



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

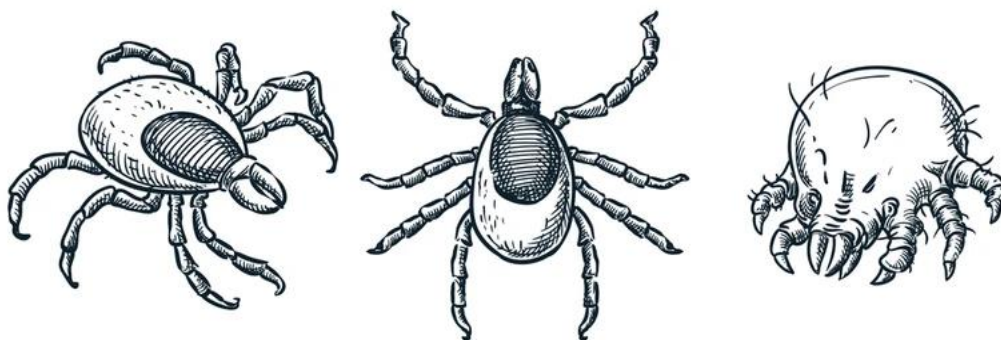
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ**

**Επιμέλεια:** Θεόδωρος Καρβέλης

**Αριθμός μητρώου:** 18684007

**Επιβλέπουσα:** Δήμητρα Χούγουλα



ΑΘΗΝΑ 2023



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

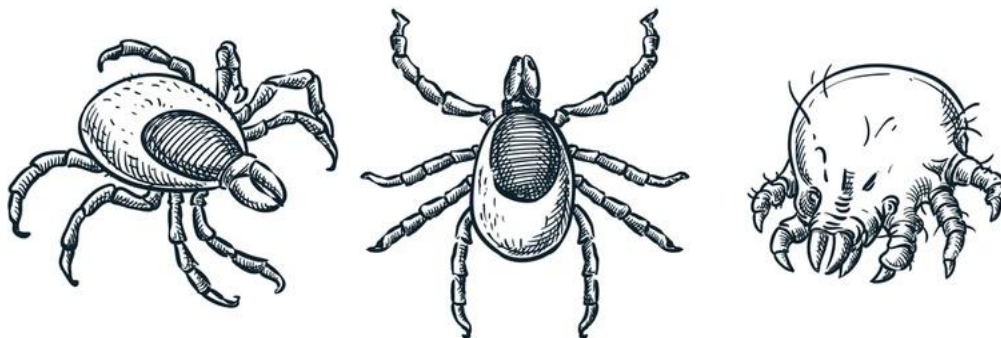
DIPLOMA THESIS ON:

**FOODBORNE PARASITES AND METHODS OF DETECTION**

**Student name and surname:** Theodoros Karvelis

**Registration Number:** 18684007

**Supervisor name and surname:** Dimitra Houhoula



ATHENS 2023



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ**

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή**

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

<b>Α/α</b>	<b>ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
	Δήμητρα Χούγουλα	Επιβλέπουσα	
	Διονύσιος Αντωνόπουλος	Μέλος εξεταστικής επιτροπής	
	Αναστασία Κανέλλου	Μέλος εξεταστικής επιτροπής	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Θεόδωρος Καρβέλης του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 18684007 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών  
Θεόδωρος Καρβέλης



**Επιβλέπουσα: Δήμητρα Χούγουλα**

**Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα:**

## Πίνακας περιεχομένων

ΟΡΙΣΜΟΙ.....	σελ.1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ.2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ.3
ABSTRACT.....	σελ.4

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΙ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ.....	σελ.5
1.2 ΠΡΩΤΟΖΩΑ.....	σελ.5
1.3 ΕΛΜΙΝΘΕΣ.....	σελ.6
-1.3.1 ΑΚΑΝΘΟΚΕΦΑΛΑ.....	σελ.6
-1.3.2 ΠΛΑΤΥΕΛΜΙΝΘΕΣ.....	σελ.7
-1.3.3 ΝΗΜΑΤΩΔΗ.....	σελ.8
1.4 ΕΞΩΠΑΡΑΣΙΤΑ.....	σελ.9
-1.4.1 ΕΞΩΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΙ ΕΛΜΙΝΘΕΣ.....	σελ.9
-1.4.2 ΕΞΩΠΑΡΑΣΙΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ.....	σελ.10
-1.4.3 ΕΞΩΠΑΡΑΣΙΤΙΚΑ ΕΝΤΟΜΑ.....	σελ.11

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΓΙΑ ΣΥΝΟΨΗ ΤΗΣ ΤΑΞΙΜΟΝΙΣΗΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ σελ.13-14

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΤΑΣΕΙΣ

2.1 ΤΑΣΕΙΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	σελ.15
2.2 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	σελ.15
-2.2.1 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΚΡΕΑΤΑ ΚΑΙ ΚΡΕΑΤΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ.....	σελ.15
--2.2.1.1 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ.....	σελ.15
--2.2.1.2 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΧΟΙΡΙΝΟ.....	σελ.16
--2.2.1.3 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΒΟΟΕΙΔΗ.....	σελ.16

-2.2.2 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ.....σελ.17	σελ.17
-2.2.3 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΙΧΘΥΗΡΑ.....σελ.17	σελ.17
-2.2.4 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΦΡΟΥΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΑΧΑΝΙΚΑ .....σελ.18	σελ.18
-2.2.4 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΑ .....σελ.18	σελ.18
-2.2.5 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΟ ΝΕΡΟ.....σελ.18	σελ.18

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ**

<b>3.1 ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ .....</b>	<b>σελ.19</b>
-3.1.1 ΧΡΩΣΗ ZIEHL-NEELSEN/ΚΙΝΥΟΥΝ .....	σελ.19
-3.1.2 ΧΡΩΣΗ GIEMSA.....σελ.20	σελ.20
-3.1.3 ΤΡΙΧΡΩΜΗ ΧΡΩΣΗ.....σελ.20	σελ.20
-3.1.4 ΧΡΩΣΗ ΩΡΑΜΙΝΗΣ-ΡΟΔΑΜΙΝΗ.....σελ.21	σελ.21
-3.1.4 ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΤΟ-KATZ.....σελ.22	σελ.22
<b>3.2 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ.....σελ.22</b>	<b>σελ.22</b>
-3.2.1 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....σελ.22	σελ.22
-3.2.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....σελ.23	σελ.23
-3.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕ ΒΑΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑ (ΝΟΥΚΛΕΪΚΟ ΟΞΥ) .....	σελ.24
--3.2.3.1 ΤΕΣΤ PCR.....σελ.24	σελ.24
--3.2.3.2 NESTED PCR.....σελ.26	σελ.26
--3.2.3.3 RT-PCR.....σελ.27	σελ.27
--3.2.3.4 TAQMAN PCR.....σελ.27	σελ.27
--3.2.3.5 MULTIPLEX PCR / REVERSE LINE BLOT HYBRIDIZATION ASSAY.....σελ.27	σελ.27
--3.2.3.6 PCR-RFLP.....σελ.28	σελ.28
-3.2.4 LAMB & RT-LAMP.....σελ.28	σελ.28
-3.2.5 NASBA.....σελ.30	σελ.30
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....σελ.31</b>	<b>σελ.31</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.31</b>	<b>σελ.31</b>



## **Ορισμοί και Συντομογραφίες:**

**ATP** = Τριφωσφορική Αδενοσίνη

**STH** = Έλμινθες μεταδιδόμενες από το χώμα

**PCR** = Αλυσιδωτή Αντίδραση Μεταγραφάσης

**LAMP** = Ισοθερμική Ενίσχυση Μέσω Βρόγχου

**RT-LAMP** = Ισοθερμική Ενίσχυση Μέσω Βρόγχου Με Αντίστροφη Μεταγραφάση

**ssrRNA** = RNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας

**cDNA** = Συμπληρωματικό DNA



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα παράσιτα που απαντώνται στα τρόφιμα είναι ένα σημαντικό κεφάλαιο για τις επιστήμες τροφίμων, καθώς η δράση τους μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες στην υγεία του γενικού πληθυσμού. Η βελτίωση της υγιεινής σε όλο το μήκος της παραγωγής τροφίμων από την πρωτογενή παραγωγή μέχρι τον τελικό καταναλωτή είναι υψίστης σημασίας για την ασφάλεια τροφίμων.

Οι σύγχρονες μέθοδοι εντοπισμού τους είναι τα κύρια εργαλεία που έχουμε για να βεβαιώσουμε ασφάλεια των τροφίμων, μέσω της ανίχνευσης, αλλά και της ταυτοποίησης των παρασίτων πάντα με γνώμονα την πρόληψη σύμφωνα με τις αρχές του HACCP, και σε συνδυασμό με την ενημέρωση του κοινού για τις βασικές ορθές πρακτικές διαχείρισης των τροφίμων, καθώς, τα παράσιτα με την σωστή συντήρηση και θερμική επεξεργασία των τροφίμων παύουν να αποτελούν κίνδυνο.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι αρχικά να εισάγει τον αναγνώστη στις κατηγορίες των παρασίτων με κύριο επίκεντρο τις τροφιμογενείς ομοταξίες τους. Στην συνέχεια να διερευνήσει τα παράσιτα σε επίπεδο είδους στις διάφορες κατηγορίες τροφίμων ενώ παράλληλα αναλύει τις τάσεις των τελευταίων ετών για τα τροφιμογενή παράσιτα.

Τέλος, εμβαθύνουμε στις σύγχρονες αλλά και στις συμβατικές μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης των τροφιμογενών παρασίτων, και σε τεχνικές οι οποίες μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμα εργαλεία για την επίβλεψη και βελτίωση των πρακτικών υγιεινής και να συμβάλλουν στην πρόληψη των ζωνοόσων που μπορούν να προκαλέσουν τα τροφιμογενή παράσιτα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα παράσιτα που επηρεάζουν τα τρόφιμα ταξινομούνται με βάση ένα χαρακτηριστικό, το αν παρασιτούν στα τρόφιμα και στους ξενιστές εξωτερικά ή εσωτερικά. Τα χωρίζουμε σε εσωπαράσιτα (Έλμινθες, πρωτόζωα), και σε εξωπαράσιτα (έντομα, παρασιτικά καρκινοειδή και τους μονογενείς εξωπαρασιτικούς έλμινθες).

Τα εσωπαράσιτα αποτελούν πρόβλημα κυρίως της πρωτογενούς παραγωγής, καθότι απαντώνται σε επιμολυσμένα νερά, στο χώμα και σε κόπρανα ζώων κατά κύριο λόγο. Ενώ τα εξωπαράσιτα μπορούν να αποτελέσουν θέμα δυνητικά σε όλη την αλυσίδα παραγωγής.

Οι τάσεις για τα παράσιτα στις διάφορες κατηγορίες τροφίμων περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο τα πρωτόζωα *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, και *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora* spp., καθώς και τους έλμινθες *Trichinella spiralis*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, και *Anisakis* spp.

Τρόφιμα υψηλού κινδύνου αποτελούνται κυρίως από τα κρέατα και κρεατοσκευάσματα, και συγκεκριμένα ότι περιέχει χοιρινό κρέας καθώς παρουσιάζει μεγάλο εύρος παρασιτώσεων τόσο από πρωτόζωα όσο και από έλμινθες. Από τα ιχθυηρά, όλα τα ψάρια, καρκινοειδή και οστρακοειδή μιας και πολλά παράσιτα, συγκεκριμένα οι έλμινθες, τα πρωτόζωα και κάποια εξωπαρασιτικά καρκινοειδή, ξεκινούν και ολοκληρώνουν τον κύκλο της ζωής τους σε αυτά.

Το νερό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είτε ως προϊόν, είτε ως πρώτη ύλη στην βιομηχανία τροφίμων εις ότι αφορά τα παράσιτα καθώς είναι συνήθης φορέας πολλών εκ των τροφιμογενών παράσιτων.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης των παρασίτων περιλαμβάνουν μεθόδους ιστολογικές και χρώσης με παρατήρηση στο μικροσκόπιο και παρόλο του εξακολουθούν να είναι χρήσιμες σε επίπεδο διάγνωσης και περιβαλλοντικού ελέγχου, η χρήση τους άμεσα στα τρόφιμα καθ'αυτά είναι περιορισμένη.

Οι σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης των παράσιτων χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, στις μεθόδους με χρήση βιοδεικτών, στις ανοσολογικές μεθόδους με γνώμονα την σχέση αντισώματος-αντιγονικού καθοριστή, και τις διάφορες μεθόδους ενίσχυσης βιολογικών μακρομορίων (DNA – RNA).

## **ABSTRACT**

Parasites are firstly classified based on one characteristic, whether they parasitize the host from the inside or the outside. We group them into internal parasites (Helminths, Protozoa), and ectoparasites (bugs, crustaceans ectoparasites and monogenean ectoparasitic helminths).

Internal parasites are a concern mainly for the primary production, as they are usually found in contaminated water, dirt and animal feces, whereas ectoparasites can show up during any stage of the production chain.

Parasite trends in the various food categories include mainly the protozoa *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora* spp., and the helminths *Trichinella spiralis*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, and *Anisakis* spp.

High-risk foods consist mainly of meats and meat products, and specifically those that contain pork as it presents a wide range of parasitic infestations by both protozoa and helminths. Also, all of the seafood such as fishes, crustaceans and shellfish are of great import since many parasites, namely helminths, protozoa and some ectoparasitic crustaceans, start and complete their life cycle using them as hosts.

Water is of particular interest either as a product or as a raw material in the food industry in terms of parasites as it is a common carrier of many of the foodborne parasites.

The traditional parasite detection methods include histological and staining methods alongside observation under the microscope, and although they are still useful nowadays, at the level of diagnosis and environmental control, their use directly in foodstuffs is limited.

Modern parasite detection methods are divided into three categories, the methods using biosensors, the immunological methods based on the antibody-antigenic determinant relationship, and the various methods of amplifying biological macromolecules (DNA – RNA).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

## 1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Ως παράσιτα ορίζονται εκείνοι οι οργανισμοί που ζουν πάνω ή μέσα σε έναν άλλον οργανισμό-ξενιστή διαφορετικού είδους και τρέφονται εις βάρος του. Οι κατηγορίες των παρασίτων που μπορούν να δημιουργήσουν ασθένειες στους ανθρώπους είναι τρεις: Τα πρωτόζωα, τους έλμινθες, και τα εξωπαράσιτα. (CDC, 2022)

Τα πρωτόζωα είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί ενώ οι έλμινθες και τα λοιπά εξωπαράσιτα πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί και λέγονται και «μετάζωα». Ανάλογα με το σε τι φάση της ζωής τους συναντάμε τα παράσιτα, τα χαρακτηρίζουμε ως «τελικό ξενιστή» όταν το παράσιτο είναι ενήλικο, και «ενδιάμεσο ξενιστή» όταν το παράσιτο βρίσκεται στα προνυμφικά στάδια του. (Νταχάμπρε Στέλλα, 2013)

## 1.2 ΠΡΩΤΟΖΩΑ

Ο όρος «πρωτόζωο», ιστορικά, ήταν αμφιλεγόμενος στην επιστημονική κοινότητα καθώς ορισμένες ταξινομικές βαθμίδες τους μελετώνται από βοτανολόγους με ειδικότητα στα «φύκη» ως φυτικοί οργανισμοί, όπως είναι τα φυτοπλανκτόν, ενώ άλλες από ζωολόγους με ειδικότητα στα «πρωτόζωα» ως ζωικοί οργανισμοί. Συνεπώς το όριο μεταξύ “φύκη” και “πρωτόζωου” ήταν θολό λόγω της ομοιότητας εις ότι αφορά την συμπεριφορά τους. Στην σύγχρονη προσέγγιση, τα πρωτόζωα θεωρούνται, με ορισμένες εξαιρέσεις, μη-φωτοσυνθετικοί, μονοκύτταροι, ευκαρυωτικοί οργανισμοί που ανήκουν στην κατηγορία των πρώτιστων ή πρωτόκτιστων, στο ζωικό βασίλειο. (Jean-Claude Bertrand, Pierre Caumette, 2011)

Οφείλουν το όνομα τους στην κινητικότητα (motility) που παρουσιάζουν (όπως βλέπουμε στο ζωικό βασίλειο δηλαδή), καθώς και στην ικανότητα «θήρευσης» αφού τρέφονται, πέρα από οργανική ύλη, με άλλους μικροοργανισμούς περικυκλώνοντας και απορροφώντας τους, διαδικασία που ονομάζεται ενδοκυττάρωση. (Baron S, 1996)

Μπορούν να λάβουν την απαραίτητη ενέργεια τους από διαδικασίες ζύμωσης των προαναφερθέντων σε κάποιες περιπτώσεις όπως στα «ελεύθερα» γένη Εξάμιτα (*Hexamita*), και τα Τριμύημα (*Trimyema*). Γι' αυτό, μπορούν να ζουν και αυτόνομα, πέρα από το να παρασιτούν εις βάρος ξενιστών, όπως κάνουν τα γένη Γιάρδια (*Giardia*), Ενταμοιβάδα (*Entamoeba*), Τριχιμονάδες (*Trichimonades*), κ.α. ή που συμβιώνουν όπως τα Δασύτριχα (*Dasytricha*), Ισότριχα (*Isotricha*), Τριχόνυμφα (*Trichonympha*), κ.α.

Τα προαιρετικά αυτόνομα είδη τείνουν να είναι και αυτά που απαντώνται συνηθέστερα στα τρόφιμα λόγω της καλύτερης προσαρμογής στα δύσκολα περιβάλλοντα και της μεγαλύτερης ανθεκτικότητας που αυτό συνεπάγει στο βάθος της εξελικτικής τους πορείας.

Πολλά από τα πρωτόζωα έχουν μιτοχόνδρια για την παραγωγή της ενέργειας τους, όμως, έχουν και συγκεκριμένα οργανίδια, τα υδρογονοσώματα, για τον σχηματισμό νερού και παραγωγή ATP. Έτσι, δεν βασίζονται εξ'ολοκλήρου στην κύρια μεταβολική οδό της γλυκόλυσης και του κύκλου του Krebs.

