

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑ

Σπανάκος Γρηγόρης  
Βιολόγος

ΚΕντρο ΕΛέγχου και Πρόληψης ΝΟσημάτων

# Μοριακή Παρασιτολογία

Παρασιτολογία στην οποία χρησιμοποιούνται αποτελέσματα  
τεχνικών μοριακής βιολογίας

Μελέτη των **νουκλεϊκών οξέων** --> PCR.....

Τεχνικές όπως **sequencing** είναι πλέον κοινός τόπος και προσεγγίσεις  
όπως **microarrays** και **Genome sequencing**, είναι αρκετά διαδεδομένες.

# Τα παράσιτα

Είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί.  
Ανήκουν στα **πρώτιστα (πρωτόζωα)** (microparasites)  
και τα **μετάζωα** (έλμινθες και έντομα - macroparasites).



# *Ιδιαιτερότητα των παρασίτων*

Πολυπλοκότητα των κύκλων ζωής

[εμπλέκονται και άλλα είδη οργανισμών, εκτός του  
ανθρώπου ή των ζώων]

# Αφού είναι ευκαρυωτικοί....

Πυρήνας  
ενδοκυτταρικά οργανίδια  
(μιτοχονδριακό DNA →  $10^4$  bp).

Έλμινθες, έντομα → τυπικά κύτταρα

πρώτιστα αρκετές ιδιαιτερότητες  
ιδιαίτερα οργανίδια:  
κινετοπλάστης, απικοπλάστης, μιτοσώματα,  
υδρογενοσώματα....

Review

It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?

Una Ryan <sup>a, \*</sup>, Andrea Papparini <sup>a</sup>, Paul Monis <sup>b</sup>, Nawal Hijjawi <sup>c</sup>

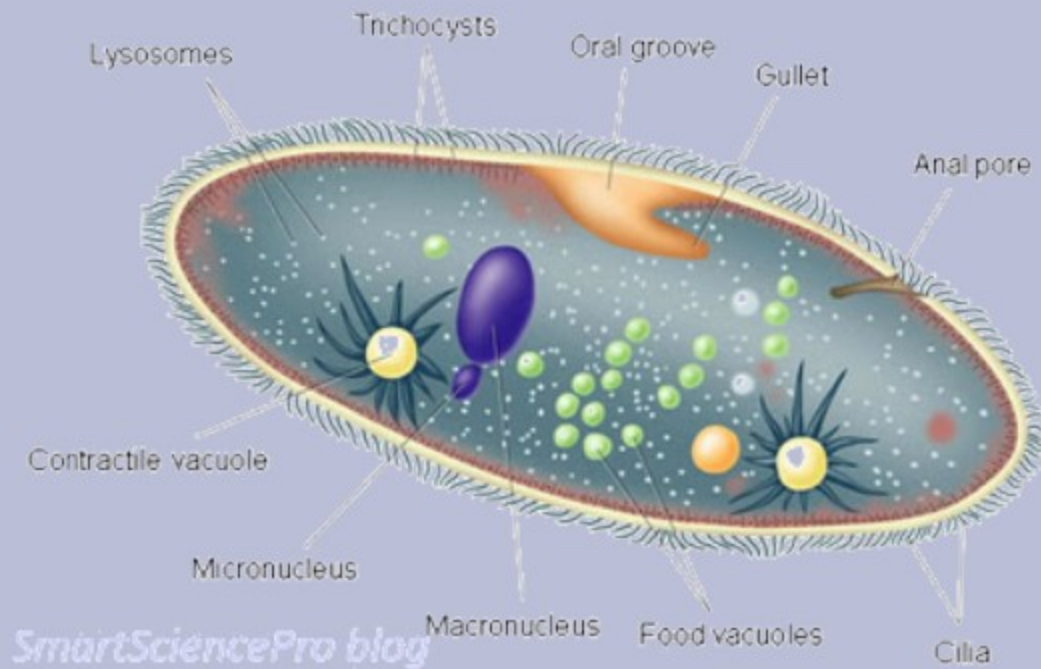
<sup>a</sup> School of Veterinary and Life Sciences, Murdoch University, Murdoch, Western Australia, 6150, Australia

<sup>b</sup> Australian Water Quality Centre, South Australian Water, Adelaide, Australia

<sup>c</sup> Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, The Hashemite University, PO Box 150458, Zarqa, 13115, Jordan



# ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΙ....



## Στα έντομα....

... το μέγεθος του γονιδιώματος είναι συνήθως μεγαλύτερο, ποικίλει αρκετά (90-7700 Mb)

Το γονιδίωμα του *Anopheles gambiae* είναι περίπου 280 Mb.

# Το πυρηνικό γενετικό υλικό

Table 1. Current genome projects of protozoan parasites.

