80% από ομογενοποιημένα προϊόντα γαλάζιου μυδιού, αλογόμυδου και στρειδιού (*Robertson and Gjerde, 2008*).

Αν και καμία μελέτη δεν έχει δείξει πλήρη συμφωνία μεταξύ της ανίχνευσης με IFM και PCR σε

οστρακοειδή, καμία από τις δύο μεθόδους δεν έχει αποδειχθεί σταθερά καλύτερη από την άλλη, πιθανώς λόγω των διαφορετικών στόχων ανίχνευσης (π.χ. κενά σώματα που μοιάζουν με ωοκύστες μπορεί να ανιχνευθούν με IFM, αλλά σποροζωΐτες και συνεπώς DNA μπορεί να μην υπάρχουν) (Fayer et al., 2003; Gomez-Couso et al., 2004, 2006).

Μέθοδοι ανίχνευσης στο κρέας (*Cryptosporidium*)

Ο κύκλος ζωής του *Cryptosporidium* πραγματοποιείται συνήθως στο λεπτό έντερο και οι επιφάνειες του κρέατος ενδέχεται να μολυνθούν με ωοκύστες από τα κόπρανα, ιδίως στο χώρο του σφαγείου. Έχουν διεξαχθεί πολύ λίγες μελέτες για το *Cryptosporidium* στο κρέας - οι περισσότερες πληροφορίες προέρχονται είτε από εργασίες αντιδραστικής ανάπτυξης για παστό κρέας που παρασκευάστηκε με τη χρήση πιθανώς μολυσμένου νερού, το οποίο προκάλεσε επιδημία που μεταδόθηκε από το πόσιμο νερό στη Σουηδία (Robertson and Huang, 2012), είτε από το πρόγραμμα της ΕΕ "Ποιότητα ζωής και διαχείριση των έμβιων πόρων". Αυτό το πρόγραμμα της ΕΕ επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για την απομόνωση και την ανίχνευση του *C. parvum* σε δείγματα τροφίμων και νερού. Το έργο διερεύνησε δείγματα κρέατος σε εμπορικό σφαγείο βοείου κρέατος στην Ιρλανδία. Το παράσιτο δεν ανιχνεύθηκε στο κρέας σφαγίων (Moriarty et al., 2005a). Ωστόσο, απομονώθηκαν ωοκύστες από 21/288 (7,3%) δείγματα κοπράνων σε ποσοστό που εκτιμάται σε 25.000-37.500 ανά γραμμάριο και σε 12/49 δείγματα νερού (50 L) που είχαν χρησιμοποιηθεί για την πλύση σφαγίων βοείου κρέατος σε επίπεδο 0,08-9,0 ωοκύστεων/L (McEvoy et al., 2005; Moriarty et al., 2005a).

Μέθοδοι ανίχνευσης στα τρόφιμα (*Toxoplasma gondii*)

Υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες μέθοδοι για την ανίχνευση ταχυζωϊτών, βραδυζωϊτών και ωοκύστεων του *T. gondii* μέσα ή πάνω σε τρόφιμα. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους περιλαμβάνουν ένα στάδιο απομόνωσης και συγκέντρωσης πριν από την εφαρμογή των μεθόδων άμεσης ανίχνευσης στα δείγματα δοκιμής. Οι δοκιμασίες με βάση το μοριακό σύστημα χρησιμοποιούνται πολύ συχνά για να δείξουν την παρουσία του DNA του *T. gondii* στα δείγματα, ενώ οι πληροφορίες σχετικά με τη βιωσιμότητα και τη μολυσματικότητα μπορούν να προσδιοριστούν με τη χρήση βιοδοκιμών σε ποντίκια ή γάτες και μεθόδων καλλιέργειας *in vitro*. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Μέθοδοι ανίχνευσης σε νωπά προϊόντα (*Toxoplasma gondii*)

Οι ωοκύστες του *T. gondii* που αποβάλλονται από τους τελικούς ξενιστές, τα αιλουροειδή, εξαπλώνονται στο περιβάλλον. Οι μήτρες τροφίμων που εκτίθενται στο περιβάλλον (π.χ. φρέσκα προϊόντα) μπορούν να μολυνθούν από ωοκύστες και αυτά τα τρόφιμα αποτελούν άλλη μια πηγή ανθρώπινων λοιμώξεων. Λίγες μελέτες έχουν συνδέσει τα κρούσματα οξείας ανθρώπινης τοξοπλάσμωσης με την κατάποση ωοκύστεων (*Teutsch et al., 1979; Stagno et al., 1980; Benenson et al., 1982; Bowie et al., 1997; Ekman et al., 2012*), και μία από αυτές προσδιόρισε τα πράσινα λαχανικά ως το πιθανό μέσο μόλυνσης (*Ekman et al., 2012*).

Η ανίχνευση των ωοκύστεων του *T. gondii* σε δείγματα τροφίμων και περιβάλλοντος είναι πολύ δύσκολη, λόγω των δυσκολιών διαχωρισμού και συγκέντρωσής τους από πολύπλοκες μήτρες, όπως τα ωμά λαχανικά. Μια δοκιμασία ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (IMS Toxo) που στοχεύει στο κυτταρικό τοίχωμα των ωοκύστεων του *T. gondii* έχει αναπτυχθεί από τους Hohweyer et al. (2016), αλλά δεν είναι διαθέσιμη στο εμπόριο. Με βάση τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για άλλα πρωτόζωα, έχουν προταθεί από τους Dumetre και Darde (2003) πιθανές μέθοδοι για την ανίχνευση του *T. gondii* στο νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα (φρούτα και λαχανικά). Εκτός από τις συμβατικές μεθόδους μικροσκοπίας, PCR ή ποσοτικής PCR, αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμασία LAMP για την ανίχνευση του *T. gondii* σε πειραματικά μολυσμένο έτοιμο προς κατανάλωση μαρούλι. Το όριο ανίχνευσης αυτής της μεθόδου ήταν περίπου 25 ωοκύστες ανά 50 g φύλλων μαρουλιού (*Lalle et al., 2018*).

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν τυποποιημένες μέθοδοι ανίχνευσης των ωοκύστεων του *T. gondii* στα νωπά προϊόντα. (*Koutsoumanis K et al., 2018*)

Μέθοδοι ανίχνευσης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (*Toxoplasma gondii*)

Τα ταχυζώδια του *T. gondii* μπορούν να αποβληθούν στο γάλα οξέως μολυσμένων ζώων- ως εκ τούτου, το νωπό γάλα και τα προϊόντα νωπού γάλακτος μπορεί να αποτελούν κίνδυνο μόλυνσης για

τους καταναλωτές. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Οι κύριες μέθοδοι ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται σε δείγματα νοπού γάλακτος περιλαμβάνουν την ανίχνευση του DNA του *T. gondii* με τη χρήση δοκιμών που βασίζονται στην PCR, οι οποίες συνήθως στοχεύουν στο επαναλαμβανόμενο στοιχείο 529 bp (Bezerra et al., 2015; de Santana Rocha et al., 2015; da Silva et al., 2015; Vismarra et al., 2017) ή στο γονίδιο B1 (Dehkordi et al., 2013).

Η ανίχνευση του DNA του *T. gondii* με τη χρήση μεθόδων που βασίζονται στην PCR δεν παρέχει αποδείξεις για τη βιωσιμότητα των παρασίτων και, ως εκ τούτου, για τον κίνδυνο μόλυνσης μετά την κατανάλωση των γαλακτοκομικών προϊόντων. Για τη διερεύνηση της βιωσιμότητας των παρασίτων στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί άλλες τεχνικές, όπως: δοκιμασία βιωσιμότητας κυτταροκαλλιέργειας που μετρά την κυτταροπαθητική επίδραση των ταχυζωιδίων *T. gondii* σε κύτταρα HEp-2 (Koethe et al., 2017)- βιοδοκιμή σε ποντίκια όπου ποντίκια εμβολιάζονται με δείγματα και στη συνέχεια ελέγχονται για ορομετατροπή και για παρουσία παρασίτων- και βιοδοκιμή σε γάτες όπου οι γάτες τρέφονται με δείγματα γάλακτος και/ή τυριού και στη συνέχεια τα κόπρανά τους ελέγχονται για την παρουσία ωοκύστεων (Dehkordi et al., 2013; Dubey et al., 2014).