Γι' αυτό και πολλά είδη πρωτόζωων μπορούν να ζήσουν και ελεύθερα, χωρίς να παρασιτούν. (Jean-Claude Bertrand, Pierre Caumette, 2011)

Τα γένη των τροφιμογενών πρωτόζωων περιλαμβάνουν τα *Toxoplasma* spp. με επικρατέστερο είδος το *Toxoplasma gondii*, τα *Cryptosporidium* spp., με χαρακτηριστικότερο το *Cryptosporidium parvum*, το γένος *Giardia* spp., με συνηθέστερη την *Giardia lamblia*, *Isospora* spp., *Microsporidia* spp. και το γένος *Cyclospora* spp. (B.Cherie Millar *et al*, 2002; Newell,D.G., 2010; Mossallam SF., 2010)

### 1.3 ΈΛΜΙΝΘΕΣ

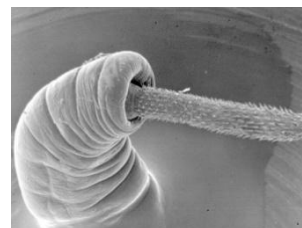
Οι έλμινθες είναι παρασιτικά «μεταζωικά» σκουλήκια. Σε αντίθεση με τις εξαιρέσεις **Βδέλες** (*Hirudinea*) και τα **Μονογενή** (*Monogenea*) (βλ. ενότητα 1.4) που αποτελούν εξωπαράσιτα, οι έλμινθες παρασιτούν μέσα στους ξενιστές τους, ενώ τείνουν να παρασιτούν μόνο στην ενήλικη φάση τους και όχι στην προνυμφική. Γι' αυτό ονομάζονται εσωπαράσιτα μαζί με τα πρωτόζωα. (Northrop-Clewes, Christopher Shaw, 2003)

Οι παρασιτικοί έλμινθες χωρίζονται σε τρία φύλα, τα **Ακανθοκέφαλα** (*Acanthocephala*), τους **Πλατυέλμινθες** (*Platyhelminthes*) και τα **Νηματώδη** (*Nematoda*). Η συντριπτική πλειοψηφία των μεταζωικών αυτών παρασίτων ανήκουν κυρίως στις ομάδες των Πλατυελμινθών και των Νηματωδών, με τις κύριες ομάδες που μας απασχολούν για την παρασιτικότητα τους από τους πλατυέλμινθες είναι, η τάξη των **Τρηματωδών** (*Trematoda*), η υποκατηγορία των Τρηματωδών, **Διγενείς** (*Digenea*), η τάξη των **Κεστωδών** (*Cestoda*), καθώς και το σύνολο των Νηματωδών. (Northrop-Clewes, Christopher Shaw, 2003; Gibson D, *et al*, 2014; Νταχάμπρε Στέλλα, 2013).

#### 1.3.1 ΑΚΑΝΘΟΚΕΦΑΛΑ

Τα Ακανθοκέφαλα είναι μια πολύ μικρή ομάδα παρασιτικών έλμινθων με περίπου 1300 είδη έναντι περίπου 20.000 ειδών Τρηματωδών (εκ των οποίων, 18.000 Διγενή), 8000 είδη Κεστωδών, και τουλάχιστον 30.000 είδη Νηματωδών. (Amin O.M., 2013; Gibson D.I., 2002; )

Παίρνουν το όνομα τους από το ακανθώδες κεφάλι τους, και είναι αναγνωρίσιμα ακριβώς από αυτό το ακανθωτό στίγμα σαν ανεστραμμένη προβοσκίδα που διαθέτουν στο κεφάλι τους που παρουσιάζει ετερογένεια στο μήκος της. Παρασιτούν στο έντερο κάνοντας διείσδυση με την προβοσκίδα τους στο τοίχωμα του εντέρου όπως βλέπουμε και στις ταινίες (tapeworms). Αντίστοιχα με τις ταινίες, αλλά και τα Κεστώδη, δεν διαθέτουν δικό τους έντερο και άρα βασίζονται αποκλειστικά στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από ξενιστές, παρασιτώντας εις βάρος τους. (Amin O.M., 2013)



Εικόνα 1: Ακανθοκέφαλο

Μολύνουν τον τελικό ξενιστή στο ενήλικο στάδιο αφού προηγηθούν δύο ενδιάμεσα προνυμφικά στάδια όπως παρατηρείται και στα Διγενή (βλ. ενότητα 1.3.2). Χρησιμοποιούν αρθρόποδα ως ενδιάμεσους ξενιστές, ξεκινώντας από τα οστρακόδερμα και φτάνοντας μέχρι τα έντομα, με τελικούς ξενιστές να αποτελούν τα πτηνά, έχοντας έτσι την δυναμική να μολύνουν από πανίδα της στεριάς μέχρι και υδρόβια πανίδα. (Arizono N, Kuramochi T, Kagei N., 2012)

Παρά την φαινομενική δυναμική τους, οι μολύνσεις ανθρώπων από Ακανθοκέφαλα είναι πολύ σπάνιες και αποτελούν μια στατιστική μειοψηφία, ακριβώς λόγω της ποικιλίας των τελικών ξενιστών. Οι κύριοι τελικοί ξενιστές αποτελούν τα έντομα, τα περιστέρια και περιορισμένα θηλαστικά όπως τα ρακούν που δεν είναι σύνηθες να καταναλώνονται από ανθρώπους. (Mathison B.A., 2016)

Τα κύρια είδη στις περισσότερες καταγεγραμμένες περιπτώσεις περιλαμβάνουν τα Ακανθοκέφαλα *Macracanthorhynchus hirudinaceus*, *Macracanthorhynchus ingens*, και *Moniliformis moniliformis*, ενώ τείνουν να μολύνουν κυρίων νεότερους πληθυσμούς, συνήθως κάτω των 7 ετών. (Mathison B.A. et al, 2021)

### 1.3.2 ΠΛΑΤΥΕΛΜΙΝΘΕΣ

Η συνομοταξία των τροφιμογενών παρασιτικών Πλατυέλμινθων αποτελείται από την ομάδα των **Νεοδερμάτων** (*Neodermata*) που περιλαμβάνει τρεις διακριτές τάξεις, τα **Μονογενή** (*Monogenean*) που ανήκουν στα εξωπαράσιτα (βλ. ενότητα 1.4), τα **Τρηματώδεις** (*Trematoda*) και τα **Κεστώδεις** (*Cestoda*). (David I. Gibson et al, 2014; Kostadinova, A., Pérez-del-Olmo, A. 2014)

Τα τροφιμογενή **Τρηματώδεις** είναι επίπεδα και κοντά σκουλήκια οβάλ σχήματος. Είναι παράσιτα που προκύπτουν και αναπτύσσονται σε υδρόβια πανίδα συνήθως γλυκού νερού. Υπάρχουν και δύο υποκατηγορίες τους, τα **Διγενή** (*Digenea*) και τα **Ασπιδογαστρία** (*Aspidogastrea*) που έχουν την δυνατότητα για τροφιμογενή μόλυνση. (Macpherson C.N., 2005)

Τα τροφιμογενή Τρηματώδη περιλαμβάνουν τα γένη *Opisthorchis* spp. με σημαντικότερα τα *O. Viverrini* και *O. felineus*, το *Clonorchis* spp. με κύριο το *Clonorchis sinensis*, το *Paragonimus* spp., το *Schistosoma* spp., το *Fasciola* spp. με κύρια τα *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica*, και το είδος *Fasciolopsis buski*. Πολλά από αυτά τα είδη ξεκινούν το προνυμφικό τους στάδιο χρησιμοποιώντας θαλάσσια σαλιγκάρια του γένους *Bithynia* spp. και προσβάλλουν ιχθυηρά ως επι τω πλείστον. (Toledo R. Esteban, et al, 2012; Keiser, J., Utzinger, J., 2005; Keiser, J., Utzinger, J. 2009)

Τα **Διγενή** είναι η κυριότερη υποκατηγορία των Τρηματωδών όντας κι αυτά κοντά επίπεδα σκουλήκια. Έχουν δύο «βεντούζες», μία στοματική και μία κοιλιακή τις οποίες χρησιμοποιούν για να παρασιτούν. Σχεδόν όλα τα είδη των Διγενών χρησιμοποιούν ιδιαίτερα τα μαλάκια ως πρώτους και ενδιάμεσους ξενιστές, έχοντας συνήθως, τουλάχιστον δύο πρώτες άφυλες γενιές όπου αναπαράγονται ασεξουαλικά, μέχρι να ωριμάσουν και να παράξουν τις προνύμφες της τελικής 3<sup>η</sup>, ή μεταγενέστερης, ενήλικης τους μορφής, όπου μετέπειτα παρασιτούν σε σπονδυλωτά ζώα με ιδιαίτερη παρουσία στα ιχθυηρά. (Gibson D. I., Jones A., Bray R. A. 2002)



Εικόνα 2: Διγενής Πλατυέλμινθος

Μερικά χαρακτηριστικά Διγενή περιλαμβάνουν τις ομοταξίες των *Echinostomatida*, *Heterophyidae*, καθώς επίσης το είδος *Euhaplorchis californiensis* (Lafferty, Kevin D., 2008; Fried, B., Graczyk, T.K. & Tamang, L., 2004)

Τα **Ασπιδογάστρια** είναι μια ακόμα υποκατηγορία των Τρηματωδών τα οποία ξεκινούν και αυτά την ζωή τους από τα μαλάκια, όπως τα διγενή, έχουν όμως πιο απλό κύκλο ζωής από τα Διγενή με μόλις ένα προνυμφικό στάδιο πριν την ενήλικη τους μορφή. Είναι πιο ανθεκτικά από τα Διγενή καθώς μπορούν να αντέξουν 4-5 εβδομάδες ελεύθερα σε γλυκό νερό. Όμως, παρόλο που έχουν μικρότερη εκλεκτικότητα στους ξενιστές και την δυνατότητα να παρασιτήσουν σε όλες τις κατηγορίες των σπονδυλωτών, είναι σχετικά περιορισμένη η παρουσία τους στα τρόφιμα, αντίστοιχα με τα ακανθοκέφαλα. Επηρεάζουν όμως τα ιχθυηρά τα οποία συνηθέστερα προσβάλλουν.



Εικόνα 3: Τυπικό Ασπιδογάστριο

Μια εξήγηση είναι ο περιορισμένος αριθμός ειδών που έχουν, με μόλις 80 αναγνωρισμένα είδη, ενώ υπάρχει και η εξελικτική θεώρηση ότι τα Ασπιδογάστρια είναι αρχαϊκά Τρηματώδη που δεν έχουν καταφέρει ακόμα να προσαρμοστούν καλά στους ξενιστές. (Rohde, K., 1972; Pérez-del-Olmo A., 2014)

Τα **Κεστώδη** είναι επίσης επίπεδα, αλλά σε αντίθεση με τα Διγενή, συνήθως μακρόστενα και λεπτά σαν κορδέλα, με κύριο γένος το *Taenia* spp. Οι ταινίες προσομοιάζουν πιο πολύ στα Νηματώδη (βλ. ενότητα 1.3.3) φαινοτυπικά παρόλο που γονοτυπικά είναι πιο κοντά στα Τρηματώδη. Άλλα τροφιμογενή γένη περιλαμβάνουν τα *Echinococcus* spp., *Diphyllobothrium* spp. Οι ενήλικες Κεστώδεις παρασιτούν στην εντερική οδό των σπονδυλωτών ή και αρθρόποδων, όμως, με τις προνύμφες τους να προκύπτουν πρώτα στην εντερική οδό άλλων ενδιάμεσων ξενιστών, πριν φτάσουμε στον τελικό ξενιστή ως συνήθως για τους πλατυέλμινθες. (Chervy L., 2002; Pozio E. 2018; Alvin A. Gajadhar, 2015)



Εικόνα 4: Κεστώδης Πλατυέλμινθος

### 1.3.3 ΝΗΜΑΤΩΔΗ

Τα νηματώδη είναι κυλινδρικά σκουλήκια με μεγάλη ετερογένεια στο μήκος τους, από μερικά χιλιοστά μέχρι αρκετά μέτρα. Μερικά από τα σημαντικότερα γένη περιλαμβάνουν τα *Trichinella* spp., με κύριο είδος την *Trichinella spiralis*, *Anisakis* spp., *Ascaris* spp., *Toxocara* spp., *Gnathostoma* spp., *Trichostrongylus* spp. *Stongyloides* spp., *Heterodera* spp. *Haemonchus* spp., και *Capillaria* spp. (*Capillaria caudinflata* και *Capillaria philippinensis*), κατά κύριο λόγο, ενώ σημαντικά είναι και τα γένη *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Ostertagia* spp. και τα είδη *Baylisascaris procyonis*, *Ascaridia galli*.



Εικόνα 5: Νηματώδης (Anisakis)

Είναι μια πολύ σημαντική κατηγορία παρασιτικών ελμινθών μιας και αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των παρασιτικών μολύνσεων, με σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία καθώς προκαλούν νευρολογικές διαταραχές, οδηγώντας πολύ συχνά σε θάνατο. Παρασιτούν στο έντερο και έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν εκεί πολλά μέτρα.

Ενδιαφέρον αποτελεί ότι το είδος *Trichinella spiralis* είναι ο μεγαλύτερος παράγοντας τροφιμογενών λοιμώξεων όχι μόνο από την κατηγορία των Νηματωδών, αλλά από το σύνολο των τροφιμογενών παράσιτων. (βλ. ενότητα 2.1). (Koppenhöfer, A.M., 2000; Pozio, E. 2018; Robertson L.J., Gjerde, B., 2001; Aida Vafae Eslahi *et al*, 2022; Santos, Thais Rabelo dos, *et al*, 2010; Smiley RW *et al*, 2017).

## 1.4 ΕΞΩΠΑΡΑΣΙΤΑ

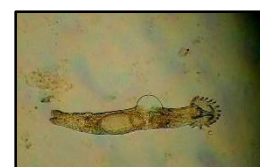
Τα εξωπαράσιτα είναι όλα εκείνα τα παράσιτα που παρασιτούν εξωτερικά του ξενιστή. Μπορούν να ανήκουν σε οποιαδήποτε από τις παραπάνω ομάδες με χαρακτηριστικότερα τα μονογενή και σε πολύ μικρότερο βαθμό τα Τρηματώδη από τους **έλμινθες**, ή και σε τελείως διαφορετικές ομάδες όπως διάφορα μικροσκοπικά **καρκινοειδή** και διάφορα **έντομα**. Δεν τείνουν να επηρεάζουν άμεσα τους ανθρώπους αλλά έμμεσα, μιας και συχνά είναι φορείς ιών, παθογόνων μικροοργανισμών, και λοιπών μη τροφιμογενών παρασίτων. Σε αυτή την ενότητα θα αναφερθούν μόνο εκείνες οι κατηγορίες, γένη και είδη εξωπαρασίτων που αφορούν τα τρόφιμα.

### 1.4.1 ΕΞΩΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΙ ΕΛΜΙΝΘΕΣ

Τα μονογενή είναι η κύρια ομάδα των εξωπαρασιτικών με 6000-7000 είδη που γονοτυπικά είναι έλμινθες άλλα εν αντιθέσει με τους υπόλοιπους έλμινθες, είναι εξωπαρασιτικά. Έχουν κύριους στόχους τα ιχθυηρά με ιδιαίτερη έμφαση στα ψάρια παρασιτώντας πάνω στο δέρμα ή στα βράγχια τους, ενώ πιο σπάνια εμφανίζονται σε αμφίβια του γλυκού νερού όπως βατράχια (π.χ. *Ranoidea phyllochroa*) ή νερόφιδα (π.χ. *Dermophis mexicanus*). (Bahram S.D. *et al*, 2021)

Τα χαρακτηριστικότερα εξωπαρασιτικά μονογενή περιλαμβάνουν τα γένη *Microcotyle* spp., *Gotocotyla* spp., *Oncomiracidium* spp., *Enoplocotyle* spp., *Choricotyle* spp., και τα είδη *Diplectanum aequan*, *Heterobothrium okamotoi*, *Dactylogyrus pectenatus*, ενώ σημαντικά είναι και τα *Gyrodactylus* spp., *Pseudobenedenia* spp., *Trimusculotrema* spp., *Anoplodiscus* spp., *Dentromonocotyle* spp., *Ancylodiscoides* spp., *Hamatopeduncularia* spp., *Dactylogyrus* spp., *Dicliophora* spp., και *Necturus* spp.

Λοιπά εξωπαρασιτικοί έλμινθες περιλαμβάνουν τα γένη *Diplostomum* spp., *Pseudokatsuwonis* spp., *Tristoma* spp., και πιο συγκεκριμένα, τα είδη *P. vagans*, *T. magronum*, *T. katsuwonum*, αλλά και το *Axine seriola* από τα Τρηματώδη. (Bahram S.D. *et al*, 2021; Stanley D. King, David K. Cone, 2009; G.C. Kearn, 1994; Ian D. Whittington *et al*, 1999; Ishii N., 1936)



Εικόνα 6: Μονογενές

Χαρακτηριστικά είναι τα γένη βδελλών ***Hirudinea* spp.** από το φύλο *Annelida* και η *Piscicola geometria* οι οποίες πέρα από ελεύθερα, μπορούν να ζήσουν και παρασιτώντας προκαλώντας διάφορες ασθένειες, συνήθως ιικής προέλευσης όπως με τους ιούς SVCV και IHN. (Hopla CE., 1994)



Εικόνα 7: Βδέλλα *Hirudinea*



#### 1.4.2 ΕΞΩΠΑΡΑΣΙΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ

Τα τροφιμογενή καρκινοειδή που επηρεάζουν τα ιχθυηρά σε μεγάλο βαθμό και σε μικρότερο βαθμό τους ανθρώπους χωρίζονται σε 3 υποκατηγορίες, στα **Κωπήποδα** (*Copepoda*), στα **Βραγχύουρα** (*Branchiura*) και σε ένα μικρό βαθμό στα **Μαλακόστρακα** (*Malacostraca*).

Εμφανισιακά, προσομοιάζουν τα καρκινοειδή που καταναλώνονται, όπως στις γαρίδες και τους αστακούς, μόνο που είναι μικροσκοπικά και έχουν την δυνατότητα να μεγαλώσουν σε έναν μικρό βαθμό κατά τον παρασιτισμό, ενώ δεν έχουν προνυμφικά στάδια. Διαθέτουν «γάντζους» και «βεντούζες» κατά μήκος του σώματος τους για να γραπώνονται στους ξενιστές.

Τα **Κωπήποδα** χωρίζονται σε 3 τάξεις, στα *Cyclopoida*, *Caligoida*, και *Lernaeopodoida*, με περισσότερα από 8000 είδη, όλα εκ των οποίων είναι σημαντικά καθώς τρέφονται με αίμα και υγρά από τον ιστό των ξενιστών αφήνοντας αιμορραγικό, σπογγώδες και νεκρωτικό δέρμα στα ιχθυηρά κάνοντας μεγάλη ζημιά τόσο στην εκτροφή ιχθυηρών όσο και στην ελεύθερη αλιεία.

Τα **Βραγχύουρα**, μια πιο μικρή υποκατηγορία των καρκινοειδών παρασίτων από τα Κωπήποδα, γνωστά και ως «ψείρες των ψαριών», ανήκουν όλα στην οικογένεια των Αργουλιδών (*Argulidae*), με σημαντικότερο το γένος *Argulus* spp. Σημαντικά είδη αποτελούν τα *Argulus foliaceus*, *A. pellucidus* και *A. Coregoni*.

Τα **Μαλακόστρακα** είναι επίσης μια μικρή, αλλά ανερχόμενη υποκατηγορία στην οποία ανήκει η τάξη των Ισόποδων (*Isopoda*), με χαρακτηριστικό γένος το *Livoneca* spp. και έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς ευθύνεται για σημαντικές απώλειες στην βιομηχανία της εκτροφής ψαριών.