Parasite	Disease	Genome size (Mb)	No. of genes	Website
<b>Apicomplexa</b>				
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malignant tertian malaria	23	5268	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum/who&amp;what.shtml">http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum/who&amp;what.shtml</a>
<i>Plasmodium vivax</i>	Benign tertian malaria	35-40		<a href="http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pva1/intro.shtml">http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pva1/intro.shtml</a>
<i>Plasmodium yoelii</i>	Rodent malaria	23	5878	<a href="http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pya1/">http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pya1/</a>
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Rodent malaria			<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_chabaudi/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_chabaudi/</a>
<i>Plasmodium berghei</i>	Rodent malaria	25-27		<a href="http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model.html">http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model.html</a>
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Malaria of monkeys ( <i>Macaca</i> spp.)			<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_knowlesi/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_knowlesi/</a>
<i>Toxoplasma gondii</i>	Acquired or congenital toxoplasmosis	80		<a href="http://www.toxodb.org/links.shtml">http://www.toxodb.org/links.shtml</a>
<i>Theileria annulata</i>	Theileriosis in domestic ruminants	10		<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_annulata/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_annulata/</a>
<i>Theileria parva</i>	East coast fever in ruminants	9		<a href="http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tpa1/">http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tpa1/</a>
<i>Eimeria tenella</i>	Coccidiosis in poultry	60		<a href="http://www.iah.bbsrc.ac.uk/eimeria/">http://www.iah.bbsrc.ac.uk/eimeria/</a>
<i>Babesia bovis</i>	Redwater fever in cattle	9.4		<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bovis/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bovis/</a>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cryptosporidiosis	10		<a href="http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/happy/CRYPTO/cryptogenome.html">http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/happy/CRYPTO/cryptogenome.html</a>
<b>Kinetoplastida</b>				
<i>Trypanosoma brucei</i>	Sleeping sickness	35	8000 <sup>1</sup>	<a href="http://parsun1.path.cam.ac.uk/">http://parsun1.path.cam.ac.uk/</a>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagas disease	40		<a href="http://www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html">http://www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html</a>
<i>Leishmania major</i>	Cutaneous leishmaniasis	34	8000 <sup>1</sup>	<a href="http://www.genedb.org/genedb/leish/index.jsp">http://www.genedb.org/genedb/leish/index.jsp</a>
<b>Others</b>				
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis	12		<a href="http://jbpcc.mbl.edu/Giardia-HTML/index2.html">http://jbpcc.mbl.edu/Giardia-HTML/index2.html</a>
<i>Entamoeba histolytica</i>	Intestinal amoebiasis	20		<a href="http://www.lshtm.ac.uk/itd/units/pmbbu/enta/home.htm">http://www.lshtm.ac.uk/itd/units/pmbbu/enta/home.htm</a>
<i>Caenorhabditis elegans</i>		100	19000	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/</a>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		12	6275	<a href="http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/index.html">http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/index.html</a>

<sup>1</sup> Estimated by extrapolation from the gene number on already finished chromosomes or contigs

# Τομείς

- Διάγνωση
- Είδος
- Ανίχνευση σε δείγματα περιβάλλοντος
- Γονοτύπηση
- Μοριακή επιδημιολογία
- Πληθυσμιακή δομή

# Διάγνωση

Αναγνώριση της ασθένειας ή γενικότερα της βλάβης στον οργανισμό από την αξιολόγηση του ιστορικού του ασθενούς, των συμπτωμάτων και των εργαστηριακών εξετάσεων

The screenshot shows the website 'THE FREE DICTIONARY BY EARLE'. The search bar contains 'diagnosis'. Below the search bar, there are tabs for 'Dictionary', 'Thesaurus', 'Medical Dictionary', 'Legal Dictionary', 'Financial Dictionary', 'Acronyms', 'Slang', 'Encyclopedia', and 'Wikipedia Encyclopedia'. The main content area displays the definition of 'diagnosis' (pronounced /ˌdɪ.əɡˈnoʊ.sɪs/), which is derived from 'diagnostic medicine'. It lists three main categories: 1. Medicine, 2. Critical analysis, and 3. Biology. The medical definition includes sub-points: 'a. The act or process of identifying or determining the nature and cause of a disease or injury through evaluation of patient history, examination, and review of laboratory data.' and 'b. The opinion derived from such an evaluation.'

The screenshot shows the 'Merriam-Webster Medical Dictionary' website. The search bar contains 'diagnosis'. The main content area displays the 'Medical Definition of DIAGNOSIS'. It lists two main categories: 1. 'a: the art or act of identifying a disease from its signs and symptoms' and 'b: the decision reached by diagnosis - a diagnosis of pneumonia'. The second category is '2: a concise technical description of a lesion'. On the right side, there is a 'WORD OF THE DAY' section for 'subpoena'.