Μια εμπορική δοκιμή ELISA χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της παρουσίας αντισωμάτων *T. gondii* σε δείγματα γάλακτος χύμα από κασίκες. Η ανάλυση έδειξε ότι τα δείγματα γάλακτος ήταν μια χρήσιμη εναλλακτική λύση για τις ορολογικές δοκιμές και μπορούσαν να εφαρμοστούν ευκολότερα για την αναζήτηση του ορολογικού επιπολασμού του *T. gondii* (Gazzonis et al., 2018), αλλά ήταν λιγότερο χρήσιμα για την ανίχνευση των ταχυζωιδίων *T. gondii* που αποβάλλονται στο γάλα.

Μέθοδοι ανίχνευσης σε οστρακοειδή μαλάκια (*Toxoplasma gondii*)

Τα μαλάκια, συμπεριλαμβανομένων των αχιβάδων, των μυδιών, των στρειδιών και των χτενιών, είναι διηθηματοφάγα που παγιδεύουν το φυτοπλαγκτόν στα βράγχια τους. Η διαδικασία της διηθητικής διατροφής μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση υδατογενών παθογόνων μικροοργανισμών, όπως οι ωοκύστες του *T. gondii*, οι οποίες μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα τόσο στο γλυκό όσο και στο αλμυρό νερό (Lindsay and Dubey,

2009). Η κατανάλωση μολυσμένων με ωοκύστες *T. gondii*, μη επαρκώς μαγειρεμένων, μαλακίων οστρακοειδών μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για τους καταναλωτές.

Δείγματα ολόκληρων ιστών ή οργάνων (π.χ. βράγχια ή μανδύας) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δειγματοληψία των δίθυρων, ενώ συχνά χρησιμοποιούνται για την ανάλυση ομάδες μεμονωμένων δειγμάτων. Το DNA εξάγεται από ομογενοποιημένους ιστούς και χρησιμοποιείται για τη μοριακή ανίχνευση του DNA του *T. gondii* με δοκιμές που βασίζονται στην PCR, με την πλειονότητα των ερευνών να στοχεύουν στο γονίδιο B1 (Putignani et al., 2011; Aksoy et al., 2014; Marquis et al., 2015; Cong et al., 2017; Ghozzi et al., 2017). Υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με το αν είναι καλύτερο να λαμβάνονται δείγματα από συγκεκριμένα όργανα ή να χρησιμοποιείται ολόκληρος ιστός- επομένως, ίσως είναι καλύτερο να συνιστάται η δειγματοληψία ολόκληρου του ιστού. Θα ήταν επίσης χρήσιμο να υπάρχουν καλύτερα δεδομένα επικύρωσης για τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές, να διερευνηθούν τα ποσοστά ανάκτησης και τα όρια ανίχνευσης και να εναρμονιστούν τα δείγματα ιστών που εξετάζονται. Μια πρόσφατη δημοσίευση περιέγραψε την πρώτη αναφορά της παρουσίας σποροποιημένων ωοκύστεων του *T. gondii* σε δείγματα που ελήφθησαν από πράσινα χείλη μυδιών (*Perna canaliculus*) εμπορικής προέλευσης (Coupe et al., 2018). Το ειδικό για τον σποροζωίτη *T. gondii* mRNA ανιχνεύθηκε με τη χρήση δοκιμασίας αντίστροφης μεταγραφάσης-PCR (RT-PCR) που στόχευε ένα τμήμα 71-bp του γονιδίου SporoSAG. Η ανίχνευση σποροποιημένων ωοκύστεων στο πλαίσιο αυτό είναι σημαντική, καθώς, εάν οι ωοκύστες που ανιχνεύονται είναι σποροποιημένες, μπορεί να είναι μολυσματικές για άλλους ξενιστές. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Μέθοδοι ανίχνευσης στο κρέας (*Toxoplasma gondii*)

Οι ιστικές κύστες του *T. gondii* στο κρέας αποτελούν σημαντική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές για την ανίχνευση της παρουσίας ιστικών κύστεων *T. gondii*. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της μεθόδου (π.χ. διάκριση μεταξύ βιώσιμων και μη βιώσιμων παρασίτων) και τις επιδόσεις (π.χ. ευαισθησία και ειδικότητα) της μεθόδου, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με διαφορετικές μεθόδους πρέπει να αξιολογούνται διαφορετικά. Επιπλέον, οι μέθοδοι αυτές δεν είναι κατάλληλες για δοκιμές ρουτίνας. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Η βιοδοκιμή ποντικού και η PCR είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι άμεσης ανίχνευσης, ακολουθούμενες από τη μικροσκοπία και τη βιοδοκιμή γάτας (Opsteegh et al., 2016a).

Οι μέθοδοι άμεσης ανίχνευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση του *T. gondii* σε διάφορα δείγματα τροφίμων (κρέας, γάλα, νωπά προϊόντα, στρείδια, νερό), αν και σπάνια έχει περιγραφεί η επικύρωση μεθόδων για τρόφιμα εκτός του κρέατος.

Μέθοδοι ανίχνευσης στα τρόφιμα (*Echinococcus*)

Δεν υπάρχει τυποποιημένη μέθοδος για την ανίχνευση των μολυσματικών αυγών του *Echinococcus* spp. που υπάρχουν στα τρόφιμα. Ωστόσο, κατ' αρχήν, υπάρχουν καθιερωμένες μέθοδοι για την απομόνωση των αυγών και τον γενετικό χαρακτηρισμό. Δεδομένου ότι τα τρόφιμα μπορεί να μολυνθούν με μη βιώσιμα αυγά που παραμένουν στο περιβάλλον, η ειδική ταυτοποίηση με DNA δεν σημαίνει ότι τα βιώσιμα αυγά υπήρχαν στα τρόφιμα που ερευνήθηκαν. Ως εκ τούτου, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για την τυποποίηση και επικύρωση ισχυρών διαγνωστικών στρατηγικών και για την εκτίμηση του κινδύνου μόλυνσης από *Echinococcus* spp. που σχετίζονται με τρόφιμα. (Koutsoumanis K et al., 2018)

Μεθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για ανίχνευση παρασίτων στην Κίνα

Η έλευση των μοριακών εργαλείων, ιδίως εκείνων που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), οδήγησε κυρίως στην κοινή PCR, την πολλαπλή PCR, την PCR-ELISA, την ένθετη PCR, την PCR πραγματικού χρόνου και το γονιδιακό τσιπ, τα οποία παρείχαν σημαντική πρόοδο για τη βιομηχανία τροφίμων λόγω της δυνατότητας ανίχνευσης χαμηλών επιπέδων παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα (McCarthy et al., 2012; Xu, S., Mutharasan, R. 2010).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αναπτύχθηκε ένα ενιαίο τεστ PCR για την απλή και αδιαμφισβήτητη διαφοροποίηση όλων των επί του παρόντος αναγνωρισμένων γονότυπων *Trichinella*. Η τεχνική αναπτύχθηκε περαιτέρω για τη διάκριση των γονοτύπων σε επίπεδο μεμονωμένων προνυμφών μυών με τη χρήση μιας φωλιασμένης, πολλαπλής PCR. Στην εν λόγω PCR, ολόκληρη η εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή διαστήματος, καθώς και η περιοχή χάσματος του τμήματος επέκτασης V της μεγάλης

υπομονάδας του ριβοσωμικού DNA, ενισχύονται ταυτόχρονα σε έναν πρώτο γύρο PCR με χρήση σετ εκκινητών ειδικών για κάθε περιοχή, ακολουθούμενων από την πολυπλεξία PCR για την τελική διάγνωση (Zarlenga, D. et al., 1999). Η πολλαπλή PCR χρησιμοποιεί περισσότερα από ένα σετ εκκινητών σε μια αντίδραση και έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων μικροοργανισμών σε ένα δείγμα (Chen, J. et al., 2012; de Freitas, C. et al., 2010). Ωστόσο, οι περιορισμοί της PCR περιλαμβάνουν αναστολές στα τρόφιμα, οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Οι αναστολές της PCR που προέρχονται από τα τρόφιμα περιλαμβάνουν Ca^{2+} , λίπη, γλυκογόνο και φαινολικές ενώσεις (Wilson, I. G. 1997). Η παρουσία πρωτεασών στο τυρί και το γάλα μπορεί επίσης να αναστείλει την PCR (Powell, H. et al., 1994, Rossen, L. et al., 1992), ενώ η ανίχνευση του *Cryptosporidium* σε δείγματα νερού και τροφίμων συχνά παρεμποδίζεται από την εμφάνιση οργανικών και ανόργανων ουσιών που μπορούν δυνητικά να αποτελέσουν αναστολές της PCR (Skotarczak, B. 2009). Η PCR-ELISA επιτρέπει τη γρήγορη και μη ραδιενεργό ανίχνευση των προϊόντων PCR στη μικροπλάκα. Ο Kellogg χρησιμοποίησε την PCR-ELISA για την ανίχνευση της μόλυνσης από τοξόπλασμα στο νερό (Schwab, K. J., McDevitt, J. J. 2003). Η μέθοδος αυτή μπορεί να παρέχει θετικά, επιβεβαιωμένα αποτελέσματα σε λιγότερο από μία ημέρα. Μετά την ανάκτηση του DNA των ωοκυστών μπορούν να ανιχνευθούν λιγότερες από 50 ωοκύστες. Η ανάπτυξη μιας μεθόδου ανίχνευσης με PCR για την ανίχνευση της ωοκύστης του *T. gondii* θα παράσχει μια χρήσιμη τεχνική για την εκτίμηση των επιπέδων που υπάρχουν στα επιφανειακά ύδατα.