Πέρα από την ζημιά που μπορούν να κάνουν από μόνα τους αυτά τα παράσιτα, συχνά είναι φορείς παθογόνων μικροοργανισμών όπως τα *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio salmonicida*, και *Yersinia ruckeri*. Καθώς και φορείς ιών όπως τον ιό της παγκρεατικής νέκρωσης (IPN) και τον ιό της αναιμίας των σολομοειδών (ISA).



Εικόνα 7: Καρκινοειδές παράσιτο

Οι επιπτώσεις στην υγεία στους ανθρώπους από τα καρκινοειδή παράσιτα είναι πολύ πιο ήπιες από αυτές που έχουν στα ιχθυηρά, τις περισσότερες φορές είναι αποτέλεσμα όχι άμεσο λόγω της υπαρξης τους στα τρόφιμα, αλλά έμμεσο λόγω των παθογόνων μικροοργανισμών και των ιών που συνήθως φέρουν.

(Hopla CE., 1994; Cheng. T. C., 1986; Kabata Z., 1970; Capelle K.J., 1971)

### 1.4.3 ΕΞΩΠΑΡΑΣΙΤΙΚΑ ENTOMA

Τα εξωπαρασιτικά έντομα περιλαμβάνουν τις **Ψείρες** (*Phthiraptera*), τα **Ημίπτερα** (*Hemiptera*), τα **Δίπτερα** (*Diptera*), τους **Ψύλλους** (*Siphonaptera*), τα **Τσιμπούρια** (*Arachnida*), και τα **Ακάρεια**. Τροφιμογενώς, δεν προκαλούν άμεσα προβλήματα, όμως, είναι από τα πιο μικροβιολογικά επιβαρυνμένα εξωπαρασίτια, οπότε δημιουργούν τα περισσότερα προβλήματα έμμεσα. (Hopla CE., 1994)

Οι **Ψείρες** ταξινομούνται στην ομάδα των **Φθιράπτερον** (*Phthiraptera*), με περισσότερα από 500 αναγνωρισμένα είδη, με μόλις 20 από αυτά να βρίσκονται ευρέως στο αστικό περιβάλλον, κυρίως σε κατοικίδια, μιας και είναι αιματοφάγα παράσιτα που προσβάλλουν θηλαστικά ως επί τω πλείστον.

Υπάρχουν γένη που παρασιτούν ρουφώντας θρεπτικά συστατικά από το δέρμα σαν τα κουνούπια, όπως είναι τα *Haematopinus* και *Linognathus*, και άλλα που τρέφονται με νεκρά κύτταρα δέρματος, εκκρίσεις του δέρματος και τρίχες όπως τα *Ischnocera*, *Amblycera*, και *Rhynchophthirina*. (Durden L.A. & Musser G.G., 1994)

Τα **Ημίπτερα** είναι μια μεγάλη ομάδα ζωϊφίων, όπως είναι τα τζιτζίκια, οι κοριοί, τα σκαθάρια κ.α. με περισσότερα από 80.000 αναγνωρισμένα είδη με λιγότερα από 200 από αυτά να ανήκουν στα τροφιμογενή εξωπαρασίτια. Έχουν μέγεθος από 0,5 μέχρι 4,4εκ. είναι αρθρόποδα . Συγκεκριμένα, έχουμε 115 είδη αιματοφάγων εξωπαρασιτικών ημίπτερον από την ομοταξία των «*Triatominae*» που ανήκει στην οικογένεια των *Reduviidae*, τα οποία είναι σκαθάρια χαρακτηριστικό των οποίων είναι η κωνική τους μύτη, με χαρακτηριστικά τα γένη *Triatoma*, *Rhodnius* και *Panstrongylus*, τα οποία δημιουργούν πρόβλημα έμμεσα καθώς αποτελούν φορείς του παρασίτου *Trypanosoma cruzi* που προκαλεί την χαρακτηριστική ασθένεια «Chagas». Έχουμε και άλλα 74 είδη **κοριών** της ομοταξίας των *Cimicidae*. (Schofield C . J. 1988; Usinger R.L., 1966)

Τα **Δίπτερα** είναι η ομάδα στην οποία ανήκουν όλα τα είδη μυγών τα οποία είναι συνήθως υποχρεωτικά παρασιτικά παράσιτα και συχνά τρέφονται με αίμα θηλαστικών ζώων με ιδιαίτερη εμφάνιση και στα πουλερικά αντίστοιχα με τα ημίπτερα και τους κοριούς. (βλ. ενότητα 2.2.1.1). Είναι πολύ σημαντική κατηγορία για τα τρόφιμα καθώς περιλαμβάνει και πολλές περιπτώσεις μυιασμάτων.

Χαρακτηριστικότερα για την παρασιτικότητα της είναι η οικογένεια των **Νηματοκερών** (*Nematocera*) όπου ανήκουν τα κουνούπια (τάξη: *Culicidae*) με περισσότερα από 3200 αναγνωρισμένα είδη. Άλλες οικογένειες περιλαμβάνουν τα *Psychodidae*, όπου ανήκουν οι σκόροι, με 600 είδη, τα *Sumillidae* (μαύρες μύγες) με 1.500 είδη και τα *Ceratopogonidae*, που είναι μύγες αντίστοιχες με τα κουνούπια, με περίπου 4.200 είδη. Υπάρχει και η κατηγορία των Βραχύκερων (*Brachycera*) με γένη όπως τα *Chrysops*, *Tabanus*, *Hybomitra* και *Haematopota* που προσβάλλουν κυρίως οικόσιτα ζώα αλλά και ζώα κτηνοτροφίας. (Oldroyd H., 1964; Department of Entomology, Penn State University, 2017)

Μια ακόμα μικρή οικογένεια των Δίπτερον είναι τα *Muscidae*, με τα είδη *Musca domestica*, που είναι οι κοινές οικιακές μύγες, *Musca sorbens*, *Musca vetustissima* και *Musca Autumnalis*. Άλλα είδη σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνουν τα *Hydrotaea irritans*, *Haematobia irritans*, *Stromoxys calcitrans*, και τα γένη *Hippelates*, και *Siphunculina*.

**Οι μύγες που προκαλούν μύαση** ανήκουν στις υποχρεωτικά μiasματικές οικογένειες *Calliphoridae*, *Oestridae* και *Sarcophagidae*. Χαρακτηριστική είναι η παρασιτικότητα τους στο δέρμα ζώων κτηνοτροφίας αλλά και οικόσιτων ζώων όπου αφήνουν τις προνύμφες τους, αλλά δεν περιορίζονται εκεί. Επηρεάζουν και τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως σιτηρά και ξηρούς καρπούς.

Από τα *Calliphoridae*, έχουμε τα είδη *Phaenicia serricata*, *Phaenicia pallescens*, *Phormia regina*, *Chrysomya bezziana*, *Cochliomyia hominivorax* και *Cochliomyia macellaria* τα οποία επηρεάζουν συχνότερα τα ζώα κτηνοτροφίας. (βλ. Ενότητα 2.2.1).

Από τα *Oestridae*, τα οποία επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό οικόσιτα ζώα, αλλά δεν περιορίζεται εκεί, με μολύνσεις σε ζώα κτηνοτροφίας αλλά και ανθρώπους. Δεν ξεχωρίζουμε συγκεκριμένα είδη για την παρασιτικότητα τους, μας απασχολούν και οι 4 διακριτές υποκατηγορίες τους, τα *Cuterbrinae*, *Hypodermatinae*, *Oestrinae* και *Gasterophilinae*.

Τα *Sarcophagidae* ταξινομούνται σε 3 υποκατηγορίες, τα *Miltogramminae*, *Paramacronychiinae* και τα *Sarcophaginae*. Έχουν δράση αντίστοιχη με τα *Calliphoridae*. (Richards, O. W.; Davies, R.G., 1977; Wall R. & Stevens J., 1990; FOIL L.D. & FOIL C.S., 1990; HARWOOD R.F. & JAME S M.T., 1979)

Τα **Τσιμπούρια** αποτελούνται από τρεις οικογένειες, τα Ixodida, τα Nuttalliellidae και τα Argasidae με περισσότερα από 800 είδη μεταξύ τους. Στα **Ixodida** έχουμε τα γένη *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Amblyonoma*, *Boophilus* και *Dermacentor*, τα **Nuttalliellidae** είναι πολύ σπάνια και συναντώνται σε εξωτικές χώρες όπως η Τανζανία ή η Νότια Αφρική, με κύριο χαρακτηριστικό είδος το *Nuttalliella namaqua* ενώ στα **Argasidae** έχουμε χαρακτηριστικά τα γένη *Antricola*, *Ornithodoros* και *Argas* (Oliver J.H. JR, 1989; Bonnet S. *et al*, 2014; KEIRANS J.E., 1992; Hoskins JD, Cupp EW., 1988; CDC, 2017)

Τα **Ακάρεια** προσομοιάζουν σε δομή τα τσιμπούρια, όμως είναι μικροσκοπικά και δεν φαίνονται με το γυμνό μάτι. Ταξινομούνται στις οικογένειες **Dermanyssidae**, **Halarachnidae**, **Demodicidae**, **Sarcoptidae**, και **Trombiculidae**. Επηρεάζουν κυρίως ζώα κτηνοτροφίας και χαρακτηριστικότερα τα πουλερικά και τα αμνοερίφια. (Bahram S.D. *et al*, 2021; Hopla CE., 1994)

# Τροφιμογενή Πρωτόζωα

*Toxoplasma* spp.  
*Cryptosporidium* spp.  
*Giardia* spp.  
*Isospora* spp.  
*Microsporidia* spp  
*Cyclospora* spp.

Διάγραμμα 1: Δέντρο ταξινόμησης τροφιμογενών πρωτόζωων

# Τροφινογενείς Έλμινθες

## Ακανθοκέφαλα

*M. hirudinaceus*  
*M. ingens*  
*M. moniliformis*

## Πλατυέλμινθες

### Νεοδέρματα

### Μονογενή

### Ασπιδογάστρια

### Τρηματώδη

### Διγενή

*Echinostomatidae*  
*Heterophyidae*  
*Euhaplorchis californiensis*

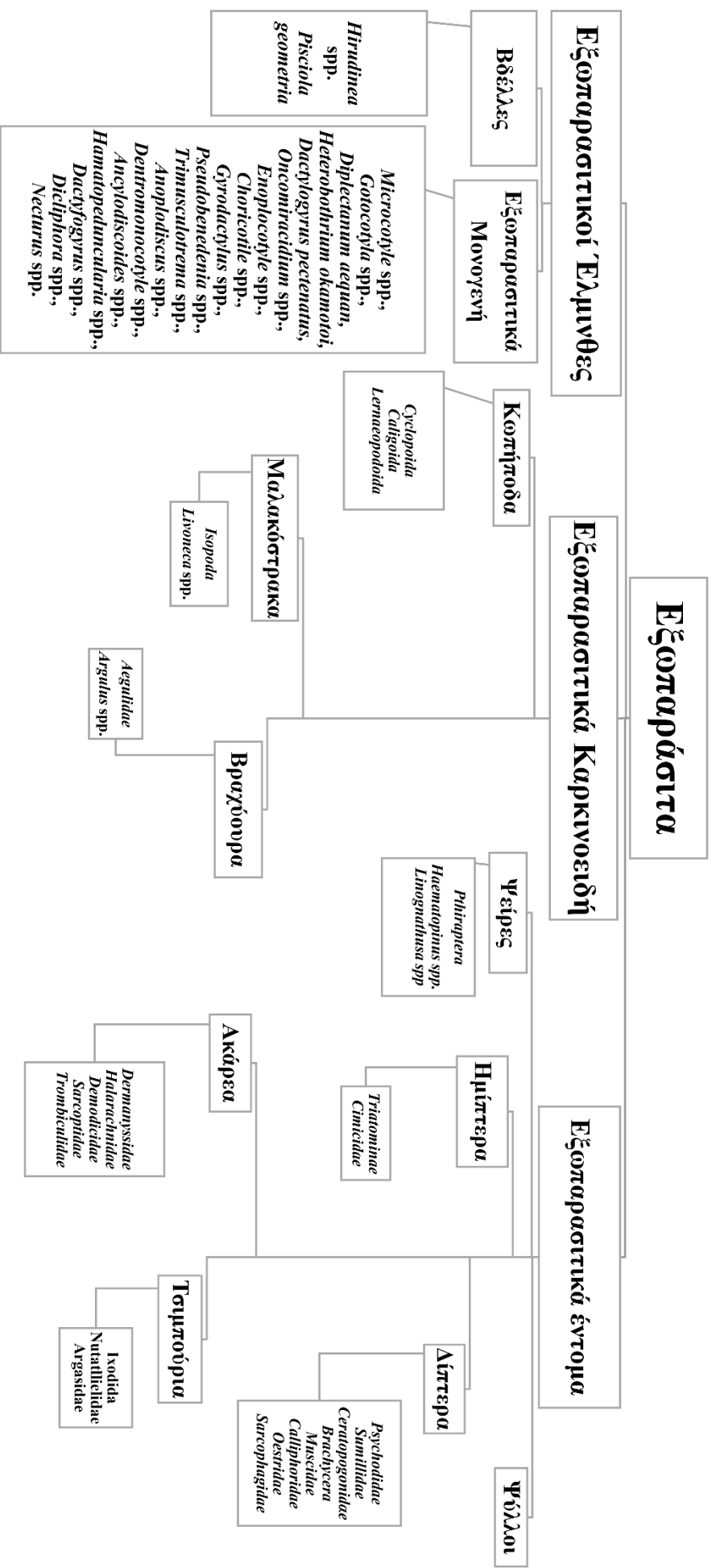
### Κεστώδη

*Taenia* spp.  
*Echinococcus* spp.  
*Diphyllobothrium* spp.

## Νηματώδη

*Trichinella* spp.  
*Anisakis* spp.  
*Toxocara* spp.  
*Gnathostoma* spp.  
*Trichostrongylus* spp.  
*Strongyloides* spp.  
*Capillaria* spp.  
*B. procyonis*

Διάγραμμα 2: Δέντρο ταξινόμησης τροφιμογενών έλμινθων



Διάγραμμα 3: Δέντρο ταξινόμησης τροφιομενών εξωπαράσιτων

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΤΑΣΕΙΣ**

### **2.1 ΤΑΣΕΙΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

Τα παράσιτα στα τρόφιμα και ιδιαίτερα η συχνότητα εμφάνισής τους είναι ρητά συνδεδεμένα με την υγιεινή του περιβάλλοντος της πρωτογενούς παραγωγής εις ότι αφορά την καθαρότητα του χρησιμοποιούμενου νερού και του χώματος με κύρια ανησυχία την επιμόλυνση από κόπρανα.

Οι κύριες κατηγορίες τροφιμογενών παρασίτων που προκαλούν τις διάφορες ζωνόσους και μεταδίδονται στον άνθρωπο είναι τα πρωτόζωα και οι έλμινθες με τα εξωπαράσιτα να μην μας δημιουργούν ιδιαίτερο θέμα. (EFSA Zoonoses Report, 2020; Bahram S.D. *et al*, 2021; Hopla CE., 1994)

Οι πιο διαδεδομένοι έλμινθες που μας απασχολούν για τα τρόφιμα περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων τις ταινίες *Trichinella spiralis*, *Taenia solium*, *Taenia siginata*, *Taenia spiralis*, *Echinococcus granulosus* και *Echinococcus multilocularis*. Αντίστοιχα, τα κυριότερα πρωτόζωα που απαντώνται στα τρόφιμα είναι τα *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium hominis* και *Cryptosporidium parvum*. (EFSA Zoonoses Report, 2020)

Τα στατιστικά δεδομένα της EFSA από τις εκθέσεις για τις τάσεις και πηγές ζωνόσων, ζωνοσογόνων παραγόντων και εξάρσεων τροφιμογενών λοιμώξεων των τελευταίων 15 χρόνων, δείχνουν τάση μείωσης κάθε φύσης μόλυνσης από παράσιτα και της πρόκλησης ζωνόσων. Αυτό οφείλεται στην συνεχή βελτιστοποίηση των πρακτικών παρασκευής και υγιεινής στην βιομηχανία τροφίμων. Χαρακτηριστική είναι η μείωση στα γένη *Anisakis*, *Cryptosporidium*, και *Giardia* κατα εώς και 88%, με τον κύριο κίνδυνο να αποτελεί διαχρονικά το γένος *Trichinella* με κύριο επιμολυντή την *Trichinella spiralis* και το ποσοστό μολύνσεων να περιλαμβάνει το 66,4% όλων των καταγεγραμμένων περιπτώσεων για το 2020, με αντίστοιχα υψηλά ποσοστά σε βάθος χρόνου. (EFSA summary reports on trends and sources of zoonoses 2011-2020)

Συνεπώς, οι πιο επικίνδυνες κατηγορίες τροφίμων λόγω των παρασίτων που συνηθέστερα φέρουν είναι τα ιχθυηρά και το χοιρινό κρέας όπως θα δούμε και στις παρακάτω ενότητες.

### **2.2 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

#### **2.2.1 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΚΡΕΑΤΑ ΚΑΙ ΚΡΕΑΤΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ**

##### **2.2.1.1 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ**

Τα πουλερικά επηρεάζονται κυρίως από νηματώδεις και κεστώδεις έλμινθες και σε πολύ μικρότερο βαθμό από πρωτόζωα, ενώ δεν είναι όλα τα γένη από τα οποία επηρεάζονται τροφιμογενή. Χαρακτηριστικότερα, από τα είδη που μπορούν να μας δημιουργήσουν προβλήματα έχουμε τα *Trichostrongylus tenuis*, *T. pallidicinctus*, *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinarum*, *Subulura brumpti*, *Capillaria caudinflata*, και *Capillaria obsignata* από τα νηματώδη, τα *Raillietina echinobothrida*, *R.*

*tetragona*, *R. cesticillus* *Choanotaenia infundibulum* από τα κεστώδη, και τα *Cyclospora cayetanensis*, από τα πρωτόζωα.

(Mungube, E.O., Bauni, S.M., Tenhagen, B.A. *et al.*, 2008; Tolossa, Y., Shafi, Z., & Basu, A., 2009; Ortega YR, Sanchez R., 2010; Almeria S, Dubey JP., 2020)

Τα πουλερικά επηρεάζονται πολύ χαρακτηριστικά και από εξωπαρασιτικούς κοριούς την ομοταξία των *Cimicidae* με χαρακτηριστικότερο το είδος *Haematosiphon inodorus* που προκαλεί τους ερεθισμό του δέρματος και αναιμία, ενώ μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε θάνατο στα νεότερα πτηνά. Άλλα εξωπαρασίτια που απαντώνται στα πουλερικά είναι τα *Dermanyssus gallinae* από τα ακάρεα και τα *Echidnophaga gallinacea*, *Menacanthus stramineus* από τις ψείρες. (Hopla CE., 1994)

### 2.2.1.2 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΟ ΧΟΙΡΙΝΟ

Το χοιρινό κρέας είναι το πιο επικίνδυνο τρόφιμο εις ότι αφορά τα τροφιμογενή παράσιτα καθώς προσβάλλονται συχνότερα και μάλιστα από τους πιο επικίνδυνους έλμινθες. (βλ. ενότητα 2.1).