# Διάγνωση

Βασικές έννοιες:

Ευαισθησία (**clinical sensitivity**):

θετικά/(θετικά + ψευδώς αρνητικά)

Ειδικότητα (**specificity**):

αρνητικά/(αρνητικά + ψευδώς θετικά)

Ευαισθησία (**analytical sensitivity**):

Ο ελάχιστος αριθμός παρασίτων που μπορεί να ανιχνευτούν

## Εργαστηριακές εξετάσεις

- Μικροσκοπική εξέταση κοπράνων ή σπανιότερα ούρων
- Μικροσκοπική εξέταση αίματος
- Ανοσοφθορισμός
- Μικροσκοπική εξέταση βιοψιών
- Ορολογικές εξετάσεις
- Ανίχνευση αντιγόνου
- Ενδοσκόπηση
- Απεικονιστικές εξετάσεις

## Συχνά προβλήματα στην κλασσική διαγνωστική

- Το ιδανικό δείγμα δεν μπορεί να ληφθεί εύκολα [μυελός των οστών στην σπλαχνική λεισημανίαση]
- Προβλήματα εντόπισης και αναγνώρισης [πχ. σε κόπρανα]
- Αν πρόκειται για ενεργή λοίμωξη [ορολογικές δοκιμασίες]

## Συχνά προβλήματα στην κλασσική διαγνωστική

Εν συντομία τα προβλήματα της μικροσκοπικής διάγνωσης  
είναι:

- Απαιτεί χρόνο και δεν αυτοματοποιείται
- Εκπαίδευση και εμπειρία
- Η ευαισθησία και η επαναληψιμότητα είναι μικρή

## *Μοριακή διάγνωση σε ποια...;*

- Τα έντομα είναι ορατά με γυμνό οφθαλμό και αναγνωρίζονται εύκολα
- Δυσκολία υπάρχει στα **παρασιτικά πρωτόζωα** του αίματος και των κοπράνων
- Αλλά και στους **παρασιτικούς σκώληκες**, που απελευθερώνουν τα ωά ή προνύμφες στα κόπρανα ή τα ούρα, ή προνύμφες στο αίμα

## Μοριακή διάγνωση → PCR

ειδικός ενζυμικός **πολλαπλασιασμός** ενός (σχετικά μικρού) τμήματος DNA → **ανιχνεύσιμο**  
→ περαιτέρω ανάλυση

Η κλασσική εφαρμογή απαιτεί τρία διάκριτα στάδια:

- Απομόνωση DNA [DNA isolation]
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης [PCR]
- Ηλεκτροφόρηση [electrophoresis]

## *PCR – λέξεις κλειδιά*

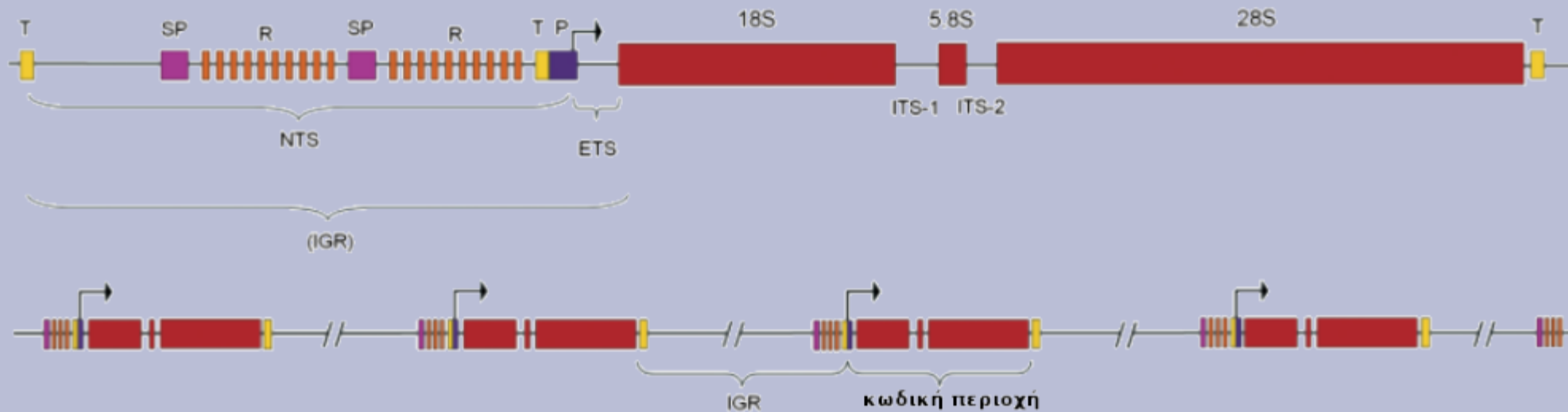
Εκκινητές [primers] →

ειδικότητα - ευαισθησία

Ακολουθία-στόχος [target-sequence] →

ευαισθησία – ειδικότητα - περαιτέρω ανάλυση

# *rDNA unit [The ribosomal cistron]*



IGR (or IGS): Intergenic region (or spacer) [διαγονιδιακή περιοχή]  
 NTS: non transcribed spacer [μη μεταγραφόμενο τμήμα]  
 ETS: external transcribed spacer [εξωτερικό μεταγραφόμενο τμήμα]  
 ITS: internal transcribed spacer [εσωτερικό μεταγραφόμενο τμήμα]