Ποσοτική PCR (qPCR)

Η εφεύρεση της ποσοτικής PCR (qPCR) ξεπέρασε αρκετούς περιορισμούς της συμβατικής PCR και οδήγησε στην ταχεία καταμέτρηση των τροφιμογενών παθογόνων (Gorski, L., Csordas, A. 2009; Hoorfar, J. 2011). Στην qPCR, το ενισχυμένο προϊόν ανιχνεύεται με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών ουσιών. Αυτές οι φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται με ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι δεσμεύονται ειδικά στο ενισχυμένο προϊόν PCR. Αυτό όχι μόνο επιτρέπει την εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση των αλληλουχιών-στόχων, αλλά και τον πολύ ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό της αλληλουχίας-στόχου (Hoorfar, J. 2011, Higuchi, R. et al., 1992). Μια μελέτη αξιολόγησε κατά πόσον τα δίθυρα του γλυκού νερού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της παρουσίας *Toxoplasma gondii* σε υδάτινους αποδέκτες. Η παρουσία του *T. gondii* διερευνήθηκε σε ιστούς μυδιών με qPCR (Kerambrun, E. et al., 2015). Με τη χρήση ποσοτικής PCR φθορισμού σε πραγματικό χρόνο, το όριο ανίχνευσης για *Trichinella spiralis* είναι περίπου

0,01 προνύμφες/1 g ομογενοποιημένου ιστού (Atterby, H. et al., 2009), για το *Anisakis*, 1 mg σωματικών ιστών/25 g δειγμάτων ψαριών (Lopez, I., Pardo, M. A. 2010) και για τις ωοκύστες *Cryptosporidium* σε δείγματα νερού, < 10 ωοκύστες (Ramirez, N. E., Sreevatsan, S. 2006). Αυτή η PCR είναι μια αξιόπιστη, ειδική και ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης.

Ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση βρόχου (LAMP)

Η LAMP χρησιμοποιεί τέσσερις εκκινητές που έχουν συνολικά έξι θέσεις πρόσδεσης στο DNA-στόχο. Χρησιμοποιεί μια ισχυρή πολυμεράση (BST) για την ενίσχυση του DNA-στόχου (ή του RNA με την προσθήκη αντίστροφης μεταγραφάσης), προχωρώντας σε έναν αυτοκυκλικό μηχανισμό μετατόπισης των αλυσίδων, ενώ βρίσκεται σε σταθερή θερμοκρασία και παράγει ανιχνεύσιμο προϊόν σε περίπου 1 ώρα (Notomi, T. et al., 2000). Η διαδικασία είναι στιβαρή, γρήγορη και ικανή να ενισχύσει από ένα αντίγραφο σε 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία, συνήθως στην περιοχή των 60-70°C (Notomi, T. et al., 2000; Karanis, P., Ongert, J. 2009). Η LAMP μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε εκχυλίσματα νουκλεϊκών οξέων μη καθαρισμένων δειγμάτων ή ακόμη και σε δείγματα χωρίς εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων, γεγονός που καταδεικνύει τη γενική ευαισθησία της σε ξένα υλικά εκτός του στόχου- δηλαδή, το DNA των ωοκύστεων *Toxoplasma* έχει ανιχνευθεί αποτελεσματικά σε ακατέργαστα εκχυλίσματα νουκλεϊκών οξέων κοπράνων (Karanis, P., Ongert, J. 2009). Αναπτύχθηκε μια ταχεία, ευαίσθητη και ειδική μέθοδος για την ανίχνευση του τροφιμογόνου τρηματοειδούς *Opisthorchis viverrini* από δείγματα κοπράνων με τη χρήση LAMP, η οποία παρέχει αποτελέσματα εντός 40 λεπτών, χρησιμοποιώντας ένα θερμικό κουτί ή ένα υδατόλουτρο για τη διατήρηση της θερμοκρασίας στους 65 °C (Arimatsu, Y. et al., 2012). Έχουν επίσης αναπτυχθεί δοκιμασίες LAMP για την ανίχνευση *Cryptosporidium* και *Giardia* σε νερό και κόπρανα.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι PCR που έχουν δύο σημαντικά πλεονεκτήματα (Tang, J. et al., 2007; Sanpool, O. et al., 2012; Traub, R. J. et al., 2009). Πρώτον, η PCR παρουσιάζει υψηλή απόδοση στη διάγνωση της λοίμωξης χαμηλής έντασης. Δεύτερον, η τεχνική επιτρέπει τη διάκριση του *C. sinensis* από άλλα είδη τρηματοειδών. Η τεχνική LAMP έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση της μόλυνσης από το *C. sinensis* σε ενδιάμεσους ξενιστές (Cai, X. et al., 2010; Chen, Y. et al., 2013). Μελέτες για τη διάγνωση της λοίμωξης από το *C. sinensis* στον άνθρωπο με την LAMP είναι δικαιολογημένες λόγω της απλότητας αυτής της τεχνολογίας σε σύγκριση με την PCR.

Τσιπ DNA

Ένα τσιπ DNA (επίσης γνωστό ως μικροσυστοιχία DNA ή βιοτσιπ) είναι μια συλλογή μικροσκοπικών σημείων DNA που είναι προσαρτημένα σε μια στερεή επιφάνεια. Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν τις μικροσυστοιχίες DNA για να μετρήσουν τα επίπεδα έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων ταυτόχρονα ή για να προσδιορίσουν τον γονότυπο πολλαπλών περιοχών ενός γονιδιώματος. Κάθε σημείο DNA περιέχει πικομόλες (10-12 mol) συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, γνωστών ως ανιχνευτές (ή αναμεταδότες ή ολίγοι). Αυτά μπορεί να είναι ένα σύντομο τμήμα ενός γονιδίου ή άλλου στοιχείου DNA, που χρησιμοποιείται για την υβριδοποίηση ενός δείγματος cDNA ή cRNA (που ονομάζεται επίσης αντιαισθητικό RNA) (που ονομάζεται στόχος) υπό συνθήκες υψηλής αυστηρότητας. Ο υβριδισμός ανιχνευτή-στόχου συνήθως ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται με την ανίχνευση στόχων επισημασμένων με φθοριοφόρο, άργυρο ή χημειοφωτάγεια για τον προσδιορισμό της σχετικής αφθονίας των αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων στο στόχο. (Xue Bai et al., 2017)

Ο Wang και οι συνεργάτες του σχεδίασαν τσιπ ολιγονουκλεοτιδίων με ειδικούς ανιχνευτές με βάση τα γένη, τα είδη και τα υποείδη. Αυτό το τσιπ, σε συνδυασμό με πολλαπλές PCR, ταυτοποίησε με επιτυχία τα *Entamoeba histolytica* Schaudinn, *Giardia lamblia* και *Cryptosporidium parvum* (Wang, Z. et al., 2004). Ο Brinkman ερεύνησε και ανέπτυξε την τεχνολογία τσιπ DNA για την ανίχνευση πέντε τύπων παθογόνων μικροοργανισμών στο φυσικό νερό, όπως το *C. parvum* και το *C. tyzzeri*, ώστε να διευκολύνεται η έγκαιρη αξιολόγηση του κινδύνου έκθεσης σε παθογόνα που μεταδίδονται με το νερό (Brinkman, N. Et al., 2013).

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η φύση των παρασίτων στα τρόφιμα, οι επιπτώσεις της παρουσίας τους στην υγεία, τα μέτρα πρόληψης και ελέγχου που απαιτούνται καθώς και διάφορες μέθοδοι ανίχνευσής τους.