Οι χαρακτηριστικότεροι έλμινθες που απαντώνται στο χοιρινό κρέας είναι το γένος *Trichinella* spp., με συνηθέστερες τις *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, και το γένος *Ascaris* spp. από τα νηματώδη. Έχουμε επίσης την *Taenia solium* από τα κεστώδη, ενώ την εμφάνιση του κάνει και το *Toxoplasma gondii* από τα πρωτόζωα. Από εξωπαρασίτια, επηρεάζονται κυρίως από τσιμπούρια με χαρακτηριστικότερο το γένος *Amblyomma testudinarium*. (Pozio E., 2018; Rosenthal, B.M. *et al*, 2008; Rinaldi, L. *et al*, 2009; Lightowlers, M.W., 2010; Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., 2011)

### 2.2.1.3 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΒΟΟΕΙΔΗ

Τα βοοειδή επηρεάζονται από όλες τις κατηγορίες των παρασίτων, όχι όμως σε τέτοιο βαθμό όσο άλλες κατηγορίες ζώων κτηνοτροφίας.

Χαρακτηριστικά είναι τα κρούσματα *Cryptosporidium parvum*, και ωοκυστών *Giardia*, ιδιαίτερα στα νεογνά μοσχάρια, ενώ σε μικρότερο βαθμό προκύπτει θέμα με το *Toxoplasma gondii*, από πλευράς πρωτόζωων.

Από τους έλμινθες, είναι πολύ χαρακτηριστική η εμφάνιση της ταινίας *Taenia saginata* από τα κεστώδη, αλλά ο κύριος όγκος των παρασιτώσεων καταλαμβάνεται από τα γένη *Haemononchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Strongyloides* spp., *Cooperia* spp., *Ostertagia* spp, από τα νηματώδη με χαρακτηριστικότερα τα είδη τα *Haemononchus placei*, *H. similis*, *Cooperia Puncata*, *C. Spatulata*, *C. Pectinate*, *Trichostrongylus axei*, *T. Colubriformis*, *T. Longyspicularis*, *Oesophagostomum radiatum*, *Trichuris discolor* και σε μικρότερο βαθμό τα *Ostertagia ostertagi*, *O. Lyrata*, *O. Trifurkata*, *Capillaria bovis* και *Bunostomum phlebotomum*. (Thais Rabelo dos, *et al*. 2010; Conlan, J.V., Sripta, B., Attwood, S., Newton, P.N, 2011; Schnyder M. *et al*, 2009; Lihua Xiao, R.P. Herd, 1994; Scandrett B. *et al*, 2009; McFadden, A.M., *et al*, 2011)

Τα βοοειδή επηρεάζονται και σε μεγάλο βαθμό από εξωπαρασίτια, συγκεκριμένα από εξωπαρασιτικές μύγες. Χαρακτηριστική είναι η παρασίτηση από τα είδη δίπτερων *Musca autumnalis*, *Stromoxys calcitrans*, *S. sitiens*, *S. nigra*, που φέρουν βακτήρια όπως συνηθέστερα ή *Moraxella bovis* που μολύνουν

τα μάτια και προκαλούν μαστίτιδες, καθώς επίσης και από την οικογένεια *Sumillidae* αλλά και το μiasματικό γένος *Chrysomyia bezziana*. (Wall R. & Stevens J., 1990; FOIL L.D. & FOIL C.S., 1990; HARWOOD R.F. & JAMES M.T., 1979)

Τα βοοειδή επηρεάζονται από τα *Amblyomma* spp., και τα *Haemaphysalis* spp. από την ομάδα των τσιμπουριών. (MUKHEB I A.W., PERRY B.D. & KRUSK A R., 1992; FAO, 1984)

### 2.2.2 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ

Τα λακτοπαραγωγικά βοοειδή επηρεάζονται από κάποια επιπλέον παράσιτα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, όπως είναι τα τρηματώδεις *Schistostoma* spp., *Fasciola* spp, και τα νηματώδη *Ostertagia ostertagi*, *Ascaris lumbricoides*. (Andreas W. Oehm *et al*, 2022; Rajakaruna, R. S., K. N. Warnakulasooriya, 2011)

Η μετανάστευση παρασίτων στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα δεν είναι πιθανή. Και τις φορές που εντοπίζονται, περιορίζονται σε μερικά χαρακτηριστικά είδη πρωτόζωων όπως το *Toxoplasma gondii* και το γένος *Cryptosporidium* spp., ενώ η παρουσία τους οφείλεται αποκλειστικά στην επιμόλυνση λόγω κακής διαχείρισης των πρώτων υλών κατά την παραγωγή. Παρόλα αυτά, ακόμα και στις περιορισμένες περιπτώσεις επιμόλυνσης, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας των παρασίτων σε υψηλές θερμοκρασίες, αντίστοιχες με αυτές των μεσόφιλων μικροοργανισμών, θανατώνονται εύκολα με την απλή παστερίωση και δεν προκύπτει θέμα ασφάλειας τροφίμων. (Kangethe, E., *et al*, 2012; Agosta, S. J., *et al*, 2018; Kutty, Prameela., 2014)

### 2.2.3 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΙΧΘΥΗΡΑ

Τα ιχθυηρά επηρεάζονται από σχεδόν όλες τις κατηγορίες παρασίτων, τόσο από εσωπαρασιτικά πρωτόζωα και έλμινθες, όσο και από εξωπαρασιτικούς έλμινθες και καρκινοειδή παράσιτα, με συνηθέστερα να είναι τα εσωπαρασιτικά. Μερικά από τα χαρακτηριστικότερα παράσιτα που επηρεάζουν τα ιχθυηρά περιλαμβάνουν τα *Euhaplorchis californiensis* από τα Διγενή, τα *Clonorchis Sinensis*, *Opisthorchis* spp., η οικογένεια *Heterophyidae* από τα Τρηματώδη (Διγενή), και τα γένη *Anisakis* spp., και *Gnathostoma* spp. από τα νηματώδη. Από τα πρωτόζωα έχουμε τις ωοκύστες των γενών *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., καθώς και το *Toxoplasma* spp.

(Lafferty, Kevin D., 2008; Pozio, E. 2018; Toledo R. Esteban, *et al*, 2012; Abollo, E., *et al*, 2003; Lima dos Santos, C.A.M., Howgate, P., 2011; Puente, P., *et al*, 2008; Smith, H.V. *et al*, 2007; Schets, F.M. *et al*, 2007)



## 2.2.4 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΦΡΟΥΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΑΧΑΝΙΚΑ

Στα φρούτα και τα λαχανικά ενδέχεται ο κίνδυνος μόλυνσης τόσο από πρωτόζωα όσο και από έλμινθες. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω κακών πρακτικών επεξεργασίας του νερού που χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες. (Bhattarai, R., Kalita, P., *et al*, 2011) Η επιμόλυνση που γίνεται είναι κυρίως από τις προνύμφες ή τα αυγά των παρασίτων προερχόμενα από νερό μολυσμένο με κόπρανα λόγω κακής διαχείρισης των λυμάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει και η επίδραση του τροπικού κλίματος στην συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων τροφιμογενών παρασίτων, με αύξηση της εμφάνισης τους έως και 50% κατά μέσο όρο. Η συνηθέστερη πηγή μόλυνσης είναι τα πρωτόζωα, μιας και έχουν μεγαλύτερη αντοχή ελεύθερα στο νερό από τους έλμινθες. Συχνότερα απαντώνται οι προνύμφες των πρωτοζωικών ειδών *Giardia Lambia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., και *Toxoplasma gondii*. (Newell, D.G., Koopmans, M., *et al* 2010; Pozio, E. 2003; Aida Vafae Eslahi *et al*, 2022)

Αντίστοιχα, από τους έλμινθες, εμφανίζονται περιορισμένα τα είδη *Fasciola hepatica* από τα Τρηματώδη, και *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichostrongylus* spp., *Toxocara* spp. και *Trichuris trichiura* από τα Νηματώδη. (Robertson L.J., Gjerde B., 2001; Said, S.A. 2012; Aida Vafae Eslahi *et al*, 2022; Pozio E. 2018)

## 2.2.5 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΑ

Τα παράσιτα προσβάλλουν κατά κύριο λόγο τα σιτηρά είναι οι νηματώδεις έλμινθες και τα διάφορα εξωπαρασιτικά έντομα, τα οποία επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή τους. Συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικότερα νηματώδη που απαντώνται σε αυτά είναι τα γένη *Heterodera* spp., *Pratylenchus* spp., και *Meloidogyne* spp. (Smiley RW *et al*, 2017; Swarup, G., & Sosa-Moss, C., 1990)

Από πλευράς εξωπαρασιτικών εντόμων έχουμε ιδιαίτερη παρουσία ψειρών με χαρακτηριστικότερα τις ομοταξίες *Hymenoptera*, *Braconidae* και *Aphidiinae*. (Stary, P., 1976; Hopla CE., 1994)

## 2.2.6 ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΣΤΟ ΝΕΡΟ

Το νερό, είτε ως «προϊόν» άμεσης κατανάλωσης είτε ως πρώτη ύλη στην βιομηχανία τροφίμων, είναι το πλέον σύνηθες μέσο για την μεταφορά τόσο τροφιμογενών μικροοργανισμών όσο και παρασίτων. Η χρήση μεθόδων καθαρισμού του νερού όπως η χλωρίωση, ή το φιλτράρισμα, μπορεί να μας απαλλάξει τόσο από τους μικροοργανισμούς όσο και από τα παράσιτα, όμως η ασφάλεια του νερού δεν περιορίζεται εκεί. Εξίσου μεγάλη σημασία έχει η σωστή επεξεργασία των αποβλήτων που προορίζονται για επαναχρησιμοποίηση, ειδικά εις ότι αφορά τα παράσιτα, καθώς επίσης και η προσωπική υγιεινή τόσο σε επίπεδο βιομηχανίας τροφίμων όσο και σε οικιακό. (Omarova A. *et al*, 2018)

Η μόλυνση του νερού μπορεί να γίνει από ένα σημαντικό μέρος ελμινθών με ιδιαίτερη έμφαση όμως στα πρωτόζωα όπως τα γένη *Toxoplasma* spp., *Cryptosporidium* spp., και *Giardia* spp. (Nichols, G., *et al*, 2006; Johnson AM *et al*, 2011; Kourenti, C., *et al*, 2006; Omarova A. *et al*, 2018)

Χαρακτηριστικά υδατογενή γένη έλμινθων περιλαμβάνουν τα *Schistosoma* spp. και *Capillaria* spp. (Pozio E., 2018; Karanis,P., *et al*, 2017)

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ**

Σε αυτό το κεφάλαιο θα δούμε όλες τις συμβατικές και σύγχρονες μεθόδους που βρίσκουν εφαρμογή στον εντοπισμό και την ταυτοποίηση των τροφιογενών παρασίτων.

#### **3.1 ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ**

Στις συμβατικές μεθόδους έχουμε διάφορες μεθόδους χρώσης και ιστολογίας για την εύρεση, απαρίθμηση και ταυτοποίηση των παρασίτων. Πολλές φορές, με την τροποποίηση των τεχνικών που χρησιμοποιούνται στους μικροοργανισμούς, μπορούν να βρουν εφαρμογή και στα παράσιτα. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι οι χρώσεις Ziehl-Neelsen, Kinyoun και Ωραμίνης-Ροδαμίνης. (Mohammad Hasan Namaei *et al*, 2008; Truant, J. P., *et al*, 1962)

##### **3.1.1 ΧΡΩΣΗ ZIEHL-NEELEN / KINYOUN**

Η χρώση **Ziehl-Neelsen** δημιουργήθηκε και χρησιμοποιείται για την μελέτη οξεάντοχων βακτηρίων. Αποτελεί ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης μιας θεραπείας, επιβεβαίωση της ίασης και ταυτοποίηση του αναπτυχθέντος βάκτιλου.

Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή και στον εντοπισμό και ταυτοποίηση παρασίτων, ιδιαίτερα στα πρωτόζωα όπως τα *Cryptosporidium* spp., *Microsporidia* spp., *Cyclospora* spp., και *Isospora* spp. Μεταξύ των διαφόρων χρώσεων έχει τις περισσότερες προοπτικές, βέβαια έχει και τους περιορισμούς της. Για παράδειγμα, είναι δυσχερής η χρώση των προνυμφικών μορφών ή ωοκυστών χωρίς τροποποιήσεις. Ανάλογα με την συγκέντρωση του θεικού οξέος που χρησιμοποιείται κατά την μέθοδο, μπορεί να καταστεί εφικτή η χρώση, έστω αμυδρά, των ωοκυστών σε τιμές μεταξύ 0,5 και 1%.

Η προσέγγιση του Kinyoun στην “χρώση οξεάντοχων βακτηρίων Kinyoun” είναι παρόμοια με την Ziehl-Neelsen, με τις ίδιες πρώτες ύλες και ελαφρώς διαφορετική προσέγγιση στην διαδικασία με κύρια διαφορά την τέλεση της χρώσης ψυχρά, χωρίς θέρμανση.

Η τέλεση αυτής της μεθόδου ψυχρά, χωρίς θέρμανση, σημαίνει μεγαλύτερη συγκέντρωση φουξίνης, και οδηγεί στην αύξηση της αντίθεσης των ωοκυστών και στην καλύτερη παρατήρηση τους.

Η χρώση ξεκινάει με μονιμοποίηση του δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην συνέχεια γίνεται χρώση με φαινικούχα φουξίνη για 20-30 δευτερόλεπτα, θέρμανση, ξέπλυμα με νερό, χρήση θεικού οξέος σε συγκέντρωση από 0,25 μέχρι 10% για 20-60 δευτερόλεπτα, ξέπλυμα με νερό, αντίχρηση με πράσινο του μαλαχίτη 5% για 5 λεπτά, ξέπλυμα με νερό, ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου και παρακολούθηση σε μικροσκόπιο.

Υπάρχουν βέβαια και παραλλαγές όπως η χρήση μπλε του μεθυλενίου αντί για πράσινο του μαλαχίτη, καθώς και χρήση εναλλακτικών της φαινόλης στο διάλυμα φαινικούχας φουξίνης λόγω της τοξικότητας της. Οι προσεγγίσεις Ziehl-Neelsen και Kinyoun, είναι οι σημαντικότερες από τις χρώσεις λόγω της ευαισθησίας τους.

(Krueger, Woodrow B., 1986; Mossallam SF. 2010; A. Βελεγράκη, 2015; Bronsdon MA., 1984; El Naggar HH *et al*, 1999)

### 3.1.2 ΧΡΩΣΗ GIEMSA

Η χρώση **Giemsa** είναι μία πολύ σημαντική διαγνωστική αιματολογική μέθοδος μιας και επιτρέπει όχι μόνο την διάγνωση παρασιτήσεων από πρωτόζωα με χαρακτηριστικότερη αυτή του *Toxoplasma gondii*, αλλά και διάφορους άλλους παράγοντες πρόκλησης νόσων όπως τα είδη *Plasmodium*, *Leishmania*, βακτηρίων όπως το γένος *Chlamydia* κ.α.

Το διάλυμα χρώσης Giemsa περιέχει μικρή ποσότητα διαλύματος μπλε του μεθυλενίου με τον κύριο όγκο του να αποτελεί ένα αραιό διάλυμα από φωσφορικό μονοκάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) και φωσφορικό οξύ ( $\text{HPO}_4$ ) σε αναλογία mol περίπου 2:3 (1mol  $\text{HPO}_4$  / 0,67mol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  σε 1 L νερό).

Η διαδικασία αυτή έχει 2 παραλλαγές, μία λεπτής στρώσης και μία παχιάς στρώσης. Η παραλλαγή της λεπτής στρώσης ξεκινάει με την μονιμοποίηση μιας σταγόνας αίματος σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα απλώνοντας την αφήνοντας την να ξεραθεί στον αέρα. Η τελική μονιμοποίηση γίνεται με χρήση απόλυτης μεθανόλης και ξήρανση στον αέρα. Στην συνέχεια γίνεται χρώση με διάλυμα Giemsa για 30 λεπτά, βύθιση σε νερό, ξήρανση και παρατήρηση σε μικροσκόπιο.

Η παραλλαγή της παχιάς στρώσης ξεκινάει πάλι με μια μικρή σταγόνα αίματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα με το άπλωμα της με την βοήθεια μιας άλλης αντικειμενοφόρου πλάκας και μετά την ξήρανση στον αέρα, δεν έχουμε μονιμοποίηση με μεθανόλη, αλλά απευθείας βουτιά σε νερό. Αυτό προκαλεί την αιμόλυση των ερυθρών κυττάρων και την απελευθέρωση των παρασίτων για καλύτερη παρατήρηση μετά την ξήρανση στον αέρα, έτσι, αυτή η προσέγγιση είναι καταλληλότερη για την διάγνωση παρασιτήσεων. (Giemsa G., 1904; Mehlhorn, H., 2016)

### 3.1.3 ΤΡΙΧΡΩΜΗ ΧΡΩΣΗ

Η τεχνική της τρίχρωμης χρώσης χρησιμοποιείται κυρίως για την μικροβιολογική ανάλυση ιστών αλλά δεν περιορίζεται εκεί, χρησιμοποιείται και σε δείγματα κοπράνων. Χρησιμοποιεί δύο ή τρεις χρώσεις ανάλογα με την περίπτωση, με πολλαπλές παραλλαγές και έχει στόχο την καλύτερη διάκριση των μικροοργανισμών ή παράσιτων στόχων σε δείγματα ιστών, όπως για παράδειγμα στον διαχωρισμό μυ και κολλαγόνου. (Kantarci,M, *et al*, 2012)

Τροποποίηση της μεθόδου μπορεί να διευκολύνει την μελέτη και άλλων ιστών όπως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά. (Said,S.A., 2012)

Το συνηθέστερο διάλυμα τρίχρωμης χρώσης για έλεγχο παρασίτων περιλαμβάνει για κάθε 100ml απιονισμένου νερού, 0,6g Chromotrope 2R, 0,3g Light Green SF, 0,7g Phosphotungstic acid και 1,0ml

οξικό οξύ. Χρησιμοποιείται επίσης Ιώδιο σε διάλυμα αιθανόλης 70%, διάλυμα αιθανόλης 100% και 70%, αραιό διάλυμα ξυλίνης ή τολουολίου και διάλυμα οξινισμένης αιθυλικής αλκοόλης 90%.