# *rDNA*

Σημαντικά πλεονεκτήματα:

- Πολλαπλά αντίγραφα → μεγάλη ευαισθησία
- Τμήματα με διάφορου βαθμού ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών → ευκολία σχεδιασμού
- Πολλά δεδομένα → δυνατότητες εφαρμογής σε πολλούς οργανισμούς

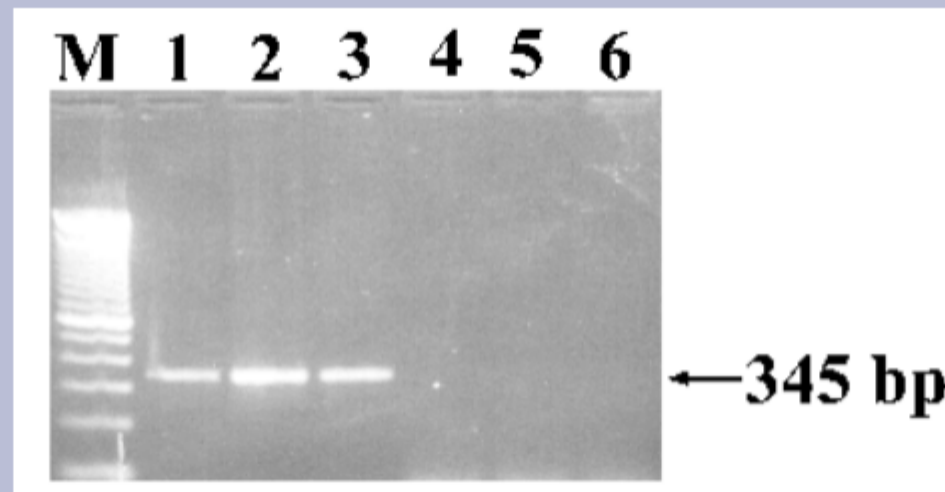
## Άλλα γονιδιακά τμήματα

Εξαρτάται από τον οργανισμό. πχ.

- *Giardia* → γονίδιο της **β-giardin**.
- *Leishmania* → DNA του **κινετοπλάστη**
- *Plasmodium* → **μιτοχονδριακό DNA**

# Πλεονέκτημα

Η μέθοδος έχει υψηλή **ευαισθησία**,...



Ανίχνευση *Leishmania* σε περιφερικό αίμα

# Πλεονέκτημα

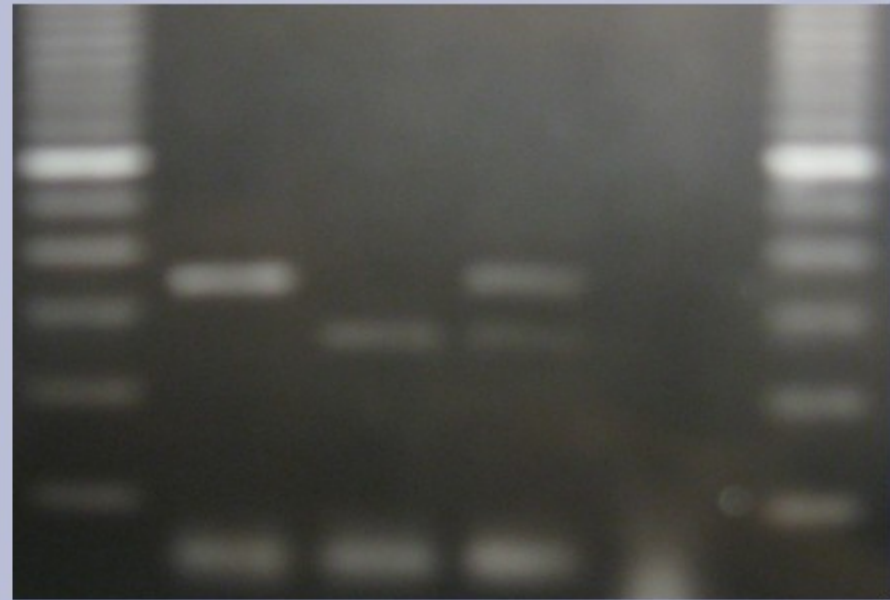
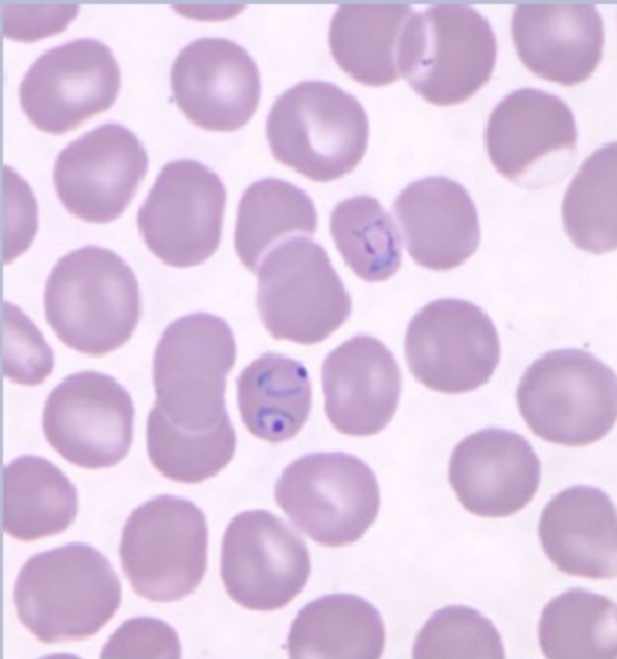
Η μέθοδος έχει υψηλή **ευαισθησία**,...