Η πρόληψη και ο έλεγχος απαιτούν αυστηρή τήρηση των προτύπων υγιεινής και ασφάλειας, καθώς και εκπαίδευση και ευαισθητοποίηση των εμπλεκόμενων φορέων. Μόνο μέσω συντονισμένων προσπαθειών μπορούμε να διασφαλίσουμε την προστασία της υγείας και της ασφάλειας των καταναλωτών από τους κινδύνους των παρασίτων στα τρόφιμα. Είναι αναγκαίο να διατηρούμε

υψηλά πρότυπα υγιεινής σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας, από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση, προκειμένου να εξασφαλίσουμε την ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων που καταναλώνουμε.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η επικινδυνότητα των παρασίτων εξαρτάται επίσης από την ποσότητα που καταναλώνεται και την ανοχή του κάθε ανθρώπου. Ορισμένοι άνθρωποι μπορεί να είναι πιο ευαίσθητοι σε συγκεκριμένα παράσιτα σε σχέση με άλλους. Επίσης, ο σωστός τρόπος παρασκευής και μαγειρέματος των τροφίμων μπορεί να εξαλείψει την επικινδυνότητα ορισμένων παρασίτων.

Καθένας από τους τύπους μεθόδων που αναλύθηκαν έχει τα πλεονεκτήματά του και τα μειονεκτήματά του. Η αξιοπιστία της μεθόδου εξαρτάται επίσης από τη σωστή δειγματοληψία και την προπαρασκευή του δείγματος. Συνήθως, οι συνδυασμένες μέθοδοι ανίχνευσης χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τον σκοπό της ανίχνευσης, τους πόρους και την εξειδίκευση του εργαστηρίου. Σε κάθε περίπτωση, η επιστημονική ακρίβεια, η ακρίβεια των αποτελεσμάτων και η συμμόρφωση με τις κατευθυντήριες γραμμές είναι ζωτικής σημασίας για την αξιοπιστία της μεθόδου ανίχνευσης που χρησιμοποιείται.

Βιβλιογραφία

- (M Bouzid, 2014, Detection of Food- and Waterborne Parasites: Conventional Methods and Recent Developments)
- (M. Ellin Doyle, 2003, Foodborne Parasites - A Review of the Scientific Literature Review)
- Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, Dabritz H, Hill D, Klein PN, et al. The one health approach to toxoplasmosis: epidemiology, control, and prevention strategies. *Ecohealth*. 2019;16:378–90.
- Ahmed SA, Karanis P. An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. *Parasitol Res*. 2018;117:629–53.
- Alemu G, Mama M, Misker D, Haftu D. Parasitic contamination of vegetables marketed in Arba Minch town, southern Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2019;19:410.
- Altintas N. 2003. Past to present: echinococcosis in Turkey. *Acta Tropica* 85:105–112.
- Amorós I, Alonso JL, Cuesta G. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardiacysts* on salad products irrigated with contaminated water. *J Food Prot*. 2010;73:1138–40.

- Ancelle T, Dupouy-Camet J, Heyer F, Faurant C, Lapierre J, Parham G, Leese W, and Leighty JC. 1986. Horsemeat-associated trichinosis — France. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 35:291–292; 297–298.
- Ando K. 1994. The influences of global environmental changes on nematodes. *Japanese Journal of Parasitology* 43:477–482.
- Anon. 1990. Walrus without tears. *Lancet* 335:202–203.
- Anonymous, 2001. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency.
- Anonymous, 2010. The Microbiology of Drinking Water – Part 14-Methods for the Isolation, Identification and Enumeration of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts. Environment Agency.
- Anonymous, 2011. Staining Procedures. Health Protection Agency. UK Standards for Microbiology Investigations.
- Anonymous, 2012. Investigation of Specimens Other Than Blood for Parasites. Health Protection Agency. UK Standards for Microbiology Investigations.
- Anuar TS, Al-Mekhlaf HM, Abdul Ghani MK, Abu Bakar E, Azreen SN, Salleh FM, et al. Molecular epidemiology of amoebiasis in Malaysia: highlighting the different risk factors of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections among Orang Asli communities. *International Journal of Parasitology*. 2012;42:1165–75.
- Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, and Olson ME. 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology* 112:289–294.
- Arimatsu, Y., Kaewkes, S., Laha, T. et al. (2012) Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* copro-DNA using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitology International*, 61(1), 178–182.
- Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, and Sims PFG. 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction — food for thought? *International Journal of Parasitology* 32:1193–1199.
- Atterby, H., Learmount, J., Conyers, C. et al. (2009) Development of a real-time PCR assay for the detection of *Trichinella spiralis* in situ. *Veterinary Parasitology*, 161(1), 92–98.
- Audicana MT, Ansotegui IJ, de Corres LF, and Kennedy MW. 2002. *Anisakis simplex*: dangerous — dead and alive? *Trends in Parasitology* 18:20–25.
- Azim A, Ahmed S, Paul SK, Nasreen SA, Sarkar SR, Ahmed MU, et al. Prevalence of intestinal parasites in raw vegetables consumed by inhabitants of Mymensingh City. *Mymensingh Medical Journal*. 2018;27:440–4.
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004–2010. *Water Research* 45 (20), 6603–6614.

- Barwick RS, Uzicanin A, Lareau S, Malakmadze N, Imnadze P, Iosava M, Ninashvili N, Wilson M, Hightower AW, Johnston S, Bishop H, Petri WA Jr, and Juranek DD. 2002. Outbreak of amebiasis in Tbilisi, Republic of Georgia, 1998. *Am J Trop Med Hyg* 67:623–31.
- Bekele F, Shumbej T. Fruit and vegetable contamination with medically important helminths and protozoans in Tarcha town, Dawuro zone, South West Ethiopia. *Res Rep Trop Med*. 2019;10:19–23.
- Bern C, Hernandez B, Lopez MB, Arrowood MJ, de Mejia MA, de Merida AM, Hightower AW, Venczel L, Herwaldt BL, and Klein RE. 1999. Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *Emerg Infect Dis* 5:766–774.
- Bern C, Ortega Y, Checkley W, Roberts JM, Lescano AG, Cabrera L, Verastegui M, Black RE, Sterling C, and Gilman RH. 2002. Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in Peruvian children. *Emerg Infect Dis* 8:581–585.
- Blessmann J, Van LP, Nu PAT, Thi HD, MullerMyhsok B, Buss H, and Tannich E. 2002. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 66:578–583.
- Bouzid M, Kintz E, Hunter PR. Risk factors for *Cryptosporidium* infection in low and middle income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006553.
- Bouzid, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews* 26 (1), 115–134.
- Bouzid, M., Steverding, D., Tyler, K.M., 2008. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Current Opinion in Biotechnology* 19 (3), 302–306.
- Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaacrenton JL, Bell A, Eng SB, and Marion SA. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 350:173–177.
- Brinkman, N., Francisco, R., Nichols, T. et al. (2013) Detection of multiple waterborne pathogens using microsequencing arrays. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 564–573.
- Burnett AJ, Shortt SG, Isaacrenton J, King A, Werker D, and Bowie WR. 1998. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* 105:1032–1037.
- Cabaret J, Geerts S, Madeline M, Ballandonne C, and Barbier D. 2002. The use of urban sewage sludge on pastures: the cysticercosis threat. *Vet Res* 33: 575–597.
- Cai, X., Xu, M., Wang, Y. et al. (2010) Sensitive and rapid detection of *Clonorchis sinensis* infection in fish by

loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitology research*, 106(6), 1379–1383.

- Campbell AT and Wallis P. 2002. The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. *Water Res* 36:963–969.
- Caradonna T, Marangi M, Del Chierico F, Ferrari N, Reddel S, Bracaglia G. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiol.* 2017;67:67–75.
- Carpio A. 2002. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect Dis* 2:751–762.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2000. Surveillance for foodborne-disease outbreaks — United States, 1993–1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49:1–62.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2003. Trichinosis Surveillance — United States, 1997–2001. *Surveillance Summaries* 52:1–8.
- Centers for Disease Control. 1992. Locally acquired neurocysticercosis — North Carolina, Massachusetts, and South Carolina, 1989–1991. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 41:1–4.
- Centers for Disease Control. 1999. Trichinellosis outbreaks — North Rhine-Westphalia, Germany, 1998–1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 48:488–492.
- Centers for Disease Control. 2000. Giardiasis surveillance — United States, 1992–1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49:1–13.
- Chen, J., Tang, J., Liu, J. et al. (2012) Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 112(4), 823–830.
- Chen, Y., Wen, T., Lai, D.H. et al. (2013) Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Clonorchis sinensis* from its first intermediate hosts, freshwater snails. *Parasitology*, 140(11), 1377–1383.
- Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, Cho SY, and Dubey JP. 1997. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis* 175:1280–1282.
- Colli CM, Bezagio RC, Nishi L, Bignotto TS, Ferreira EC, Falavigna-Guilherme AL, et al. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. *PLoS One*. 2015;10:e0118065.
- Connelly, J.T., Baeumner, A.J., 2012. Biosensors for the detection of waterborne pathogens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (1), 117–127.