Η διαδικασία ξεκινάει με μονιμοποίηση του δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα, προσθήκη διαλύματος Ιωδίου-Αλκοόλης για 2 με 5 λεπτά, 2 ξέπλυμα με αιθανόλη 70% για 5 λεπτά έκαστο, διάλυμα τριχρώμης χρώσης για 10 λεπτά, ξέπλυμα με οξινισμένη αιθυλική αλκοόλη 90% για 5 δευτερόλεπτα, εμβάπτιση σε διάλυμα αιθανόλης 100% μερικές φορές για ξέπλυμα, 2 εμβάπτισεις σε 100% αιθυλική αλκοόλη για 3 λεπτά η κάθε μία, εμβάπτιση σε διάλυμα ξυλίνης ή τολουολίου για 10 λεπτά, τοποθέτηση καλυπτρίδας και παρακολούθηση σε μικροσκόπιο.

Τα παράσιτα βάζονται μπλε-πράσινα με λίγο μωβ, το υπόβαθρο πράσινο και τυχόν ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν καταναλώσει, κόκκινα έως κόκκινα-μωβ. (Daissy Vargas Sepúlveda, 2013; Nisha Rijal, 2022)

Είναι μια πολύ καλή μέθοδος μιας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρωτόζωα και έλμινθες με πολύ καλή ευαισθησία αντίστοιχη με την τεχνική Kato-Katz (βλ. ενότητα 3.1.5).

### 3.1.4 ΧΡΩΣΗ ΩΡΑΜΙΝΗΣ-ΡΟΔΑΜΙΝΗΣ

Η χρώση Ωραμίνης-Ροδαμίνης είναι άλλη μια ιστολογική μέθοδος για απεικόνιση οξεάντοχων βακτηρίων αντίστοιχη με την Ziehl-Neelsen και την προσέγγιση Kinyoun, που επίσης βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση των παρασίτων. Η μέθοδος αυτή έχει πολύ μεγάλη ευαισθησία, αντίστοιχη ή και μεγαλύτερη από τις προαναφερθέντες, παρ' όλα αυτά, έχει σημαντικούς περιορισμούς μιας και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έλμινθες. Μας δίνει όμως καλή χρώση ακόμα και στις ωκύστες διαφόρων πρωτοζωικών παρασίτων όπως των *Cryptosporidium* πράγμα που είναι δυσκολότερο με τις άλλες μεθόδους χωρίς τροποποιήσεις. (QUADROS ROSILÉIA M. DE, *et al*, 2006; Idris, M. A. *et al*, 2001)

Το διάλυμα της χρώσης Ωραμίνης-Ροδαμίνης περιλαμβάνει 1,5g Ωραμίνης Ο και 0,75g Ροδαμίνης Β διαλυμένα σε 75ml γλυκερίνης, 10ml θερμοστασμένων κρυστάλλων φαινόλης και 50ml απιονισμένο νερό. Χρησιμοποιούνται επίσης διάλυμα αιθανόλης 70% οξινισμένο με 0,5ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος, και αραιό διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου 0,5% w/v.

Η διαδικασία ξεκινάει με μονιμοποίηση του δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα με άπλωμα και ξήρανση στον αέρα. Γίνεται εμβάπτιση στο διάλυμα της χρώσης Ωραμίνης-Ροδαμίνης για 15 λεπτά, ξέπλυμα με απιονισμένο νερό, εμβάπτιση με το οξινισμένο διάλυμα αλκοόλης για 2-3 λεπτά, ξέπλυμα με απιονισμένο νερό, εμβάπτιση με το διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου για 3-4 λεπτά, τελικό ξέπλυμα με απιονισμένο νερό και ξήρανση στον αέρα. Μετά γίνεται έλεγχος στο μικροσκόπιο. Τα παράσιτα λάμπουν πορτοκαλοκόκκινα μπροστά από ένα μαύρο υπόβαθρο. (Truant, J. P. *et al*, 1962)

### 3.1.5 ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΤΟ-KATZ

Η τεχνική Kato-Katz είναι μία διαγνωστική μέθοδος αναλύουμε δείγματα κοπράνων για την εύρεση κυρίως παρασιτικών ελμινθών, αλλά έχει εφαρμογή και στα πρωτόζωα. Παρόλα αυτά, καμία ιστολογική μέθοδος, ή μέθοδος χρώσης, δεν είναι απόλυτη μιας και δε μπορούμε να περιμένουμε ότι μία μέθοδος που είναι αποτελεσματική στις ωοκύστες των πρωτόζωων θα είναι εξίσου αποτελεσματική και στις προνυμφικές μορφές των έλμινθων, οπότε ο συνδυασμός μεθόδων είναι απαραίτητος στην μελέτη και διάγνωση των παρασιτώσεων. Η τεχνική Kato-Katz συνδυάζεται με την τρίχρωμη χρώση και και την χρώση Ωραμίνης-Ροδαμίνης για βέλτιστα αποτελέσματα. (Idris, M. A., & Al-Jabri, A. M., 2001)

## 3.2 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Οι σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης των παρασίτων χωρίζονται σε τρεις κύριες ομάδες, τις μεθόδους βιοαισθητήρων, τις ανοσολογικές βιοχημικές αναλύσεις, και τις μεθόδους βασισμένες σε μακρομόρια όπως το DNA και το RNA, με την κάθε μέθοδος να έχει τα προτερήματα και τα μειονεκτήματα της. Είναι προτιμότερες έναντι των συμβατικών μεθόδων παρότι χρονοβόρες, λόγω της ακρίβειας και της ευαισθησίας τους.

### 3.2.1 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Ένα σύστημα ανάλυσης με βιοαισθητήρα περιλαμβάνει 3 τμήματα, πρώτον, έναν ανιχνευτή με τέτοιο βιοϋποδοχέα ο οποίος θα αλληλεπιδράσει και θα προσδεθεί με τον αναλυτέο στόχο μας, δεύτερον, ένα στοιχείο του ανιχνευτή που θα μας δώσει σήμα, όπως είναι το χρωμογόνο, φθορισμογόνο ή σήμα χημειοφωταύγειας, για ποιοτική ή και ποσοτική εκτίμηση της ανάλυσης, και τρίτον, μία συσκευή ανάλυσης που μας εμφανίζει τα αποτελέσματα όπως είναι το φωτόμετρο.

Μερικοί συνήθεις ανιχνευτές/βιοαισθητήρες περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο τα αντισώματα, τα ένζυμα, τις αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, ολόκληρα κύτταρα, οργανίδια κυττάρων, διάφορους ιστούς και υλικά που μιμούνται βιολογικά μόρια.

(Kissinger PT., 2005; Vidyadharani, G., *et al*, 2022)

Πέρα από τις περιπτώσεις της ELISA (βλ. ενότητα 3.2.2) και κάποιων μεθόδων PCR που περιλαμβάνουν τέτοια συστήματα ανιχνευτών (βλ. ενότητες 3.2.3.4, 3.2.3.5) που θα αναφερθούν στην συνέχεια, το σημαντικότερο σύστημα βιοαισθητήρων που έχει βρεί εφαρμογή στον εντοπισμό παθογόνων ιών, μικροοργανισμών, αλλά και παρασίτων, είναι το σύστημα CRISPR/Cas.

Αρχικά το CRISPR είναι μία κατηγορία αλληλουχιών DNA που απομονώθηκε από προκαρυωτικούς οργανισμούς όπως τα βακτήρια και τα αρχαία. Είναι τμήμα του συστήματος άμυνας τους μιας και έχουν

την δυνατότητα εντοπισμού του DNA ξενιστών και καταστροφής του. (Andrey Golubov, 2021; Kaminski, M.M. *et al.* 2021)

Με αυτή την ικανότητα του να εντοπίζει, αλλά και να αποκόπτει συγκεκριμένες αλληλουχίες γενετικού υλικού, τις οποίες μάλιστα έχουμε την δυνατότητα να καθορίσουμε, το CRISPR μπορεί να χρησιμοποιηθεί, όχι μόνο ως ένας ανιχνευτής, αλλά και ως ένα μέσο γενετικής μηχανικής, καθώς, σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες CAS, και ιδιαίτερα την CAS9, CAS12 (για DNA) και CAS13 (για RNA), μπορούμε να εισάγουμε όποια αλληλουχία θέλουμε στο γονιδίωμα ενός οργανισμού, είτε *in vivo* είτε *in vitro*. Επιπλέον, ο συνδυασμός του συστήματος CRISPR/Cas με μεθόδους ενίσχυσης γενετικού υλικού όπως είναι η NASBA (βλ. ενότητα 3.2.3.8), η LAMP/RT-LAMP (βλ. ενότητα 3.2.3.7) και PCR (βλ. ενότητα 3.2.3.1) αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου. (Yang, H. *et al* 2023; Hossain MA., 2021; Kissinger PT., 2005)

### 3.2.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Οι ανοσολογικές βιοχημικές αναλύσεις βασίζονται στην σχέση αντιγόνου-αντιγονικού καθοριστή, όπου αντιγόνο μπορεί να είναι ένα οποιοδήποτε οργανικό και μη μόριο, το οποίο προσδένεται λόγω χημικής συγγένειας και στερεοχημικής διάταξης σε έναν αντιγονικό καθοριστή. Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικά μόρια που παράγονται από τα β-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μας όταν ένα αντιγόνο προσβάλλει τον οργανισμό μας. Ο αντιγονικός καθοριστής είναι εκείνη η περιοχή ενός αντισώματος που αναγνωρίζει μία και μόνο περιοχή του εκάστοτε αντιγόνου. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που παράγονται από έναν κλώνο Β-λεμφοκυττάρων είναι τα πιο σημαντικά λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης που παρουσιάζουν στην πρόσδεση τους με ένα αντιγόνο. Λόγω αυτής τους της εξειδίκευσης χρησιμοποιούνται κατά κόρον ως ανιχνευτές, ιών, μικροοργανισμών και παρασίτων, αλλά και γενικότερα πρωτεϊνών και γενετικού υλικού.

Η αρχή των ανοσολογικών αναλύσεων βασίζεται αρχικά στην πρόσδεση ενός αντιγόνου, συνήθως πρωτεϊνικής φύσης, στο αντίσωμα το οποίο συνήθως είναι μονοκλωνικό, το οποίο αντίσωμα είναι σε τέτοια διάταξη ώστε με την πρόσδεση του αντιγόνου να απελευθερώσει είτε μια χρωστική, είτε μία φθορίζουσα ουσία, είτε μία ουσία που προκαλεί φωταύγεια, για να σηματοδοτήσει την παρουσία του αντιγόνου ή και το αντίστροφο, και να μας βοηθήσει στην ποσοτικοποίηση του. (J.M. Walher, E.B. Gingold editors, 1995; M.D. Trevan, S. Boffey, K.H. Goulding and P. Standbury, McGraw Hill., 1990.)

Η συνηθέστερη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η μέθοδος ELISA ή ενζυμική ανοσοροφητική ανάλυση, η οποία μπορεί να γίνει είτε άμεσα, είτε έμμεσα, μεταξύ των υπόλοιπων παραλλαγών της.

Η μέθοδος βασίζεται στην δράση ενός ενζύμου, προσκολλημένο είτε άμεσα είτε έμμεσα στο αντίσωμα-στόχο μας που θα καταλύσει την αντίδραση ενός υποστρώματος μετατρέποντας το σε χρωμογόνο, φωταυγές ή φθορισμογόνο σε αναλογικότητα με την ποσότητα του αντισώματος που έχει εντοπιστεί.

Η διάταξη της ELISA ξεκινάει από την μονιμοποίηση του αντιγόνου σε μία επιφάνεια, συνήθως έναν δοκιμαστικό σωλήνα. Για την έμμεση προσέγγιση, γίνεται προσθήκη του δείγματος ώστε να γίνει η πρόσδεση του αντισώματος-στόχου, και έπειτα ξεπλένουμε με απιονισμένο νερό την επιφάνεια ώστε να

μείνουν μόνο τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος, γίνεται προσθήκη δεύτερων αντισώματα τα οποία έχουν ειδικά ένζυμα προσκολλημένα πάνω τους, τα οποία αντισώματα προσκολλούνται στα πρώτα που προήλθαν από το δείγμα μας. Τέλος, μετά από ένα ακόμα ξέπλυμα με απιονισμένο νερό, προσθέτουμε ένα διάλυμα με ένα υπόστρωμα που θα απελευθερώσει χρωμογόνες ή φθορισμογόνες ουσίες οι οποίες μας δίνουν τόσο ποιοτικό αποτέλεσμα όσο και την δυνατότητα ποσοτικοποίησης, μετά από μέτρηση σε ένα φωτόμετρο.

Στην άμεση προσέγγιση έχουμε πρόσδεση του προαναφερθέντος ενζύμου απευθείας στα αντισώματα-στόχους μας, το οποίο σύμπλοκο προσδένεται πάνω στην βάση των μονιμοποιημένων αντιγόνων, και στο τέλος γίνεται προσθήκη το χρωμογόνου υποστρώματος όπως και στην έμμεση ELISA, και παίρνουμε τα αποτελέσματα μας. Αυτή η προσέγγιση βέβαια μπορεί να μας οδηγήσει σε αρνητικό σφάλμα στην ποσοτικοποίηση σε περίπτωση που δεν προσκολλήσουμε σωστά το ένζυμο στο αντίσωμα-στόχο, γι' αυτό είναι προτιμότερη η έμμεση προσέγγιση.

(Eva Engvall, Peter Perlmann, 1972; Hornbeck P., 2001; Rudolf M Lequin, 2005

### **3.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ/ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ/ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

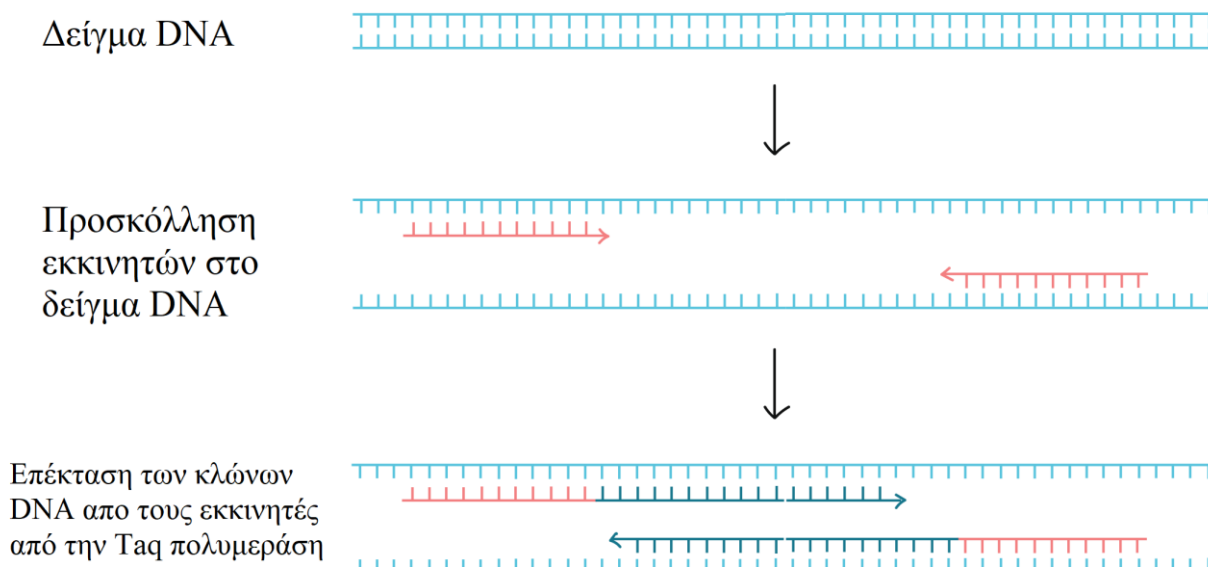
Οι μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης παρασίτων με βάση μακρομόρια νουκλεϊκών και ριβονουκλεϊκών οξέων περιλαμβάνουν όλες εκείνες τις μεθόδους ενίσχυσης ή αντιγραφής συγκεκριμένου χαρακτηριστικού τμήματος DNA ή RNA ενός οργανισμού στην προσπάθεια ταυτοποίησης του, και της παρουσίας του σε ένα δείγμα τροφίμου, στο νερό, στο περιβάλλον ή και σε επίπεδο διάγνωσης αλλά και έρευνας.

#### **3.2.3.1 ΤΕΣΤ PCR**

Η PCR ή Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ή ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Έχει την μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, μαζί με τις παραλλαγές της, από τις υπόλοιπες μακρομοριακές μεθόδους που θα δούμε στην συνέχεια. Η μέθοδος βασίζεται στην δράση που έχουν οι πολυμεράσες από την φύση τους στο να συνθέτουν την συμπληρωματική έλικα DNA από έναν μητρικό κλώνο.

Στην PCR, μιας και γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες, χρησιμοποιείται η θερμοάντοχη Taq πολυμεράση. Χρησιμοποιούνται επίσης οι κατάλληλοι εκκινητές, που είναι μικρές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων συμπληρωματικές στον κάθε κλώνο DNA, που καθορίζουν το τμήμα που θα ενισχυθεί, αλλά και την εκλεκτικότητα. Στο περιβάλλον της αντίδρασης έχουμε και διάλυμα με νουκλεοτίδια με τα οποία η Taq πολυμεράση θα μπορέσει να συνθέσει τις συμπληρωματικές αλυσίδες.

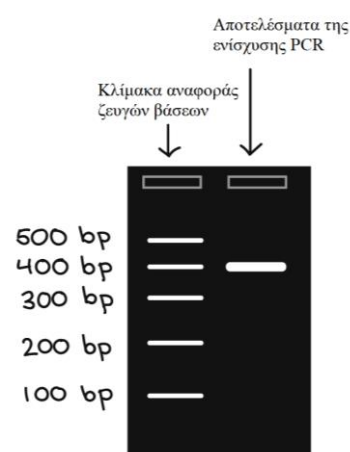
Η διαδικασία ξεκινάει με τον διαχωρισμό των έλικων του δείγματος DNA πράγμα που επιτυγχάνεται με υψηλή θερμοκρασία (96°C). Στην συνέχεια έχουμε την πρόσδεση των εκκινητών στις έλικες στους 55-65°C. Και τέλος έχουμε την επέκταση των κλώνων DNA από την Taq πολυμεράση ξεκινώντας από τους εκκινητές στους 72°C. Η διαδικασία αυτού του θερμικού κύκλου επαναλαμβάνεται 25-40 φορές για να γίνει ο πολλαπλασιασμός της περιοχής που καθορίζουν οι εκκινητές.



Διάγραμμα 4: Τα βασικά βήματα της PCR.

Στην συνέχεια κάνουμε ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο προσδένεται στο DNA και λάμπει κάτω από το υπεριώδες φως. Η διαφορά φορτίου στον σταθμό της ηλεκτροφόρησης μετακινεί τα τμήματα DNA που έχουν προκύψει κατά την PCR με βάση το μοριακό τους βάρος. Συγκρίνοντας λοιπόν το δείγμα μας με μία πρότυπη βαθμονομημένη σκάλα με γνώμονα το μήκος της αλυσίδας DNA σε ζευγάρια αζωτούχων βάσεων (bp), μπορούμε να διαπιστώσουμε αν έχει πολλαπλασιαστεί το DNA στόχος και να βγάλουμε τα πορίσματα μας.