Ανίχνευση *Strongyloides stercoralis* σε δείγμα κοπράνων

# Πλεονέκτημα

...είναι **αντικειμενική**...

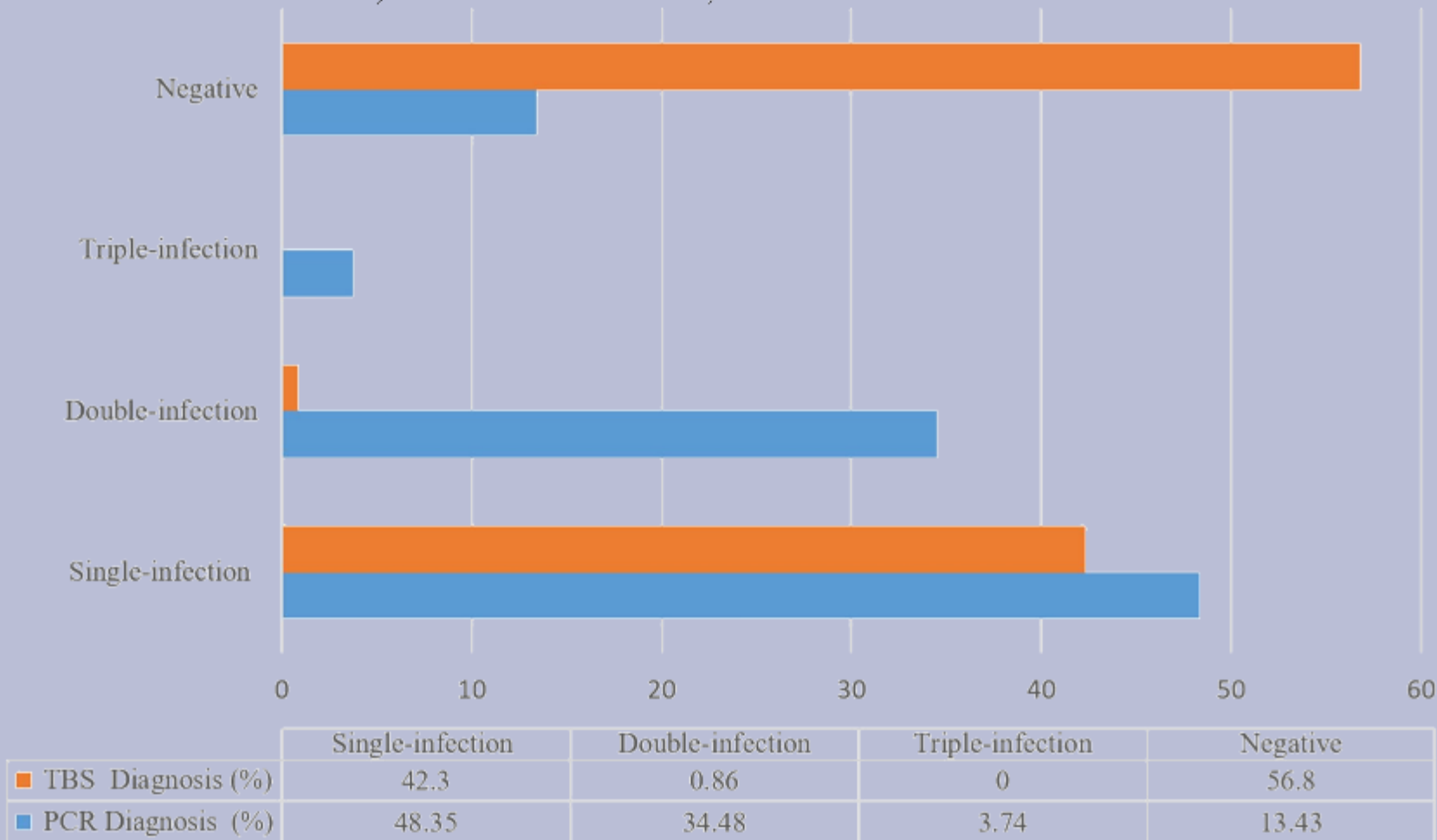


Ανίχνευση *Plasmodium* σε περιφερικό αίμα



# *Plasmodium malariae* in the Colombian Amazon region: you don't diagnose what you don't suspect

Carlos Hernando Niño<sup>1</sup>, Juan Ricardo Cubides<sup>1</sup>, Paola Andrea Camargo-Ayala<sup>1</sup>, Carlos Arturo Rodríguez-Celis<sup>2</sup>, Teófilo Quiñones<sup>1</sup>, Moisés Tomás Cortés-Castillo<sup>1</sup>, Lizeth Sánchez-Suárez<sup>1</sup>, Ricardo Sánchez<sup>1,3</sup>, Manuel Elkin Patarroyo<sup>1,3</sup> and Manuel Alfonso Patarroyo<sup>1,4\*</sup>