- Connor BA, Johnson E, and Soave R. 2001. Reiter syndrome following protracted symptoms of Cyclospora infection. *Emerg Infect Dis* 7:453–454.
- Cook, N., Paton, C.A., Wilkinson, N., Nichols, R.A., Barker, K., Smith, H.V., 2006. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: development and optimization of methods. *International Journal of Food Microbiology* 109 (3), 215–221.
- Cook, N., Paton, C.A., Wilkinson, N., Nichols, R.A., Barker, K., Smith, H.V., 2006. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 2: validation. *International Journal of Food Microbiology* 109 (3), 222–228.
- Cornejo W, Huiza A, Espinoza Y, Alva P, Sevilla C, and Centurion W. 2000. Paragonimosis in the Cajabamba and Condebamba districts, Cajamarca, Peru. *Rev Instit Med Trop Sao Paulo* 42(5):245–247.
- Corso PS, Kramer MH, Blair KA, Addiss DG, Davis JP, and Haddix AC. 2003. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 9:426–431.
- Cox P, Fisher I, Kastl G, Jegatheesan V, Warnecke M, Angles M, Bustamante H, Chiffings T, and Hawkins PR. 2003. Sydney 1998 — Lessons from a drinking water crisis. *Journal American Water Works Association* 95:147–161.
- Crompton DWT and Nesheim MC. 2002. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Ann Rev Nutr* 22:35–59.
- Cui J, Wang ZQ, Wu F, and Jin XX. 1998. An outbreak of paragonimiosis in Zhengzhou city, China. *Acta Tropica* 70:211–216.
- Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba* spp. *Infect Genet Evol.* 2019;75:104018.
- Daschner A, Cuéllar C, Sánchez-Pastor S, Pascual CY, and Martín-Esteban M. 2002. Gastro-allergic anisakiasis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response. *Parasit Immunol* 24:243–251.
- de Freitas, C. G., Santana, Â. P., da Silva, P. H. C. et al. (2010) PCR multiplex for detection of *Salmonella* enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1), 15–22.
- De Silva S, Saykao P, Kelly H, MacIntyre CR, Ryan N, Leydon J, and Biggs BA. 2002. Chronic *Strongyloides stercoralis* infection in Laotian immigrants and refugees 7–20 years after resettlement in Australia. *Epidemiol Infect* 128:439–444.
- DeFrain M and Hooker R. 2002. North American paragonimiasis — Case report of a severe clinical infection.

Chest 121:1368–1372.

- Deng MQ and Cliver DO. 1999. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. *Int J Food Microbiol* 46:113–121.
- Dick TA, Nelson PA, and Choudhury A. 2001. Diphyllbothriasis: update on human cases, foci, patterns, and sources of human infections and future considerations. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 32:59–76.
- Dubey JP, Gamble HR, Hill D, Sreekumar C, Romand S, and Thulliez P. 2002. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *J Parasitol* 88:1234–1238.
- Dubey JP, Saville WJA, Stanek JF, and Reed SM. 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. *J Parasitol* 88:802–803.
- Duedu KO, Yarnie EA, Tetteh-Quarcoo PB, Attah SK, Donkor ES, Ayeh-Kumi PF. A comparative survey of the prevalence of human parasites found in fresh vegetables sold in supermarkets and open-aired markets in Accra, Ghana. *BMC Res Notes*. 2014;7:836.
- DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, and Jakubowski W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New Engl J Med* 332:855–859.
- Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol*. 2016;34:47–52.
- Eraky MA, Rashed SM, Nasr Mel S, El-Hamshary AM, Salah El-Ghannam A. Parasitic contamination of commonly consumed fresh leafy vegetables in Benha, Egypt. *J Parasitol Res*. 2014;2014:613960.
- Esteban JG, González C, Bargues MD, Angles R, Sánchez C, Náquira C, and Mas-Coma S. 2002. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Trop Med Int Health* 7:339–348.
- Falcão H, Lunet N, Neves E, and Barros H. 2002. Do only live larvae cause *Anisakis simplex* sensitization? *Allergy* 57:44.
- Fan PC. 1997. Annual economic loss caused by *Taenia saginata asiatica* taeniasis in east Asia. *Parasitol Today* 13:194–196.
- Farag HF. 1998. Human fascioliasis in some countries of the Eastern Mediterranean Region. *East Medit Health J* 4:159–160.
- Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, and Farley CA. 1998. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 64:1070–1074.

- Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Santin M, Zhou L, Lal AA, and Xiao L. 2003. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitol Res* 89:141–145.
- Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Xiao L, Lal A, Jenkins MC, and Graczyk TK. 2002. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. *Parasitol Res* 88:998–1003.
- Feng Y, Ryan UM, Xiao L. Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol.* 2018;34:997–1011.
- Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:110–40.
- Figgatt M, Mergen K, Kimelstein D, Mahoney DM, Newman A, Nicholas D, et al. Giardiasis outbreak associated with asymptomatic food handlers in New York State, 2015. *J Food Prot.* 2017;12:837–41.
- Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., 2012. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 25 (3), 420–449.
- Fleury A, Gomez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarria A, Mezo RAC, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciutto E, and Fragoso G. 2003. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 22(2):139–145.
- Foti C, Nettis E, Cassano N, Di Mundo I, and Vena GA. 2002. Acute allergic reactions to *Anisakis simplex* after ingestion of anchovies. *Acta DermatoVenereologica* 82:121–123.
- Fox KR and Lytle DA. 1996. Milwaukee's crypto outbreak — investigation and recommendations. *J Am Water Works Assn* 88:87–94.
- Freire-Santos F, Gomez-Couso H, Ortega-Inarrea MR, Castro-Hermida JA, Oteiza-Lopez AM, Garcia-Martin O, and Ares-Mazas ME. 2002. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). *Parasitol Res* 88:130–133.
- Friedman DE, Patten KA, Rose JB, and Barney MC. 1997. The potential for *Cryptosporidium parvum* oocyst survival in beverages associated with contaminated tap water. *J Food Safety* 17:125–132.
- Fryauff DJ, Krippner R, Prodjodipuro P, Ewald C, Kawengian S, Pegelow K, Yun T, von Heydwohlf-Wehnert C, Oyofu B, and Gross R. 1999. *Cyclospora cayentanensis* among expatriate and indigenous populations of West Java, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 5:585–588.
- Gabre RM, Shakir A. Prevalence of some human enteroparasites in commonly consumed raw vegetables in Tabuk, Saudi Arabia. *J Food Prot.* 2016;79:655–8.

- Garcia HH, Evans CAW, Nash TE, Takayanagui OM, White AC, Botero D, Rajshekhar V, Tsang VCW, Schantz PM, Allan JC, Flisser A, Correa D, Sarti E, Friedland JS, Martinez SM, Gonzalez AE, Gilman RH, and Del Brutto OH. 2002. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin Microbiol Rev* 15:747–756.
- Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, Verastegui M, Rodriguez S, Gavidia C, Tsang VCW, Falcon N, Lescano AG, Moulton LH, Bernal T, and Tovar M. 2003. Hyperendemic human and porcine *Taenia solium* infection in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 68(3):268–275.
- Garrido-Gonzalez E, Zurabian R, and Acuna-Soto R. 2002. Cyst production and transmission of *Entamoeba* and *Endolimax*. *Trans Royal Soc Med Hyg* 96:119–123.
- Gentile JM, Gentile GJ, Nannenga B, Johnson M, Blankespoor H, and Montero R. 1998. Enhanced liver cell mutations in trematode-infected Big Blue(r) transgenic mice. *Mut Res* 400:355–360.
- Giangaspero A, Gasser RB. Human cyclosporiasis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19:e226–36.
- Giangaspero A, Marangi M, Koehler AV, Papini R, Normanno G, Lacasella V, et al. Molecular detection of *Cyclospora* in water, soil, vegetables and humans in southern Italy signals a need for improved monitoring by health authorities. *Int J Food Microbiol*. 2015;211:95–100.
- Gofti-Laroche L, Demanse D, Joret JC, and Zmirou D. 2003. Health risks and parasitological quality of water. *Journal American Water Works Association* 95:162–172.
- Goldstein ST, Juranek DD, Ravenholt O, Hightower AW, Martin DG, Mesnik JL, Griffiths SD, Bryant AJ, Reich RR, and Herwaldt BL. 1996. Cryptosporidiosis — an outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. *Ann Int Med* 124:459–468.
- Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Tabares E, Lopez-Rodas V, and Costas E. 2000. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Environ Microbiol* 66:1866–1870.
- Gomez-Couso H, Freire-Santos F, Ortega-Inarrea MR, Castro-Hermida JA, and Ares-Mazas ME. 2003. Environmental dispersal of *Cryptosporidium parvum* oocysts and cross transmission in cultured bivalve molluscs. *Parasitology Research* 90:140–142.
- Gorski, L., Csordas, A. (2009) *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*, CRC Press.
- Gottstein B and Reichen J. 2002. Hydatid lung disease (echinococcosis/hydatidosis). *Clin Chest Med* 23:397–408.
- Graczyk TK, Fayer R, Cranfield MR, and Conn DB. 1998. Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Appl Environ Microbiol* 64:427–430.