(Clive R. *et al*, 1997; Douglas Wilkin, 2016)



Διάγραμμα 5: Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης

Αυτή η κλασσική μέθοδος χρησιμοποιείται κατά κόρον και στον εντοπισμό και ταυτοποίηση των τροφιμογενών παρασίτων, με τις παραλλαγές της καθώς και τις λοιπές μεθόδους εμπνευσμένες από την αρχή της PCR να βρίσκουν εξίσου εφαρμογή και στα παράσιτα όπως θα δούμε στις επόμενες ενότητες.



Χαρακτηριστικές περιπτώσεις εφαρμογής της PCR στην διάγνωση των τροφιμογενών παρασίτων περιλαμβάνουν τον εντοπισμό των Κεστωδών *Taenia saginata* και *Taenia solium* προερχόμενες από βοοειδή και τους χοίρους αντίστοιχα, με δείγμα κοπράνων του ασθενή, τον *Echinococcus granulosus*, και το *Toxoplasma gondii* από δείγμα αίματος. Χρησιμοποιείται δε και για μη τροφιμογενή παράσιτα χαρακτηριστικότερα των γενών *Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp., και *Leucocytozoon* spp., του είδους *Trypanosoma cruzi* κτλ. (Nunes C.M. *et al*, 2003; Silveira R. *et al*, 2011; Sherifi K. *et al* 2011)

### 3.2.3.2 NESTED PCR

Η εμφωλιάζουσα PCR (Nested PCR), είναι μία παραλλαγή της PCR ειδικότερη για περιπτώσεις που έχουμε πολύ μικρή ποσότητα γενετικού υλικού ή έχουμε ένα ετερογενές μείγμα γενετικού υλικού, από διάφορα κύτταρα. Σε περιπτώσεις μικροβιολογικά επιβαρυνμένων δειγμάτων, όπως δείγματα κοπράνων, ή ακόμα και στα ίδια τα τρόφιμα, ή και στο νερό είναι προτιμότερη μια εμφωλιάζουσα PCR, ιδιαίτερα σε τρόφιμα όπως είναι τα ιχθυηρά ή το κρέας αλλά και σε επίπεδο διάγνωσης. Βρίσκει εφαρμογή ιδιαίτερα στις διαγνώσεις ταινιάσεων και τοξοπλάσμοσεων. (Putignani, L., *et al*, 2011; Mayta, H., *et al*, 2008)

Η μέθοδος περιλαμβάνει την χρήση 2 ζευγών εκκινητών, ένα για την περιοχή πριν και μετά από το τμήμα του γονιδιώματος στόχου και το 2<sup>ο</sup> ζεύγος για την τελική ενίσχυση τμήματος στόχου στο εσωτερικό αυτής της περιοχής που έχει καθοριστεί από το 1<sup>ο</sup> ζεύγος. Ουσιαστικά το κάθε αντίγραφο ενισχύεται 2 φορές στον κάθε θερμικό κύκλο. Έτσι, πετυχαίνουμε την αύξηση της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας του τεστ, έχοντας μια πιο καθαρή εικόνα. (Green MR, Sambrook J., 2019)

### 3.2.3.3 RT-PCR

Η RT-PCR είναι μία προσέγγιση της απλής PCR με την επιπρόσθετη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης. Η αντίστροφη μεταγραφή μετατρέπει το RNA-στόχο μας στο cDNA, από όπου συνεχίζει η τυπική πορεία μιας απλής PCR.

Αυτό μας επιτρέπει να μελετάμε και να ανιχνεύουμε οργανισμούς που έχουν αποκλειστικά RNA, αλλά δεν περιοριζόμαστε εκεί. Παρόλο που οι οργανισμοί σε επίπεδο έρευνας αλλά και διάγνωσης με μία τυπική PCR ελέγχονται με την στοχευμένη ενίσχυση χαρακτηριστικού τμήματος του γονιδιώματος τους, υπάρχει η τάση στο πεδίο των παρασίτων, και όχι μόνο, του ελέγχου γι' αυτά έμμεσα με την ανίχνευση γονιδίων του *ssrRNA*. Αυτό επιτρέπει μεγαλύτερη εξειδίκευση των ελέγχων PCR, και σε συνδυασμό με την προσέγγιση μιας qPCR, όπως είναι η Real-Time PCR ή η TaqMan PCR, μπορούμε όχι μόνο να ανιχνεύσουμε πολλαπλά είδη του ίδιου γένους σε ένα δείγμα, αλλά και να τα ποσοτικοποιήσουμε.

Χαρακτηριστική είναι η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση διαφόρων ειδών πρωτόζωων σε δείγματα νερού όπως είναι τα γένη *Cryptosporidium* και *Toxoplasma*. (Skotarczak, B., 2012; Lin, Z., *et al*, 2012)

### 3.2.3.4 TAQMAN PCR

Η TaqMan PCR είναι μία βελτιωμένη μέθοδος real-time PCR που χρησιμοποιεί φθορισμογόνο δείκτη σε τέτοια διάταξη ώστε σε πραγματικό χρόνο, να βλέπουμε την πορεία της PCR, αλλά και να ποσοτικοποιούμε τα αποτελέσματα.

Ειδικότερα, έχουμε τον ανιχνευτή TaqMan, που είναι ένα 5'-3' ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει έναν φθορισμογόνο δείκτη στο 5' άκρο και έναν αναστολέα του φθορισμογόνου δείκτη στο 3' άκρο. Αυτός ο ανιχνευτής είναι σχεδιασμένος για να προσκολληθεί πάνω στο τμήμα του DNA που ενισχύεται και καθώς η Taq πολυμεράση δημιουργεί την συμπληρωματική 5'-3' έλικα (με κατεύθυνση 3'-5' ως προς την αρχική αλυσίδα), έρχεται σε επαφή με τον ανιχνευτή TaqMan και τον αποκόπτει από το 5' άκρο προς το 3' άκρο. Μόλις κοπεί τελευταίο το 3' άκρο που φέρει τον αναστολέα, παύει η ανασταλτική του ιδιότητα και αφήνεται ο δείκτης να φθορίσει.

Έτσι, δημιουργούμε μια άμεση σχέση μεταξύ του πλήθους των προϊόντων της PCR και της έντασης του φθορισμού μιας και για κάθε ένα αντίγραφο του DNA στόχου έχουμε ένα μόριο φθορίζουσας ουσίας που απελευθερώνεται και ενεργοποιείται. Δημιουργώντας πρότυπα διαγράμματα αναφοράς μπορούμε να βρούμε άμεσα το πλήθος ή το βάρος του εκάστοτε PCR προϊόντος. Και έχοντας πολλαπλά δείγματα με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών και ανιχνευτών TaqMan για διάφορα είδη του ίδιου γένους ή και άλλων οργανισμών-στόχων μπορούμε να κάνουμε πολύ πιο γρήγορα ενδεδειγμένη έρευνα αλλά και διάγνωση. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τις παρασιτώσεις, τροφιογενών και μη, μιας και είναι πολλαπλά τα γένη των παρασίτων, και από διαφορετικές ομάδες ακόμα, που ενδέχεται να δημιουργήσουν πρόβλημα στην διάγνωση.

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για κάθε περίπτωση ελέγχου για παράσιτων όπως έλεγχο στα τρόφιμα, το νερό, στο περιβάλλον πρωτογενούς παραγωγής αλλά και σε επίπεδο έρευνας και διάγνωσης. Ένα αρνητικό είναι το κόστος, μιας και οι ανιχνευτές TaqMan είναι τυποποιημένοι και το κόστος ανεβαίνει, ειδικά όσο αυξάνουμε το πλήθος των παρασίτων προς έλεγχο.

(Dötsch, J. *et al*, 2005; Barranco-Gómez *et al*, 2023; Liu, J., *et al*, 2013)

### 3.2.3.5 MULTIPLEX PCR / REVERSE LINE BLOT HYBRIDIZATION ASSAY

Αρχικά στην multiplex PCR χρησιμοποιούμε πολλαπλά ζεύγη εκκινητών ώστε να έχουμε μια καλύτερη εικόνα για τον οργανισμό-στόχο που εξετάζουμε. Βέβαια, στην προκειμένη περίπτωση, επιλέγουμε εκκινητές για πολλαπλά είδη ζωνοσογόνων οργανισμών που εξετάζουμε ώστε μετέπειτα με τον συνδυασμό της τεχνικής υβριδοποίησης reverse line blot, χρησιμοποιώντας πολλαπλούς ανιχνευτές παράλληλα, για τα διάφορα είδη παρασίτων που θέλουμε να εξετάσουμε στην προκειμένη περίπτωση, να μπορέσουμε να κάνουμε πιο ενδεδειγμένο έλεγχο. Η προσέγγιση αυτή είναι οικονομική και ακριβής, όμως παίρνει πολύ ώρα, με την multiplex PCR να παίρνει 4 ώρες και την υβριδοποίηση να παίρνει 6 ώρες. (O'Sullivan MV *et al*, 2011; Bilgic, H.B., *et al* 2017)

Η διαδικασία ξεκινάει αρχικά με την μονιμοποίηση των ανιχνευτών σε ειδική επαναχρησιμοποιήσιμη μεμβράνη, μετά, γίνεται η υβριδοποίηση του κάθε ανιχνευτή με το εκάστοτε προϊόν της PCR που καθόρισαν οι εκκινητές και για το οποίο είναι επιλεγμένος ο κάθε ανιχνευτής. Σηματοδοτούμε όμως πρώτα το κάθε προϊόν της PCR με βιοτίνη στο ένα άκρο, όπου μετέπειτα, έρχεται και προσκολλάται σε αυτή μία πρωτεΐνη, στρεπταβιδίνη (Streptavidin), η οποία με την σειρά της είναι σηματοδοτημένη με ένα ένζυμο υπεροξειδάσης, και τέλος για την ανίχνευση των αποτελεσμάτων μέσω χημειοφωταύγειας, γίνεται προσθήκη ενός διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου και ενός αντιδραστήριου τέτοιου ώστε με την

ενζυμική δράση να προκύψει φώς το οποίο αποτυπώνουμε σε ειδικό φωτοευαίσθητο φιλμ, και αναλύουμε τα αποτελέσματα. (Kong, F., & Gilbert, G. L., 2007).

### 3.2.3.6 PCR-RFLP

Με την μέθοδο RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) εκμεταλλευόμαστε την εξειδικευμένη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών ώστε να αποκόψουμε το δίκλωνο DNA ενός οργανισμού-στόχου σε συγκεκριμένα γονίδια, ώστε εκμεταλλευόμενοι τον πολυμορφισμό που εμφανίζουν, να μπορέσουμε να διακρίνουμε και να χαρτογραφήσουμε τα διάφορα είδη, και να τα μελετήσουμε. Για να το πετύχουμε αυτό, γίνεται η χρήση σηματοδοτημένων αλληλουχιών DNA ως ανιχνευτές που υβριβοποιούνται με ένα ή περισσότερα από τα χωνευμένα από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες τμήματα.

Αυτή η μέθοδος μπορεί να συνδυαστεί με την πιο σύγχρονη PCR ώστε να ενισχυθούν οι περιοχές στις οποίες ανήκουν τα τμήματα που εξετάζουμε διευκολύνοντας την ανάλυση.

(B. Mittal, P. Chaturvedi, S. Tulsyan, 2013; Jarcho J., 2001)

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε παράσιτο με ιδιαίτερη εφαρμογή στα κρυπτοσπορίδια από τα πρωτόζωα, στις ταινίες από τα κεστώδη και στα νηματώδη. (Nunes, C.M., *et al*, 2005; Skotarczak, B., 2012; Umehara, A., *et al*, 2006)

### 3.2.3.7 LAMP & RT-LAMP ASSAY

Η μέθοδος **LAMP** ή Ισοθερμική Ενίσχυση Μέσω Βρόγχου, είναι μια σχετικά πρόσφατη τεχνική ενίσχυσης δειγμάτων DNA για τον εντοπισμό συγκεκριμένων ασθενειών ως μια εναλλακτική της PCR, που αναπτύχθηκε το 2000 από μια μικρή ομάδα του τμήματος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας του πανεπιστημίου του Τόκιο. Αντίστοιχα, η **RT-LAMP**, είναι η ίδια μέθοδος με την επιπρόσθετη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης για τον εντοπισμό RNA. (Notomi T *et al*, 2000)

Τα τελευταία χρόνια με αφορμή την έξαρση του ιού Sars-CoV-2 του 2019, και της ανάγκης για περισσότερα και γρηγορότερα μοριακά τεστ διάγνωσης, έχει επιστρατευθεί η μέθοδος αυτή ενώ παράλληλα, έχει εξελιχθεί η εφαρμογή της και στον περιορισμένο εντοπισμό λοιπών ιών, παθογόνων μικροοργανισμών, και παρασίτων που προκαλούν τις διάφορες ζωνόσους. Η ακρίβεια της μεθόδου είναι μειωμένη από τις συμβατικές PCR, αλλά είναι πολύ καλύτερη από άλλες μεθόδους όπως είναι τα RAPID τεστ. (Chaouch M., 2021)

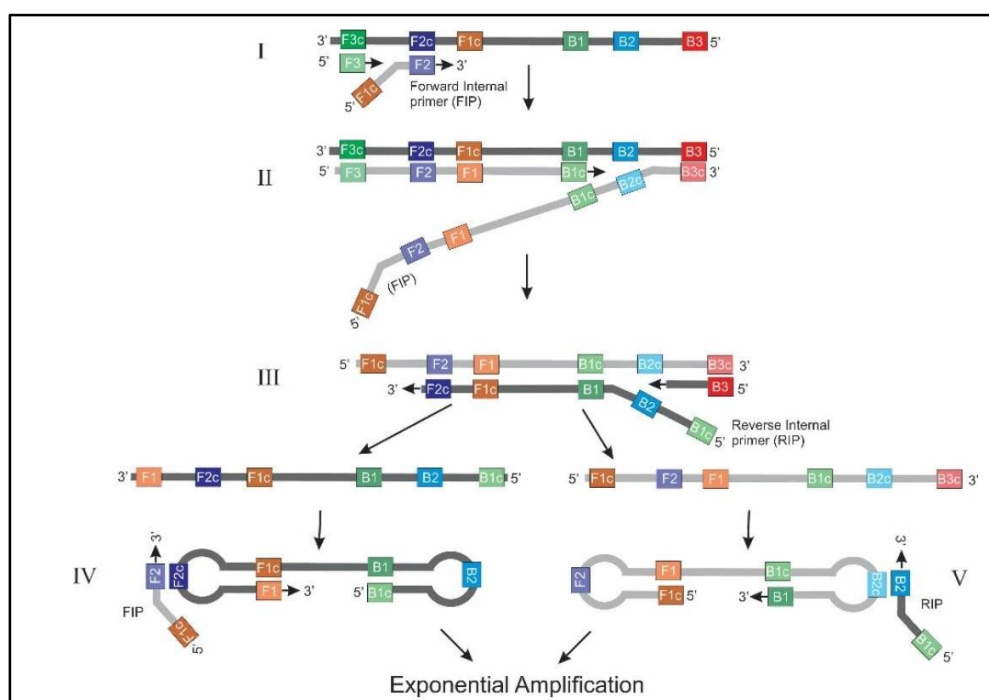
Σε αντίθεση με τις διάφορες τεχνικές PCR, η LAMP γίνεται σε σταθερή θερμοκρασία 60-65 °C χρησιμοποιώντας την πολυμεράση Bst από το θερμοφιλο είδος βακτηρίου *Bacillus stearothermophilus* έναντι της Taq και είναι πιο γρήγορη, με αποτελέσματα σε λιγότερο από μία ώρα, πιο οικονομική μιας και απαιτεί λιγότερα υλικά και πολύ πιο απλό εξοπλισμό αφού μπορεί να γίνει και σε ένα σωληνάκι όλη η διαδικασία, και πιο ανθεκτική σε ανασταλτικούς παράγοντες.

Η LAMP χρησιμοποιεί δύο εσωτερικούς εκκινητές, τους FIP και BIP, και δύο εξωτερικούς, τους F3 και B3, οι οποίοι μπορούν να αναγνωρίσουν έξι διακριτές περιοχές στο DNA στόχο, ενώ, δύο ακόμα

εκκινητές, οι LF και LB, επιστρατεύονται για την επιτάχυνση της ενίσχυσης και βελτίωση της απόδοσης. Αυτή η χρήση πολλαπλών εκκινητών είναι που αυξάνει και την εκλεκτικότητα, βέβαια, κάθε έλεγχος LAMP/RT-LAMP πρέπει να σχεδιαστεί με τους κατάλληλους εκκινητές ανά περίπτωση. (Notomi T *et al*, 2000; Chaouch M., 2021)

Έχει περιορισμούς στα είδη εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, έτσι έχει μειωμένη εκλεκτικότητα αλλά και μειωμένη ακρίβεια με πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών δειγμάτων.

Χρησιμοποιεί κατάλληλους χρωμογόνους, ή φθορίζοντες δείκτες για την σηματοδότηση και μέτρηση της ενίσχυσης του DNA ή RNA στόχου. Είναι πολύ χρήσιμο σαν διαγνωστικό εργαλείο χάρις στην ακρίβεια του, της τάξεως του 89,5 με 92,2%, ανάλογα με το αν μιλάμε για χρωμομετρική ή φθορισμομετρική προσέγγιση, όμως έχει πολύ πιο περιορισμένη χρήση, με το περιορισμένο πλήθος ασθενειών που να μπορεί να διαγνώσει. (Chaouch M., 2021; Alhamid, G. *et al*, 2023).