**Fig. 1** Detection agreement between TBS and PCR diagnosis with regards to single and mixed infections. Percentages of single, double and triple infections for PCR assay compared to TBS test

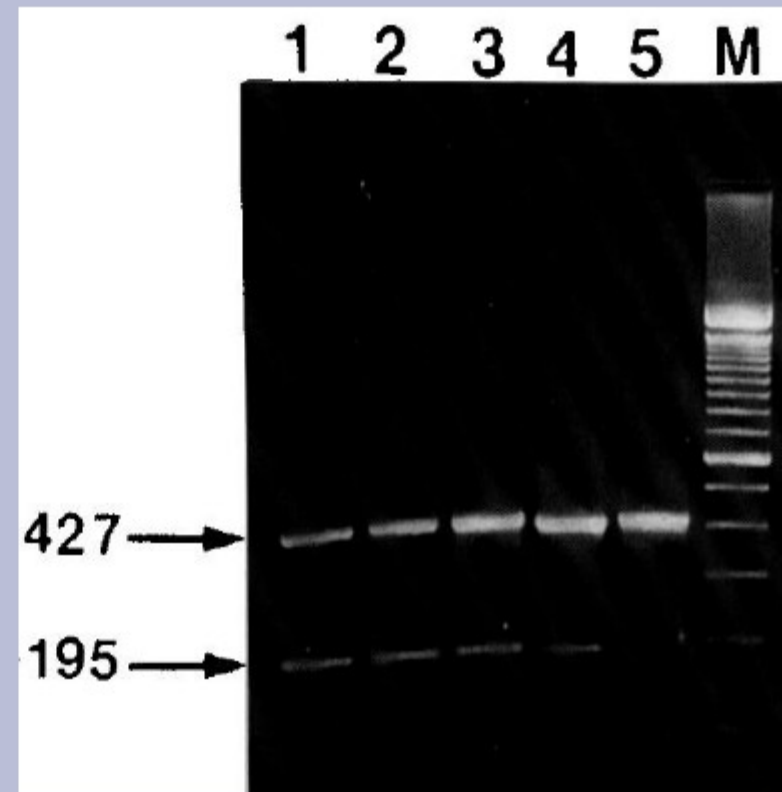
*Plasmodium malariae* in the Colombian Amazon region: you don't diagnose what you don't suspect.

Niño CH, Cubides JR, Camargo-Ayala PA, Rodríguez-Celis CA, Quiñones T, Cortés-Castillo MT, Sánchez-Suárez L, Sánchez R, Patarroyo ME, Patarroyo MA.

Malar J. 2016 Nov 29;15(1):576

# Πλεονέκτημα

...μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες (πχ. είδος)...