- Graczyk TK, Gilman RH, and Fried B. 2001. Fasciolopsiasis: is it a controllable food-borne disease? *Parasitol Res* 87:80–83.
- Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, and Veal DA. 2003. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 68:228–232.
- Greenbloom SL, Martin Smith P, Isaacs S, Marshall B, Kittle DC, Kain KC, and Keystone JS. 1997. Outbreak of trichinosis in Ontario secondary to the ingestion of wild boar meat. *Can J Pub Health* 88:52–56.
- Guerrant RL, Kosek M, Moore S, Lorntz B, Brantley R, and Lima AAM. 2002. Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Archives of Medical Res* 33: 351–355.
- Guichard D, Flori P, Raberin H, Gallot B, Lang B, and Sung RTM. 2002. Four cases of *Fasciola hepatica* fascioliasis reported in Haute-Loire, France. *Med Malad Infect* 32:190–195.
- Han ET, Guk SM, Kim JL, Jeong HJ, Kim SN, and Chai JY. 2003. Detection of parasite eggs from archaeological excavations in the Republic of Korea. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:123–126.
- Hancock CM, Rose JB, and Callahan M. 1998. Crypto and Giardia in US groundwater. *J Am Water Works Assoc* 90:58–61.
- Haque R, Duggal P, Ali IM, Hossain MB, Mondal D, Sack RB, Farr BM, Beaty TH, and Petri WA. 2002. Innate and acquired resistance to amebiasis in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 186:547–552.
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, and Petri WA. 2003. Amebiasis. *New Engl J Med* 348: 565–1573.
- Haseeb AN, el-Shazly AM, Arafa MA, and Morsy AT. 2002. A review on fascioliasis in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 32:317–354.
- Hayes SL, Rice EW, Ware MW, and Schaefer FW. 2003. Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts. *J Appl Microbiol* 94: 54–59.
- Heitman TL, Frederick LM, Viste JR, Guselle NJ, Morgan UM, Thompson RCA, and Olson ME. 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Can J Microbiol* 48:530–541.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. et al. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4), 413–417.
- Hill D and Dubey JP. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8:634–640.

- Hill M. 2003. GN tests for trichinosis infection in walrus tongues. *Nunatsiaq News*, January 31, 2003. Iqaluit, Canada.
- Hillyer GV and Apt W. 1997. Food-borne trematode infections in the Americas. *Parasitol Today* 13:87–88.
- Hoberg EP. 2002. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microb Infect* 4:859–866.
- Holm P and Kristoffersen EK. 2002. A Scandinavian case of domestically acquired human fascioliasis. *Scand J Inf Dis* 34:548–550.
- Hoorfar, J. (2011) Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. *Apmis*, 119(s133), 1–24.
- Hosseini SA, Amouei A, Sharif M, Sarvi Sh, Galal L, Javidnia J, et al. Human toxoplasmosis: a systematic review for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in clinical samples. *Epidemiol Infect.* 2018;147:e36.
- Hoxie NJ, Davis JP, Vergeront JM, Nashold RD, and Blair KA. 1997. Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Pub Health* 87:2032–2035.
- Hughes AJ and Biggs BA. 2002. Parasitic worms of the central nervous system: an Australian perspective. *Intern Med J* 32:541–553.
- Hughes AJ, Spithill TW, Smith RE, Boutlis CS, and Johnson PDR. 2003. Human fasciolosis acquired in an Australian urban setting. *Med J Austr* 178:244–245.
- Hussain MA, Stitt V, Szabo EA, Nelan B. *Toxoplasma gondii* in the food supply. *Pathogens.* 2017;6:21.
- Ito A, Putra MI, Subahar R, Sato MO, Okamoto M, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Nakaya K, Craig PS, and Margono SS. 2002. Dogs as alternative intermediate hosts of *Taenia solium* in Papua (Irian Jaya), Indonesia confirmed by highly specific ELISA and immunoblot using native and recombinant antigens and mitochondrial DNA analysis. *J Helminthol* 76:311–314.
- Junichi G. 1994. Changes of living habits related to the infection in human paragonimiasis in Japan, based on the epidemiological data. *Jap J Parasitol* 43:462–470.
- Kantor M, Abrantes A, Estevez A, Schiller A, Torrent J, Gascon J, et al. *Entamoeba histolytica*: updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2018:4601420.
- Karanis, P., Ongerth, J. (2009) LAMP: A powerful and flexible tool for monitoring microbial pathogens. *Update*, 25(11), 498–499.

- Karl H, Meyer C, Banneke S, Sipos G, Bartelt E, Lagrange F, Jark U, and Feldhusen F. 2002. The abundance of nematode larvae *Anisakis* sp in the flesh of fishes and possible post-mortem migration. *Arch Lebensmittelhyg* 53:118–120.
- Kerambrun, E., Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A. et al. (2015) Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(2), 498–508.
- Kern P, Bardonnnet K, Renner E, Auer H, Pawlowski Z, Ammann RW, and Vuitton DA. 2003. European echinococcosis registry: Human alveolar echinococcosis, Europe, 1982–2000. *Emerg Infect Dis* 9:343–349.
- Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop*. 2018;184:1–14.
- Kim SR, Maekawa Y, Matsuoka T, Imoto S, Ando K, Mita K, Kim HB, Nakajima T, Ku KS, Koterazawa T, Fukuda K, Yano Y, Nakaji M, Kudo M, Kim KI, Hirai M, and Hayashi Y. 2002. Eosinophilic pseudotumor of the liver due to *Ascaris suum* infection. *Hepato Res* 23:306–314.
- Kimura S, Takagi Y, and Gomi K. 1999. IgE response to *Anisakis* compared to seafood. *Allergy* 54:1225–1226.
- Kithuka JM, Maingi N, Njeruh FM, and Ombui JN. 2002. The prevalence and economic importance of bovine fasciolosis in Kenya — an analysis of abattoir data. *Onderst J Vet Res* 69:255–262.
- Kniel KE, Lindsay DS, Sumner SS, Hackney CR, Pierson MD, and Dubey JP. 2002. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *J Parasitol* 88:790–793.
- Kolářiová L. 2001. Central nervous system as a target of helminth migration in humans. *Helminthologia* 38:237–241.
- Kostas Koutsoumanis, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, Robert Davies, Alessandra De Cesare, Lieve Herman, Friederike Hilbert, Roland Lindqvist, Maarten Nauta, Luisa Peixe, Giuseppe Ru, Marion Simmons, Panagiotis Skandamis, Elisabetta Suffredini, Simone Caccio, Rachel Chalmers, Peter Deplazes, Brecht Devleesschauwer, Elisabeth Innes, Thomas Romig, Joke van der Giessen, Michaela Hempen, Yves Van der Stede and Lucy Robertson, 2018, Public health risks associated with food-borne parasites.
- Lass A, Ma L, Kontogeorgos I, Zhang X, Li X, Karanis P. First molecular detection of *Toxoplasma gondii* in vegetable samples in China using qualitative, quantitative real-time PCR and multilocus genotyping. *Sci Rep*. 2019;9:17581.
- Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:1101–8.