Διάγραμμα 6: Τα βασικά βήματα της μεθόδου LAMP

Η μέθοδος LAMP χρησιμοποιείται πιο πολύ σε περιπτώσεις ιών, βέβαια βρίσκει εφαρμογή τόσο στον εντοπισμό πρωτόζωων όπως τα *Cryptosporidium*, *Giardia* και *Toxoplasma* με πολύ καλά αποτελέσματα ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε παράσιτα, όσο και στον εντοπισμό ελμινθών με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα διάφορα είδη ταινιών με εξίσου καλά αποτελέσματα. Ανάλογα με την περίπτωση, μπορεί να προτιμηθούν άλλες μέθοδοι, εναλλακτικές της PCR, όπως είναι η NASBA. (Skotarczak, B., 2012; Nkouawa, A. *et al*, 2010)

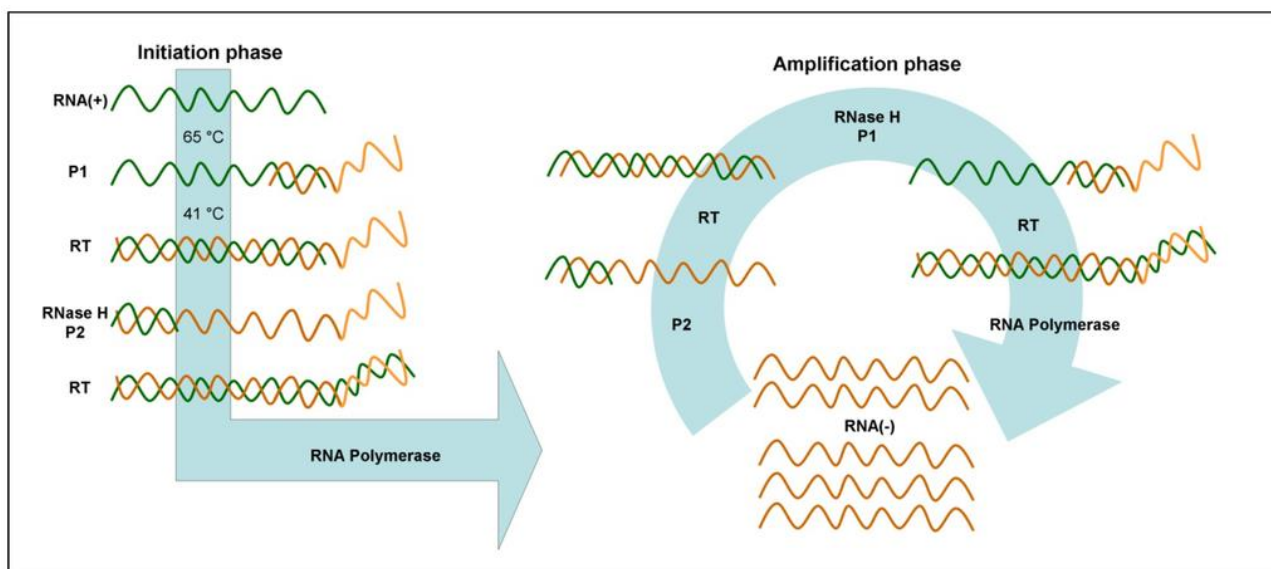
### 3.2.3.8 NASBA ASSAY

Η βιοχημική ανάλυση **NASBA** ή ενίσχυση βασισμένη σε ακολουθία νουκλεϊκών οξέων, είναι μία τεχνική, αντίστοιχη με την LAMP και την RT-LAMP, σχεδιασμένη εξ' αρχής για την ανάλυση δειγμάτων DNA και RNA. Βασίζεται όμως στην ενίσχυση RNA, οπότε, σε περίπτωση δείγματος DNA, πρέπει πρώτα να μετατραπεί στο συζυγές RNA του.

Γίνεται ισόθερμα, και χρησιμοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση AMV-RT, την RNάση H, και μια RNA πολυμεράση.

Η μέθοδος βασίζεται στο ότι ανεξάρτητα από το αρχικό δείγμα, προσκολλούνται οι εκκινητές στο RNA του δείγματος στους 65°C και μετά πολλαπλασιάζεται στους 41°C.

Έτσι λοιπόν, έχουμε τον 1<sup>ο</sup> εκκινητή (P1) να δηλώνει το ένα άκρο του τμήματος του RNA που θα πολλαπλασιαστεί με γνώμονα τον έλεγχο που θέλουμε να κάνουμε, την RNA πολυμεράση να συνθέτει τον 1<sup>ο</sup> κλώνο RNA, την αντίστροφη μεταγραφάση AMV-RT να συνθέτει το συμπληρωματικό DNA (cDNA), την RNase H στη συνέχεια να αποικοδομεί τον 1<sup>ο</sup> κλώνο RNA από το cDNA ώστε να συνδεθεί ο 2<sup>ος</sup> εκκινητής σε αυτόν (τον 1<sup>ο</sup> κλώνο RNA) και τέλος την πολυμεράση να δημιουργεί το τελικό τμήμα RNA που «υπέδειξαν» οι εκκινητές και να κάνει την ενίσχυση του. (Compton J., 1991)



Διάγραμμα 7: Τα βασικά βήματα της μεθόδου NASBA

Ο εντοπισμός των προϊόντων ενίσχυσης γίνεται μέσω ηλεκτροφόρησης πάνω σε τζελ αγαρόζης με χρώση από βρωμιούχο αιθίδιο αντίστοιχα με την PCR.

Αυτή η μέθοδος έχει μεγάλη διαγνωστική δυνατότητα, μεγαλύτερη από την LAMP/RT-LAMP, όμως είναι πολύ πιο ευαίσθητη λόγω της αστάθειας του RNA έναντι του DNA. Επίσης, είναι πιο γρήγορη, και οικονομική μέθοδος μιας και είναι συνεχής διαδικασία και απαιτεί απλό εξοπλισμό. (M.R. Uyttendaele, *et al* 1999)

Αμφότερες NASBA και LAMP/RT-LAMP, είναι εναλλακτικές της PCR με προτερήματα και μειονεκτήματα, όμως με μια αδιαμφισβήτητη δυναμική χάρις την απλότητα τους και της συγκρίσιμης ακρίβειας τους. Απαιτούν όμως ειδική μελέτη εις ότι αφορά τους εκκινητές κατά περίπτωση λόγω της

φύσης της διαδικασίας της συνεχούς ενίσχυσης του γενετικού υλικού έναντι της διαδικασίας θερμικών κύκλων της PCR. (R. Mohammad *et al*, 2012)

Για τον εντοπισμό και ταυτοποίηση παρασίτων τείνει να είναι προτιμότερη μέθοδος NASBA έναντι της LAMP/RT-LAMP μιας και είναι αντίστοιχα ευαίσθητη και εκλεκτική με την PCR παρά την μεγαλύτερη ευθραυστότητας της, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση εντοπισμού *Cryptosporidium* και *Giardia* σε δείγματα νερού. (Skotarczak, B. 2012; CACCIÑ, S. M., 2003)

Είναι γενικότερα μία καλή μοριακή μέθοδος για τον εντοπισμό και ταυτοποίηση πρωτόζωων αλλά και ελμινθών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε κλινικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο περιβαλλοντολογικό και δειγμάτων τροφίμων. (CACCIÑ, S. M., 2003)

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:**

Τα γένη και είδη των παρασίτων που αποτελούν τροφιμογενή κίνδυνο είναι συγκεκριμένα για την κάθε κατηγορία τροφίμων ανάλογα τόσο το περιβάλλον πρωτογενούς παραγωγής, όσο και των συνθηκών υγιεινής των σταδίων επεξεργασίας τους, με εξαίρεση κάποια υδατογενή παράσιτα που έχουν την δυναμική να προσβάλουν όλες τις κατηγορίες τροφίμων ανεξαιρέτως, όπως είναι το *Toxoplasma gondii*, η *Giardia lamblia* και το γένος *Cryptosporidium*.

Οι σύγχρονες μέθοδοι εντοπισμού και ταυτοποίησης των παρασίτων είναι προτιμότεροι από τις συμβατικές, όμως καμία τους δεν είναι απόλυτη. Κάθε μέθοδος έχει τα μειονεκτήματά της, έτσι, πρέπει να εξετάζουμε κατά περίπτωση ποια μέθοδος είναι βέλτιστη για το κάθε παράσιτο, αλλά και για κάθε φάση της ζωής του.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:**

ICMSF (1978), Micro-organisms in foods 1: Their Significance and methods of enumeration, University of Toronto Press, ISBN: 0-8020-2293-6

Jean-Claude Bertrand, Pierre Caumette, Philippe Lebaron, Robert Matheron, Philippe Normand, T elesphore Sime-Ngando, Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications (2011) ISBN 978-94-017-9117-5

Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston (1996) ISBN-10: 0-9631172-1-1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8325/>

Anderson RC, Chabaud AG, Willmott S: Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Archival Volume. Parasites & Vectors - Parasites Vectors. (2009) 2. 1-2. 10.1186/1756-3305-2-42.

Bahram Sayyaf Dezfuli, Luisa Giari, Giampaolo Bosi, Chapter Three - Survival of metazoan parasites in fish: Putting into context the protective immune responses of teleost fish, Advances in Parasitology, Academic Press, Volume 112, 2021, Pages 77-132, ISSN 0065-308X, ISBN 9780323900836.

CACCIÑ, S. M. (2003). Molecular techniques to detect and identify protozoan parasites in the environment. POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW THE POLISH SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS, 52, 23-34.

- Pozio, E. (2018). *Trichinella* and Other Foodborne Nematodes. In: Ortega, Y., Sterling, C. (eds) *Foodborne Parasites. Food Microbiology and Food Safety*(.). Springer, Cham.
- Koppenhöfer, A.M. (2000). Nematodes. In: Lacey, L.A., Kaya, H.K. (eds) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Springer, Dordrecht.
- Alvin A. Gajadhar, Foodborne cestodes, In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Foodborne Parasites in the Food Supply Web*, Woodhead Publishing, 2015, Pages 201-220, ISBN 9781782423324
- Kostadinova, A., Pérez-del-Olmo, A. (2014). The Systematics of the Trematoda. In: Toledo, R., Fried, B. (eds) *Digenetic Trematodes. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 766. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0915-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0915-5_2)
- B.Cherie Millar, Mary Finn, LiHua Xiao, Colm J Lowery, James S.G Dooley, John E Moore, *Cryptosporidium* in foodstuffs—an emerging aetiological route of human foodborne illness, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 13, Issue 5, 2002, 0924-2244
- G.C. Kearn, Evolutionary expansion of the Monogenea, *International Journal for Parasitology*, Volume 24, Issue 8, 1994, Pages 1227-1271, ISSN 0020-7519
- Ian D. Whittington, Leslie A. Chisholm, Klaus Rohde, *The Larvae of Monogenea (Platyhelminthes)*, Editor(s): J.R. Baker, R. Muller, D. Rollinson, *Advances in Parasitology*, Academic Press, Volume 44, 1999, Pages 139-232, ISSN 0065-308X, ISBN 9780120317448
- Ishii N., *Dobutsugaku Zasshi – Zoological magazine*, 1936 vol. 48 No.8/10 pp.781-790
- Cheng T.C. (1986). - *Genera I parasitology*. Academic Press, New York, 827 pp.
- Capelle K.J. (1971). - Myiasis. In *Parasitic diseases of wild mammals* (J.W. Davis & R.C. Anderson, eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa, 279-305.)
- Kabata Z. (1970). - Crustacea as enemies of fishes. In *Diseases of fishes* (S.F. Snieszko & H.R. Axelrod, eds). T.F.H. Publ., Neptune City, New Jersey, Book 1,1-171.
- Durden L.A. & Musser G.G. (1994). - The mammalian hosts of the sucking lice (Anoplura) of the world: a host parasite list. *Bull. Soc. Vector Ecol*, 19 , 130-168.
- Durden L.A. & Musser G.G. (1994). - The sucking lice (Insecta , Anoplura ) of the world: a taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographical distributions. *Bull. Am. Mus. natur. Hist*, 218, 1-90 .
- SCHOFIELD C . J. (1988) - Biosystematics of the Triatominae. In *Biosystematics of haematophagous insects* (M.W. Service, ed.) Clarendon Press, Oxford, 285-312.
- USINGER R.L. (1966) - *Monograph of Cimicidae (Hemiptera-Heteroptera)*. Thomas Say Monograph No . VII. Entomological Society of America, College Park, Maryland.
- Oldroyd H. (1964) - *The natural history of flies*. W.W Norton & Co., New York
- Richards, O. W.; Davies, R.G. (1977). *Imms' General Textbook of Entomology: Volume 1: Structure, Physiology and Development Volume 2: Classification and Biology*. Berlin: Springer. ISBN 0-412-61390-5

Lihua Xiao, R.P. Herd, Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves, *Veterinary Parasitology*, Volume 55, Issue 3, 1994, Pages 257-262, ISSN 0304-4017

Douglas Wilkin, ck12 Biology Advanced Concepts - 9.3 The Polymerase Chain Reaction – Advanced, 2016

Newton, Clive R., Alex Graham, and Jane S. Ellison. *PcR*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, 1997.

Oliver, James H. "Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida)." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 20 (1989): 397-430.

Oliver, James H. "Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida)." *Annual Review of Ecology and Systematics* 20 (1989): 397–430. <http://www.jstor.org/stable/2097098>.

KEIRANS J.E. (1992). - Systematics of the Ixodida (Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae): an overview and some problems. In *Tick vector biology* (B. Fivaz, T. Petney & I. Horak, eds). Springer Verlag, Berlin, 1-22.

Hoskins JD, Cupp EW. 1988. Ticks of veterinary importance. Part II. The Argasidae family: Identification, behavior, and associated diseases. *Comp Cont Ed Prac Vet* 10:699-709.

Truant, J. P., W. A. Brett, and W. Thomas Jr. "Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with J.M. Walther and E.B. Gingold editors, *Molecular Biology and Biotechnology*, 3rd edition, 1995, The Royal Society of Chemistry.

M.D. Trevan, S. Boffey, K.H. Goulding and P. Standbury, McGraw Hill., *Biotechnology, The Biological Principles*, 1990. th auramine and rhodamine." *Henry Ford Hospital Medical Journal* 10.2 (1962): 287-296.

Rudolf M Lequin, *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, *Clinical Chemistry*, Volume 51, Issue 12, 1 December 2005, Pages 2415–2418

Nichols, G., Chalmers, R., Lake, I., Sopwith, W., Regan, M., Hunter, P., Grenfell, P., Harrison, F., Lane, C. (2006) Cryptosporidiosis: a report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. In: *Drinking Water Directorate Contract Number DWI 70/2/201*. pp. 1-142.

Mungube, E.O., Bauni, S.M., Tenhagen, B.A. *et al.* Prevalence of parasites of the local scavenging chickens in a selected semi-arid zone of Eastern Kenya. *Trop Anim Health Prod* **40**, 101–109 (2008).

Tolossa, Y., Shafi, Z., & Basu, A. (2009). Ectoparasites and gastrointestinal helminths of chickens of three agro-climatic zones in Oromia Region, Ethiopia. *Animal Biology*, *59*(3), 289-297.

Rosenthal, B.M., LaRosa, G., Zarlenga, D., Dunams, D., Chunyu, Y., Mingyuan, L., Pozio, E. (2008) Human dispersal of *Trichinella spiralis* in domesticated pigs. *Infect Genet Evol.* *8*(6):799-805.

Pozio, E., Rinaldi, L., Marucci, G., Musella, V., Galati, F., Cringoli, G., Boireau, P., La Rosa, G. (2009) Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. *Int J Parasitol.* *39*(1):71-79.

Lightowlers, M.W. (2010) Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: A role for vaccination of pigs. *Int. J. Parasitol.* *40*(10):1183-1192

Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., Guzman-Marin, E., Uitzil-Álvarez, B., Rodríguez-Buenfil, J.C., Jimenez-Coello, M. (2011) Infection dynamic of *Toxoplasma gondii* in two fattening pig farms exposed to high and low cat density in an endemic region. *Vet Parasitol.* *175*(3-4):367-371.



- FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1984). - Ticks and tick-borne disease control. A practical field manual in two volumes.
- MUKHEB I A.W., PERRY B.D. & KRUSK A R. (1992) . - Estimated economics of theileriosis control in Africa. *Prev. vet. Med.*, 12 , 73-85 .
- Nöckler,K., Pozio,E., Rossi,P., Snow,L., Taylor,M.A., Theodoropoulos,G., Vieira-Pinto,M.M., Zimmer,I.A. (2010) Scientific Report submitted to EFSA: Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of *Cysticercus* in animals and foodstuffs in the European Union.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA J.* 10(3):2597-3039.
- European Food Safety Authority (2011) EFSA explains zoonotic diseases: Food-borne zoonoses.
- European Food Safety Authority Scientific (2013) Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA J* 11(1):3025.
- European Food Safety Authority (2007) The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA J.* 130:1–352.
- European Commission. Commission Regulations 2075/ 2005 of 5th December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official Journal of the European Union* 338: 60–82
- European Centre for Disease Prevention and Control (2010) Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Stockholm, ECDC, 2010.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2011) Annual epidemiological report 2011: Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm, ECDC, 2011.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2012. Stockholm: ECDC; 2012
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2013. Stockholm: ECDC; 2013
- Νταχάμπρε Στέλλα, Τροφιμογενώς μεταδιδόμενα παράσιτα στην Ευρώπη, Τάσεις και δεδομένα τροφιμογενών παρασιτικών νοσημάτων, Ζωονόσοι, Πρόληψη και Αντιμετώπιση, 2013
- Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA, Littlewood DT. (2003) Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int J Parasitol.* 2003 Jul;33(7):733-55. doi: 10.1016/s0020-7519(03)00049-3. PMID: 12814653.
- Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S. Emerging food-borne parasites. *Vet Parasitol.* 2009 Aug 7;163(3):196-206. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.026. Epub 2009 Jun 6. PMID: 19559535.
- Rohde K. Subclass Aspidogastrea Faust & Tang, 1936. In: Gibson D. I., Jones A., Bray R. A., editors. *Keys to the Trematoda*. Vol. 1. Vol. 1. CABI; Wallingford: 2002. 5-14
- Chervy L. The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic Parasitology.* 2002;52(1):1–33.

- Arizono N, Kuramochi T, Kagei N. 2012. Molecular and histological identification of the acanthocephalan *Bolbosoma cf. capitatum* from the human small intestine. *Parasitol Int* **61**:715–718. 10.1016/j.parint.2012.05.011.
- Mathison BA, Bishop HS, Sanborn CR, Dos Santos Souza S, Bradbury R. *Macracanthorhynchus ingens* Infection in an 18-Month-Old Child in Florida: A Case Report and Review of Acanthocephaliasis in Humans. *Clin Infect Dis*. 2016 Nov 15;63(10):1357-1359. doi: 10.1093/cid/ciw543. Epub 2016 Aug 7. PMID: 27501844.
- Mathison BA, Mehta N, Couturier MR. 2021. Human acanthocephaliasis: a thorn in the side of parasite diagnostics. *J Clin Microbiol* 59:e02691-20.
- Rubenina, I.; Gavarane, I.; Kirilova, E.; Mezaraube, L.; Kirjusina, M. Comparison of the Benzanthrone Luminophores: They Are Not Equal for Rapid Examination of Parafasciolopsis fasciolaemorpha (Trematoda: Digenea). *Biomolecules* 2021, 11, 598
- Nesterenko MA, Starunov VV, Shchenkov SV, Maslova AR, Denisova SA, Granovich AI, Dobrovolskij AA, Khalturin KV. Molecular signatures of the rediae, cercariae and adult stages in the complex life cycles of parasitic flatworms (Digenea: Psilostomatidae). *Parasit Vectors*. 2020 Nov 10;13(1):559. doi: 10.1186/s13071-020-04424-4. PMID: 33168070; PMCID: PMC7653818.
- Rohde, K. (1972). "The Aspidogastrea, especially *Multicotyle purvisi* Dawes, 1941". *Advances in Parasitology*. *Advances in Parasitology*. 10: 77–151.
- Macpherson CN. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol*. 2005 Oct;35(11-12):1319-31. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.06.004. Epub 2005 Jul 20. PMID: 16102769.
- Torgerson,P.R., Macpherson,C.N.L. (2011) The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Vet. Parasitol*. 182:79–95.
- Bhattacharai, R., Kalita,P., Trask,J., Kuhlenschmidt, M.S. (2011) Development of a physically-based model for transport of *Cryptosporidium parvum* in overland flow. *Environ. Modell. Softw*. 26 (2011) 1289-1297.
- Newell,D.G., Koopmans,M., Verhoef,L., Duizer,E., Aidara-Kane,A., Sprong ,H., Opsteegh,M., Langelaar,M., Threlfall,J., Scheutz,F., Van der Giessen,J., Kruse,H. (2010) Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol*. 139: S3–S15.
- Pozio,E. (2003) Foodborne and Waterborne Parasites. *Acta Microbiol. Pol*. 52:83-96.
- Pozio,E. (2008) Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitologia* 50:17-24.
- Robertson,L.J., Gjerde,B. (2001) Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *J. Food Prot*. 64:1793–1798. (Παράσιτα σε φρούτα και λαχανικά)
- Said,S.A. (2012) Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria Journal of Medicine* 48:345–352. (Parasites στα λαχανικά)
- Omarova, Alua, Kamshat Tussupova, Ronny Berndtsson, Marat Kalishev, and Kulyash Sharapatova. 2018. "Protozoan Parasites in Drinking Water: A System Approach for Improved Water, Sanitation and Hygiene in Developing Countries" *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, no. 3: 495.