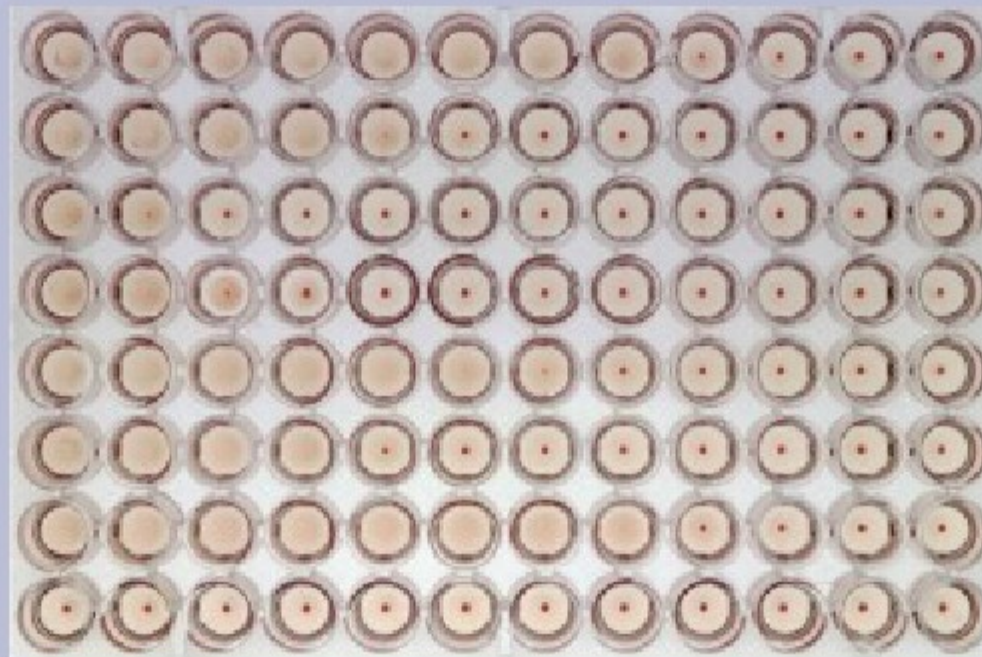


Διάκριση *Entamoeba histolytica* – *E. dispar* με PCR

# πλεονέκτημα

...άμεση ανίχνευση...

(Σε αντίθεση με τις ορολογικές εξετάσεις)



# Toxoplasma gondii

Parasitic diseases of the central nervous system. Abdel Razek AA, Watcharakorn A, Castillo M. Neuroimaging Clin N Am. 2011 Nov;21(4):815-41, viii. doi: 10.1016/j.nic.2011.07.005

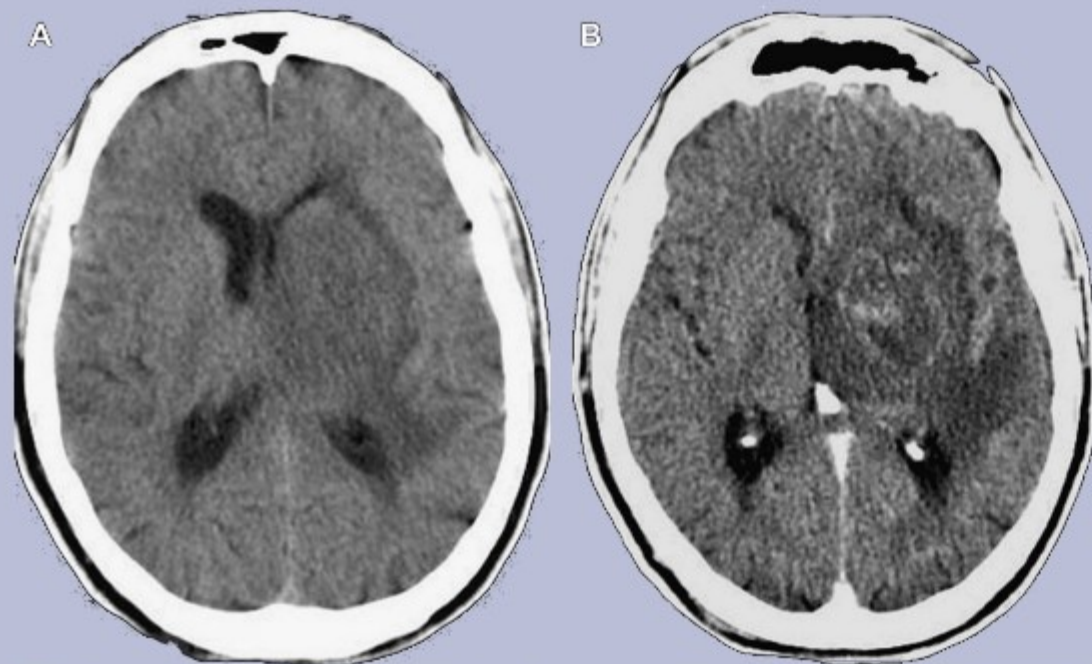
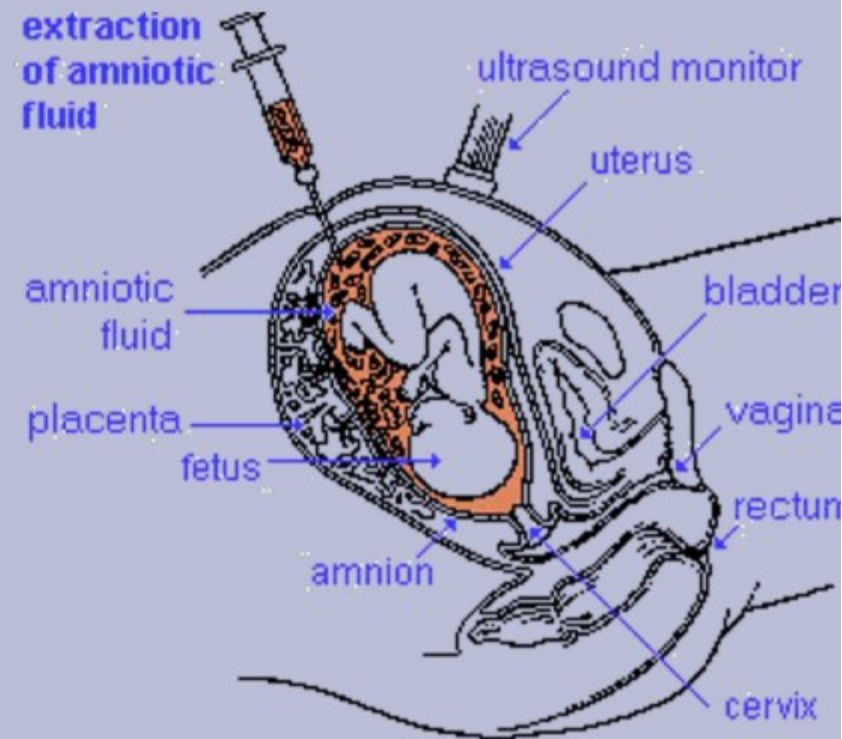