- Leber AL. 2000. Intestinal amebae. *Clin Lab Med* 19:601–619.
- Lee SH, Levy DA, Craun BF, Beach MJ, and Calderon BF. 2002. Surveillance for water borne disease outbreaks — United States — 1999–2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 51:1–28.
- Li J, Shi K, Sun F, Li T, Wang R, Zhang S, et al. Identification of human pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*, *Cyclospora cayentanensis*, and *Cryptosporidium parvum* on the surfaces of vegetables and fruits in Henan, China. *Int J Food Microbiol.* 2019;307:108292.
- Lindsay DS, Blagburn BL, and Dubey JP. 2002. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Vet Parasitol* 103:309–313.
- Lindsay DS, Phelps KK, Smith SA, Flick G, Sumner SS, and Dubey JP. 2001. Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J Euk Microbiol* 197S–198S.
- Liu, J., Gratz, J., Amour, C., Kibiki, G., Becker, S., Janaki, L., Verweij, J.J., Taniuchi, M., Sobuz, S.U., Haque, R., Haverstick, D.M., Houpt, E.R., 2012. A laboratory developed TaqMan array card for simultaneous detection of nineteen Enteropathogens. *Journal of Clinical Microbiology* (Epub ahead of print).
- Lopez, I., Pardo, M. A. (2010) Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1469–1477.
- Lowery CJ, Nugent P, Moore JE, Millar BC, Xiru X, and Dooley JSG. 2001. PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiol Infect* 127:545–553.
- Lund BM, Baird-Parker TC, and Gould GW. 2000. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Lundén A, Lind P, Engvall EO, Gustavsson K, Uggla A, and Vågsholm I. 2002. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scand J Inf Dis* 34:362–365.
- Lunestad BT. 2003. Absence of nematodes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *J Food Prot* 66:122–124.
- M'rad S, Chaabane-Banaoues R, Lahmar I, Oumaima H, Mezhoud H, Babba H, et al. Parasitological contamination of vegetables sold in Tunisian retail markets with helminth eggs and protozoan cysts. *J Food Prot.* 2020;83:1104–9.
- Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox

- KR, Rose JB, and Davis JP. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Engl J Med* 331:161–167.
- Magnaval JF, Berry A, and Nadrigny M. 2002. Anaphylactic shock revealing anisakiasis. *Presse Med* 31:1309–1311.
 - Marchioro AA, Tiyo BT, Colli CM, de Souza CZ, Garcia JL, Gomes ML, et al. First detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the fresh leaves of vegetables in South America. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016;16:624–6.
 - Mas-Coma MS, Esteban JG, and Bargues MD. 1999. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull WHO* 77:340–346.
 - McCarthy, J. S., Lustigman, S., Yang, G.J. et al. (2012) A research agenda for helminth diseases of humans: diagnostics for control and elimination programmes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4), e1601.
 - McClelland G, Misra RK, and Martell DJ. 2000. Spatial and temporal distributions of larval sealworm (*Pseudoterranova decipiens*, Nematoda: Anisakinae), in *Hippoglossoides platessoides* (Pleuronectidae) in eastern Canada from 1980 to 1990. *ICES J Marine Sci* 57:69–88.
 - McClelland G. 2002. The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *Parasitology* 124:S183–S203.
 - Meehan AM, Virk A, Swanson K, and Poeschla EM. 2002. Severe pleuropulmonary paragonimiasis 8 years after emigration from a region of endemicity. *Clin Infect Dis* 35:87–90.
 - Mohamed MA, Siddig EE, Elaagip AH, Edris AM, Nasr AA. Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets in Khartoum state, Sudan. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15:17.
 - Moore SR, Lima AAM, Conaway MR, Schorling JB, Soares AM, and Guerrant RL. 2001. Early childhood diarrhoea and helminthiasis associate with long-term linear growth faltering. *Int J Epidemiol* 30:1457–1464.
 - Motarjemi Y. 2002. Chronic sequelae of foodborne infections, p. 501–513. In Blackburn C deW and McClure PJ (eds.), *Foodborne Pathogens*. CRC Press, Boca Raton, FL.
 - Nakamura-Uchiyama F, Mukae H, and Nawa Y. 2002. Paragonimiasis: a Japanese perspective. *Clin Chest Med* 23:409–420.
 - Nasser AM, Zaruk N, Tenenbaum L, and Netzan Y. 2003. Comparative survival of *Cryptosporidium*, coxsackievirus A9 and *Escherichia coli* in stream, brackish-and sea waters. *Water Sci Technol* 47:91–96.
 - Naumova EN, Egorov AI, Morris RD, and Griffiths JK. 2003. The elderly and waterborne *Cryptosporidium* infection: Gastroenteritis hospitalizations before and during the 1993 Milwaukee outbreak. *Emerg Infect Dis*

9:418–425.

- Nguekam JP, Zoli AP, Zogo PO, Kamga ACT, Speybroeck N, Dorny P, Brandt J, Losson B, and Geerts S. 2003. A seroepidemiological study of human cysticercosis in West Cameroon. *Trop Med Int Health* 8:144–149.
- Nichols GL. 2000. Food-borne protozoa. *Brit Med Bull* 56:209–235.
- Nichols R and Smith H. 2002. Parasites: Cryptosporidium, Giardia, and Cyclospora as foodborne pathogens, p. 453–478. In Blackburn C deW and McClure PJ (eds.), *Foodborne Pathogens*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nicoletti A, Bartoloni A, Reggio A, Bartalesi F, Roselli M, Sofia V, Chavez JR, Barahona HG, Paradisi F, Cancrini G, Tsang VCW, and Hall AJ. 2002. Epilepsy, eysticercosis, and toxocarasis — A population-based case-control study in rural Bolivia. *Neurology* 58:1256–1261.
- Noormahomed EV, Pividal JG, Azzouz S, Mascaro C, Delgado-Rodriguez M, and Osuna A. 2003. Seroprevalence of anti cysticercus antibodies among the children living in the urban environs of Maputo, Mozambique. *Ann Trop Med Parasitol* 97:31–35.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H. et al. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63–e63.
- Okhuysen PC and Chappell CL. 2002. Cryptosporidium virulence determinants — are we there yet? *Int J Parasitol* 32:517–525.
- Ong S, Talan DA, Moran GJ, Mower W, Newdow M, Tsang VCW, and Pinner RW. 2002. Neurocysticercosis in radiographically imaged seizure patients in US emergency departments. *Emerg Infect Dis* 8(6):608–613.
- Onu JE. 2001. Fasciolosis and bovine liver condemnation in Sokoto metropolitan abattoir. *J Appl Anim Res* 20:251–254.
- Orlandi PA, Chu DMT, Bier JW, and Jackson GJ. 2002. Parasites and the food supply. *Food Technol* 56:72–81.
- Ortega YR, Sanchez R. Update on Cyclospora cayetanensis, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:218–34.
- Park, C.H., Kim, J.P., Lee, S.W., Jeon, N.L., Yoo, P.J., Sim, S.J., 2009. A direct, multiplex biosensor platform for pathogen detection based on cross-linked polydiacetylene (PDA) supramolecules. *Advanced Functional Materials* 19 (23), 3703–3710.
- Paul M. Outbreak of Trichinella in Poland. 2003. <http://www.promedmail.org>; archive number 20030302.0526
- Pecquet C, Danis M, and Leynadier F. 2002. Anisakis simplex and immediate hypersensitivity reactions. *Ann Dermatol Venereol* 129:303–305.

- Phabmixay V, Wintermeyer LA, Kiser D, Overby T, Landry S, Caplen C, Mays B, Branch L, and Miller GB Jr. 1991. *Trichinella spiralis* infection — United States, 1990. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 40:57–60.
- Phiri IK, Dorny P, Gabriel S, Willingham AL, Speybroeck N, and Vercruysse J. 2002. The prevalence of porcine cysticercosis in eastern and southern provinces of Zambia. *Veterinary Parasitology* 108:31–39.
- Piccolo G, Manfredi MT, Hoste L, and Vercruysse J. 1999. Anisakidae larval infection in fish fillets sold in Belgium. *Veterinary Quarterly* 21:66–67.
- Podolska M and Horbowy J. 2003. Infection of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) with *Anisakis simplex* larvae, 1992–1999: a statistical analysis using generalized linear models. *ICES Journal of Marine Science* 60:85–93.
- Powell, H., Gooding, C., Garrett, S. et al. (1994) Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 18(1), 59–61.
- Prasad KN, Chawla S, Jain D, Pandey CM, Pal L, Pradhan S, and Gupta RK. 2002. Human and porcine *Taenia solium* infection in rural north India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96:515–516.
- Procop GW, Marty AM, Scheck DN, Mease DR, and Maw GM. 2000. North American paragonimiasis — A case report. *Acta Cytologica* 44:75–80.
- Rafael K, Marchioro AA, Colli CM, Tiyo BT, Evangelista FF, Bezagio RC, et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* in vegetables cultivated with organic and chemical fertilizer from street markets and community vegetable gardens in a region of southern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;111:540–5.
- Ramirez, N. E., Sreevatsan, S. (2006) Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Veterinary Parasitology*, 136(3), 201–213.
- Reinhard K and Urban O. 2003. Diagnosing ancient diphyllorhynchiasis from Chinchorro mummies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(Suppl 1):191–193.
- Richardson RF, Remler BF, Katirji B, and Murad MH. 1998. Guillain-Barre syndrome after *Cyclospora* infection. *Muscle Nerve* 21:669–671.
- Roberts T, Murrell KD, and Marks S. 1994. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. *Parasitology Today* 10:419–423.
- Robertson LJ and Gjerde B. 2000. Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. *Journal of Food Protection* 63:775–778.
- Robertson LJ, Gjerde B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of Food Protection*. 2001;64:1793–8.