- Chaouch M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Rev Med Virol.* 2021 Nov;31(6):e2215. doi: 10.1002/rmv.2215. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33476080; PMCID: PMC7995099.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63. PMID: 10871386; PMCID: PMC102748.
- Alhamid, G., Tombuloglu, H. & Al-Suhaimi, E. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays using five primers reduces the false-positive rate in COVID-19 diagnosis. *Sci Rep* **13**, 5066 (2023).
- Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 1991 Mar 7;350(6313):91-2. doi: 10.1038/350091a0. PMID: 1706072.
- M.R. Uyttendaele, J.M. Debevere, *Listeria monocytogenes*—Detection using NASBA (an Isothermal Nucleic Acid Amplification System), Richard K. Robinson, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 1999, Pages 1244-1251, ISBN 9780122270703
- Mazumdar, Reaz Mohammad, Abhijit Roy Chowdhury, Khanjada Shahnewaj Bin Mannan and Bharti Dhaka. "NUCLEIC ACID SEQUENCE BASED AMPLIFICATION (NASBA)- PROSPECTS AND APPLICATIONS." (2012).
- Skotarczak, B. (2012) Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. *Ann Agric Environ Med.* 17(1):1- 8. XAPAKTHPIΣMOΣ CRYPTOSPORIDIUM ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ
- Nkouawa, A., Sako, Y., Li, T., Chen, X., Wandra, T., Swastika, I.K., Nakao, M., Yanagida, T., Nakaya, K., Qiu, D., Ito, A. (2010) Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Using Fecal Specimens for Differential Detection of *Taenia* Species from Humans. *J. Clin. Microbiol.* 48(9): 3350–3352.
- Toledo, R., Esteban, J.G. & Fried, B. Current status of food-borne trematode infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 1705–1718 (2012).
- Keiser, J., Utzinger, J. (2005) Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg. Infect. Dis.* 11(10):1507-1514.
- Nichols, G. (2008) Epidemiology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, 2nd ed. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, FL, pp. 79– 118. cryptosporidium
- Krueger, Woodrow B. (1986). *Laboratory procedures for general microbiology*. Kendall/Hunt Pub. Co. p. 25. ISBN 9780840338044.
- Mossallam SF. Detection of some intestinal protozoa in commercial fresh juices. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology.* 2010 Apr;40(1):135-149. PMID: 20503593.
- Bronsdon MA. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1984 Jun;19(6):952-3. doi: 10.1128/jcm.19.6.952-953.1984. PMID: 6206090; PMCID: PMC271227.
- Stanley D. King, David K. Cone "Infections of *Dactylogyrus pectenatus* (Monogenea: Dactylogyridae) on Larvae of *Pimephales promelas* (Teleostei: Cyprinidae) in Scott Lake, Ontario, Canada," *Comparative Parasitology* 76(1), 110-112, (1 January 2009).
- Wall R. & Stevens J. (1990) The turn of the screw worm. *New Sci.*, 12 6 (1720)

FOIL L.D. & FOIL C.S. (1990). - Arthropod pests of horses. *Comp. cont. Educ. pract. Vet.*, 1 2 , 723-736.

HARWOOD R.F . & JAMES M.T. (1979). - *Entomology in human and animal health*, 7th Ed. Macmillan, New York, 548 pp.

Santos, Thaís Rabelo dos, et al. "Helminth fauna of bovines from the central-western region, Minas Gerais State, Brazil." *Ciência Rural* 40 (2010): 934-938.

Giemsma G (1904) Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Centralblatt Bakt I Abt* 32:307–3013

Mehlhorn, H. (2016). Giemsa Stain. In: Mehlhorn, H. (eds) *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4\\_1275](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4_1275)

Conlan,J.V., Sripa,B., Attwood,S., Newton,P.N (2011) A review of parasitic zoonoses in a changing Southeast Asia. *Vet. Parasitol.* 182:22–40.

Schnyder,M., Kohler,L., Hemphill,A., Deplazes,P. (2009) Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Vet Parasitol.* 160(1-2):149-154.

Scandrett,B., Parker,S., Forbes,L., Gajadhar,A., Dekumyoy,P., Waikagul,J., Haines,D. (2009) Distribution of *Taenia saginata* cysticerci in tissues of experimentally infected cattle. *Vet Parasitol.* 164(2-4):223-231.

McFadden,A.M., Heath,D.D., Morley,C.M., Dorny,P. (2011) Investigation of an outbreak of *Taenia saginata* cysts (*cysticercus bovis*) in dairy cattle from two farms. *Vet Parasitol.* 176(2-3):177-184.

Nunes,C.M., Lima,L.G., Manoel,C.S., Pereira,R.N., Nakano,M.M., Garcia,J.F. (2003) *Taenia saginata*: polymerase chain reaction for taeniasis diagnosis in human fecal samples. *Exp Parasitol.* 104:67– 69

Silveira,C, Vallochi,A.L., Rodrigues da Silva,U., Muccioli,C, Holland,G.N., Nussenblatt,R.B., Belfort,R., Rizzo,L.V. (2011) *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol.* 95(3):396- 400.

Sherifi,K., Rexhepi,A., Hamidi,A., Behluli,B., Zessin,K.H, Mathis,A., Deplazes,P. (2011) Detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep-strain", G1) in naturally infected dogs in Kosovo. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 124(11-12):518- 521.

Bonnet S, Michelet L, Moutailler S, Cheval J, Hébert C, et al. (2014) Identification of Parasitic Communities within European Ticks Using Next-Generation Sequencing. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(3): e2753

Daissy Vargas Sepulveda. (2013). Trichrome Stain for Diagnosis of Amoebae in Parasitology Laboratory. *Global Journal of Medical Research*, 13(K7), 7–12. Retrieved from <https://medicalresearchjournal.org/index.php/GJMR/article/view/508>

QUADROS ROSILÉIA M. DE, MARQUES SANDRA M. T., AMENDOEIRA CAMILA R, SOUZA LARISSA A. DE, AMENDOEIRA PAULA R, COMPARIN CARLA C. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl Neelsen staining methods. (2006)

Kantarci,M, Bayraktutan,U., Karabulut,N., Aydinli,B., Ogul,H., Yuce,I., Calik,M., Eren,S., Atamanalp,S.S., Oto,A. (2012) Alveolar Echinococcosis: Spectrum of Findings at Cross-sectional Imaging. *Radiographics.* 32(7):2053-2070

- Idris, M. A., & Al-Jabri, A. M. (2001). Usefulness of Kato-Katz and trichrome staining as diagnostic methods for parasitic infections in clinical laboratories. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 3(2), 65–68
- Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019 Feb 1;2019(2). doi: 10.1101/pdb.prot095182. PMID: 30710024.
- Putignani,L., Mancinelli,L., Del Chierico,F., Menichella,D., Adlerstein,D., Angelici,M.C., Marangi,M., Berrilli,F., Caffara,M., di Regalbono,D.A., Giangaspero,A. (2011) Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). *Exp Parasitol*. 127(2):409-417.
- Mayta,H., Gilman,R.H., Prendergast,E., Castillo,J.P., Tinoco,Y.O., Garcia,H.H., Gonzalez,A.E., Sterling,C.R.; Cysticercosis Working Group in Peru (2008) Nested PCR for specific diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. *J. Clin. Microbiol*. 46(1):286-289.
- Lin,Z., Zhang,Y., Zhang,H., Zhou,Y., Cao,J., Zhou,J. (2012) Comparison of loopmediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529- bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Vet Parasitol*. 185(2-4):296-300.
- Dötsch, J., Schoof, E., Rascher, W. (2005). Quantitative TaqMan Real-Time PCR. In: Walker, J.M., Rapley, R. (eds) *Medical Biomethods Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press.
- Barranco-Gómez, O., De Paula, J.C., Parada, J.S. *et al.* Development of a TaqMan qPCR assay for trypanosomatid multi-species detection and quantification in insects. *Parasites Vectors* **16**, 69 (2023). <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05687-3>
- 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., Houghton,E.R. (2013) A Laboratory Developed TaqMan Array Card for Simultaneous Detection of Nineteen Enteropathogens. *J Clin Microbiol*. 51(2):472-480.
- Eva Engvall, Peter Perlmann; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes I. *J Immunol* 1 July 1972; 109 (1): 129–135.
- Eva Engvall, Peter Perlmann; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes I. *J Immunol* 1 July 1972; 109 (1): 129–135.
- Hornbeck P. Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 2:Unit 2.1. doi: 10.1002/0471142735.im0201s01. PMID: 18432761.
- O'Sullivan MV, Zhou F, Sintchenko V, Kong F, Gilbert GL. Multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB). *J Vis Exp*. 2011 Aug 6;(54):2781. doi: 10.3791/2781. PMID: 21847083; PMCID: PMC3211120.
- Kong, F., & Gilbert, G. L. (2007). Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)—a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nature Protocols*, 1(6), 2668–2680. doi:10.1038/nprot.2006.404
- Karanis,P., Kourenti,C., Smith,H. (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 5:1–38.

- Johnson AM, Giovanni GD, Rochelle PA. Comparison of assays for sensitive and reproducible detection of cell culture-infectious *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Jan;78(1):156-62. doi: 10.1128/AEM.06444-11. Epub 2011 Oct 28. PMID: 22038611; PMCID: PMC3255618.
- Kourenti,C., Tsvetkova,N., Stojanova,K. (2006) Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ Res* 102(3):260–271. iol. 78(1):156-162
- Bilgic, H.B., Bakırcı, S., Kose, O. *et al.* Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. *Parasites Vectors* **10**, 211 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2151-3>
- B. Mittal, P. Chaturvedi, S. Tulsyan, Restriction Fragment Length Polymorphism, Editor(s): Stanley Maloy, Kelly Hughes, Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition), Academic Press, 2013, Pages 190-193, ISBN 9780080961569
- Jarcho J. Restriction fragment length polymorphism analysis. *Curr Protoc Hum Genet.* 2001 May;Chapter 2:Unit 2.7. doi: 10.1002/0471142905.hg0207s01. PMID: 18428271.
- Nunes,C.M., Dias,A.K., Dias,F.E., Aoki,S.M., de Paula,H.B., Lima,L.G., Garcia,J.F. (2005) *Taenia saginata*: differential diagnosis of human taeniasis by polymerase chain reaction– restriction fragment length polymorphism assay. *Exp Parasitol.* 110:412– 415.
- Skotarczak,B. (2012) Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. *Ann Agric Environ Med.* 17(1):1- 8.
- Umehara,A., Kawakami,Y., Matsui,T., JAraki,J., Uchida,A. (2006): Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda : Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Prasitol. Int.*, 55:267-271.
- Lafferty, Kevin D.. “Ecosystem consequences of fish parasites.” *Journal of Fish Biology* 73 (2008): 2083-2093.
- Abollo,E., Paggi,L., Pascual,S., D'Amelio,S. (2003) Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex s.s.* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect Genet Evol.* 3(3):175-181
- Lima dos Santos,C.A.M., Howgate,P. (2011) Fishborne zoonotic parasites and aquaculture: A review. *Aquaculture* 318 (3-4):253-261.
- Puente,P., Anadón,A.M., Rodero,M., Romarís,F., Ubeira,F.M., Cuéllar,C. (2008) *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Exp Parasitol.* 118(2):271-274
- Smith,H.V., Cacciò,S.M., Cook,N., Nichols,R.A.B., Tait,A. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 149:29-40.
- Schets,F.M., van den Berg,H.H.J.L., Engels,G.B., Lodder,W.J., de Roda Husman,A.M. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 189–194.
- Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jan;23(1):218-34. doi: 10.1128/CMR.00026-09. PMID: 20065331; PMCID: PMC2806662.

Almeria S, Dubey JP. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. *Res Vet Sci*. 2021 Mar;135:371-385. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.10.019. Epub 2020 Oct 24. PMID: 33148402.

Andreas W. Oehm ,Andrea Springer,Daniela Jordan,Christina Strube,Gabriela Knubben-Schweizer,Katharina Charlotte Jensen,Yury Zablotski, A machine learning approach using partitioning around medoids clustering and random forest classification to model groups of farms in regard to production parameters and bulk tank milk antibody status of two major internal parasites in dairy cows, *PLoS One*, 17(7), e0271413. (2022).

Rajakaruna, R. S., and K. N. Warnakulasooriya. "Gastrointestinal parasites in dairy cattle in Kandy district in Sri Lanka." *Annu Res J SLSAJ* 11 (2011): 92-99.

Kangethe,E., McDermott,B., Grace,D., Mbae,C., Mulinge,E., Monda,J., Nyongesa,C., Ambia,J., Njehu,A. (2012) Prevalence of cryptosporidiosis in dairy cattle, cattle-keeping families, their non-cattle-keeping neighbours and HIV-positive individuals in Dagoretti Division, Nairobi, Kenya. *Trop Anim Health Prod*. 44 (1):11-16.

Agosta, S. J., Joshi, K. A., & Kester, K. M. (2018). Upper thermal limits differ among and within component species in a tritrophic host-parasitoid-hyperparasitoid system. *PLoS One*, 13(6), e0198803.

Kutty, Prameela. (2014). Breastfeeding and risk of parasitic infection-A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4. 847-858. 10.12980/APJTB.4.201414B355.

A. Βελεγράκη, Εργαστηριακές ασκήσεις μικροβιολογίας, Άσκηση 6 – Χρώση Ziehl-Neelsen, Οδοντιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, 2015

European Food Safety Authority (2020) The European Union One Health 2020 Zoonoses. Report doi: 10.2903/j.efsa.2021.6971

Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Mar;52(Pt 2):297-354. doi: 10.1099/00207713-52-2-297. PMID: 11931142

T. CAVALIER-SMITH, (1993), MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Dec. 1993, p. 953-994 Vol. 57, No. 4 0146-0749/93/040953-42\$02.00/0 (1993), American Society for Microbiology

Cavalier-Smith T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews*, 57(4), 953– 994

Amin O.M. Classification of the acanthocephala. *Folia Parasitol (Praha)*. 2013 Sep;60(4):273-305. doi: 10.14411/fp.2013.031. PMID: 24261131.

David I. Gibson et al 2014, Fauna Europaea: Helminths (Animal Parasitic) PMID: PMC4206782 PMID: 25349520 doi: 10.3897/BDJ.2.e1060

Aida Vafae Eslahi, Meysam Olfatifar, Md Robiul Karim, Raed AbuOdeh, Ehsan Modirian, Elham Houshmand, Amir Abdoli, Rasoul Samimi, Simin Sotoodeh, Razzagh Mahmoudi, Elham Hajjalilo, Sima Hashemipour, Milad Badri, Global incidence of helminthic contamination of vegetables, cucurbits and fruits: A systematic review and meta-analysis, *Food Control*, Volume 133, Part A, 2022, ISSN 0956-7135,

Vidyadharani, G., Vijaya Bhavadharani, H.K., Sathishnath, P. et al. Present and pioneer methods of early detection of food borne pathogens. *J Food Sci Technol* **59**, 2087–2107 (2022).

Gibson D, Bray R, Hunt D, Georgiev B, Scholz T, Harris P, Bakke T, Pojmanska T, Niewiadomska K, Kostadinova A, Tkach V, Bain O, Durette-Desset M, Gibbons L, Moravec F, Petter A, Dimitrova Z, Buchmann K, Valtonen E, de Jong Y (2014) Fauna Europaea: Helminths (Animal Parasitic). *Biodiversity Data Journal* 2: e1060.

Smiley RW, Dababat AA, Iqbal S, Jones MGK, Maafi ZT, Peng D, Subbotin SA, Waeyenberge L. Cereal Cyst Nematodes: A Complex and Destructive Group of Heterodera Species. *Plant Dis.* 2017 Oct;101(10):1692-1720. doi: 10.1094/PDIS-03-17-0355-FE. Epub 2017 Aug 15. PMID: 30676930.

Swarup, G., & Sosa-Moss, C. (1990). Nematode parasites of cereals. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture.*, 109-136.

Stary, P. (1976). Parasite spectrum and relative abundance of parasites of cereal aphids in Czechoslovakia (Hymenoptera, Aphidiidae; Homoptera, Aphidoidea). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 73(4), 216-223.

Fried, B., Graczyk, T.K. & Tamang, L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitol Res* 93, 159–170 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1112-x>

About Parasites, CDC, 2022. [www.cdc.gov/parasites/about.html](http://www.cdc.gov/parasites/about.html)

Moth flies in the home (2017) - Department of Entomology (Penn State University)  
<https://extension.psu.edu/moth-flies-in-the-home>

Ticks, CDC, 2017, [www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html](http://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html)

Nisha Rijal - Trichrome Staining for Fecal Smears, 2022, <https://microbeonline.com/trichrome-staining-for-fecal-smears/>

Andrey Golubov, Chapter 6 - CRISPR – Bacterial immune system, Igor Kovalchuk, Olga Kovalchuk, In *Translational Epigenetics, Genome Stability (Second Edition)*, Academic Press, Volume 26, 2021, Pages 91-105, ISBN 9780323856799, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85679-9.00006-4>.

Hossain MA. CRISPR-Cas9: A fascinating journey from bacterial immune system to human gene editing. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2021;178:63-83. doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.01.001. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33685600.

Kissinger PT. Biosensors-a perspective. *Biosens Bioelectron.* 2005 Jun 15;20(12):2512-6. doi: 10.1016/j.bios.2004.10.004. PMID: 15854823.

Yang, H., Ledesma-Amaro, R., Gao, H., Ren, Y., & Deng, R. (2023). CRISPR-based biosensors for pathogenic biosafety. *Biosensors and Bioelectronics*, 115189.

Kaminski, M.M., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S. *et al.* CRISPR-based diagnostics. *Nat Biomed Eng* 5, 643–656 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00760-7>