- Robertson LJ, Johannessen GS, Gjerde BK, and Loncarevic S. 2002. Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. *Int J Food Microbiol* 75:119–126.
- Roig GVG. 2002. Hepatic fascioliasis in the Americas: a new challenge for therapeutic endoscopy. *Gastroint Endoscop* 56:315–317.
- Rose JB and Slifko TR. 2000. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: A review. *J Food Prot* 62:1059–1070.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K. et al. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1), 37–45.
- Ryan U, Hijjawi N, Feng Y, Xiao L. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *Int J Parasitol*. 2018;49:1–11.
- Rzezutka A, Nichols RA, Connelly L, Kaupke A, Kozyra I, Cook N, et al. *Cryptosporidium* oocysts on fresh produce from areas of high livestock production in Poland. *Int J Food Microbiol*. 2010;139:96–101.
- Sakakibara A, Baba K, Niwa S, Yagi T, Wakayama H, Yoshida K, Kobayashi T, Yokoi T, Hara K, Itoh M, and Kimura E. 2002.
- Visceral larva migrans due to *Ascaris suum* which presented with eosinophilic pneumonia and multiple intra-hepatic lesions with severe eosinophil infiltration — Outbreak in a Japanese area other than Kyushu. *Intern Med* 41:574–579.
- Sakanari JA and McKerrow JH. 1989. Anisakiasis. *Clin Microbiol Rev* 2:278–284.
- Sanpool, O., Intapan, P. M., Thanchomng, T. et al. (2012) Rapid detection and differentiation of *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* eggs in human fecal samples using a duplex real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. *Parasitology Research*, 111(1), 89–96.
- Sasaki M, Kamiyama T, Yano T, NakamuraUchiyama F, and Nawa Y. 2002. Active hepatic capsulitis caused by *Paragonimus westermani* infection. *Int Med* 41:661–663.
- Schuster R, Petrini JL, and Choi R. 2003. Anisakiasis of the colon presenting as bowel obstruction. *American Surgeon* 69:350–352.
- Schwab, K. J., McDevitt, J. J. (2003) Development of a PCR-enzyme immunoassay oligoprobe detection method for *Toxoplasma gondii* oocysts, incorporating PCR controls. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5819–5825.
- Seimenis A. 2003. Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta*

Tropica 85:191–195.

- Shahnazi M, Jafari-Sabet M. Prevalence of parasitic contamination of raw vegetables in villages of Qazvin Province, Iran. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7:1025–30.
- Shamsuzzaman SM and Hashiguchi Y. 2002. Thoracic amebiasis. *Clin Chest Med* 23:479–492.
- Sharif M, Amouei A, Sarvi S, Mizani A, Aarabi M, Hosseini SA, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from ruminants: a systematic review. *Int J Food Microbiol.* 2017;258:38–49.
- Sim S, Won J, Kim JW, Kim K, Park WY, Yu JR. Simultaneous molecular detection of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* from raw vegetables in Korea. *Korean J Parasitol.* 2017;55:137–42.
- Sitotaw B, Mekuriaw H, Damtie D. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among Jawi primary school children, Jawi town, north-west Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2019;19:341.
- Skotarczak, B. (2009) Methods for parasitic protozoans detection in the environmental samples. *Parasite*, 16(3), 183–190.
- Slany M, Dziedzinska R, Babak V, Kralik P, Moravkova M, Slana I. *Toxoplasma gondii* in vegetables from fields and farm storage facilities in the Czech Republic. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366:fnz170.
- Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology* 30 (12–13), 1379–1393.
- Smith JL. 1997. Long-term consequences of foodborne toxoplasmosis — effects on the unborn, the immunocompromised, the elderly, and the immunocompetent. *J Food Prot* 60:1595–1611.
- Stanley SL. 2003. Amoebiasis. *Lancet* 361:1025–1034.
- Szostakowska B, Myjak P, and Kur J. 2002. Identification of anisakid nematodes from the Southern Baltic Sea using PCR-based methods. *Molec Cell Probes* 16:111–118
- Tang, J., Lin, R., Zhu, X. (2007) *Clonorchis sinensis* infection in animals in China. *Chinese Journal of Zoonoses*, 23(2), 177–179. [In Chinese].
- Tefera T, Biruksew A, Mekonnen Z, Eshetu T. Parasitic contamination of fruits and vegetables collected from selected local markets of Jimma town, southwest Ethiopia. *Int Sch Res Notices.* 2014;2014:382715.
- Theis JH, Cleary M, Syvanen M, Gilson A, Swift P, Banks J, and Johnson E. 1996. DNA-confirmed *Taenia solium* cysticercosis in black bears (*Ursus americanus*) from California. *Am J Trop Med Hyg* 55:456–458.

- Thurston-Enriquez JA, Watt P, Dowd SE, Enriquez J, Pepper IL, and Gerba CP. 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J Food Prot* 65:378–382.
- Tiyo R, de Souza CZ, Arruda Piovesani AF, Tiyo BT, Colli CM, Marchioro AA, et al. Predominance of *Giardia duodenalis* assemblage AII in fresh leafy vegetables from a market in southern Brazil. *J Food Prot.* 2016;79:1036–9.
- Torgerson PR and Budke CM. 2003. Echinococcosis — an international public health challenge. *Res Vet Sci* 74:191–202.
- Torgerson PR, Karaeva RR, Corkeri N, Abdyjaparov TA, Kuttubaev OT, and Shaikenov BS. 2003. Human cystic echinococcosis in Kyrgyzstan: an epidemiological study. *Acta Tropica* 85:51–61.
- Tram NT, Hoang LM, Cam PD, Chung PT, Fyfe MW, Isaac-Renton JL, et al. *Cyclospora* spp. in herbs and water samples collected from markets and farms in Hanoi, Vietnam. *Trop Med Int Health.* 2008;13:1415–20.
- Traub, R. J., Macaranas, J., Mungthin, M. et al. (2009) A new PCR-based approach indicates the range of *Clonorchis sinensis* now extends to Central Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(1), 1–7.
- Utaaker KS, Kumar A, Joshi H, Chaudhary S, Robertson LJ. Checking the detail in retail: occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on vegetables sold across different counters in Chandigarh, India. *Int J Food Microbiol.* 2017;263:1–8.
- van der logt PB, Hathaway SC, and Vose DJ. 1997. Risk assessment model for human infection with the cestode *Taenia saginata*. *J Food Prot* 60:1110–1119.
- Vélez ID, Ortega JE, and Velásquez LE. 2002. Paragonimiasis: a view from Columbia. *Clin Chest Med* 23:421–431.
- Vollbrecht A, Sokolowski D, Hollipeter W, Sigler R, Greenblatt J, Anderson DE, Tennican PJ, Gamble HR, and Zarlenga D. 1996. Outbreak of trichinellosis associated with the eating of cougar jerky — Idaho, 1995. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 45:205–206.
- Wallis PM, Erlandsen SL, Isaac-Renton JL, Olson ME, Robertson WJ, and Vankeulen H. 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp isolated from drinking water in Canada. *Appl Environ Microbiol* 62:2789–2797.
- Wang, Z., Vora, G. J., Stenger, D. A. (2004) Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3262–3271.
- Watanapa P and Watanapa WB. 2002. Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Brit J Surg* 89:962–970.

- Wharton DA and Aalders O. 2002. The response of Anisakis larvae to freezing. *J Helminthol* 76:363–368.
- Wilson, I. G.(1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741–3751.
- Xu, S., Mutharasan, R. (2010) Rapid and sensitive detection of *Giardia lamblia* using a piezoelectric cantilever biosensor in finished and source waters. *Environmental Science and Technology*, 44(5), 1736–1741.
- Xue Bai, Xiaolei Liu, Xiaonong Zhou, Jiayu Chen, Xiuping Wu, Pascal Boireau and Mingyuan Liu, 2017, Food-borne Parasitic Diseases in China
- Yu JR and Park WY. 2003. The effect of gamma irradiation on the viability of *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol* 89:639–642.
- Zarlenga, D. S., Chute, M. B., Martin, A. et al. (1999) A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal of Parasitology*, 29(11), 1859–1867.
- Zarlenga, D.S., Trout, J.M., 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Veterinary Parasitology* 126 (1–2), 195–217.

Πηγές φωτογραφιών

- Hickman, C.P. (2013) *Integrated Principles of Zoology*. McGraw-Hill Education.
- <https://www.shutterstock.com/el>
- Wikipedia