Fig. 14. Toxoplasmosis. (A) Axial noncontrast CT scan shows a hypodense lesion with mass effect, and edema in the left thalamic region. (B) Axial contrast-enhanced CT scan shows a heterogeneous contrast enhancement of the lesion with surrounding edema.



Hill, M.A. 2017 Embryology Amniocentesis. Retrieved May 11, 2017, from <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Amniocentesis>

Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. Robert-Gangneux F, Sterkers Y, Yera H, Accoceberry I, Menotti J, Cassaing S, Brenier-Pinchart MP, Hennequin C, Delhaes L, Bonhomme J, Villena I, Scherer E, Dalle F, Touafek F, Filisetti D, Varlet-Marie E, Pelloux H, Bastien P. J Clin Microbiol. 2015 May;53(5):1677-84. doi: 10.1128/JCM.03282-14

Performance of Polymerase Chain Reaction Analysis of the Amniotic Fluid of Pregnant Women for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. de Oliveira Azevedo CT, do Brasil PE, Guida L, Lopes Moreira ME. PLoS One. 2016 Apr 7;11(4):e0149938. doi: 10.1371/journal.pone.0149938

# Άλλα πλεονεκτήματα

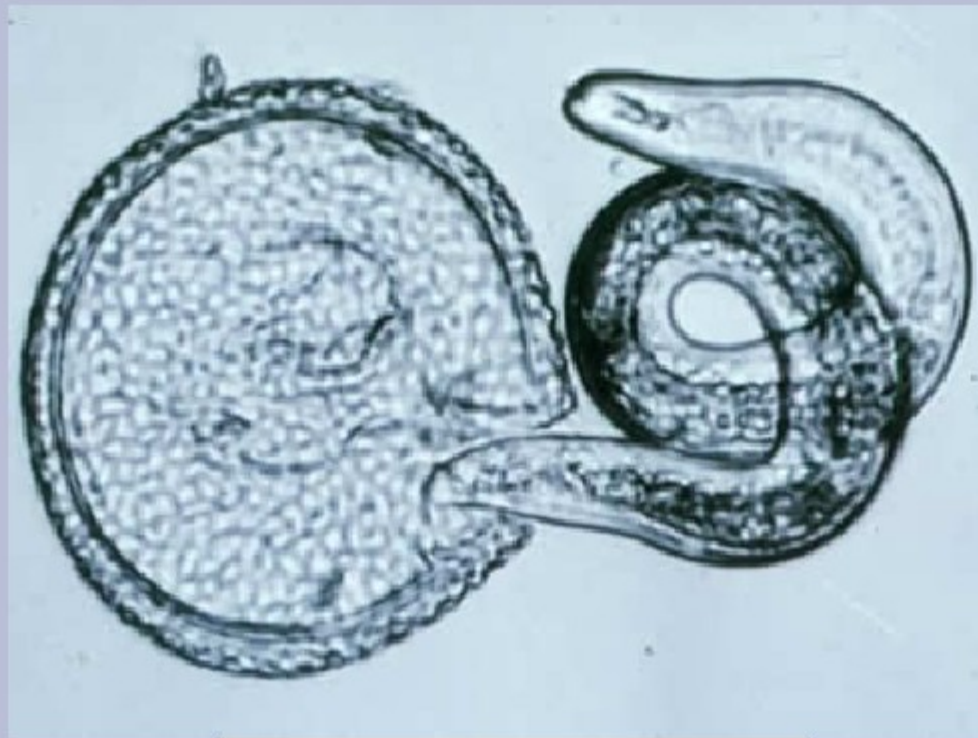
...

- αυτοματοποίηση
- ταχύτητα
- ΟΧΙ εξειδίκευση
- κόστος (;)



# Μειονέκτημα

Πρέπει το δείγμα να περιέχει το παράσιτο



*Toxocara canis*

# Μειονέκτημα

Πρέπει να είναι γνωστός ο “στόχος”



*Balantidium coli*

# Μειονέκτημα;

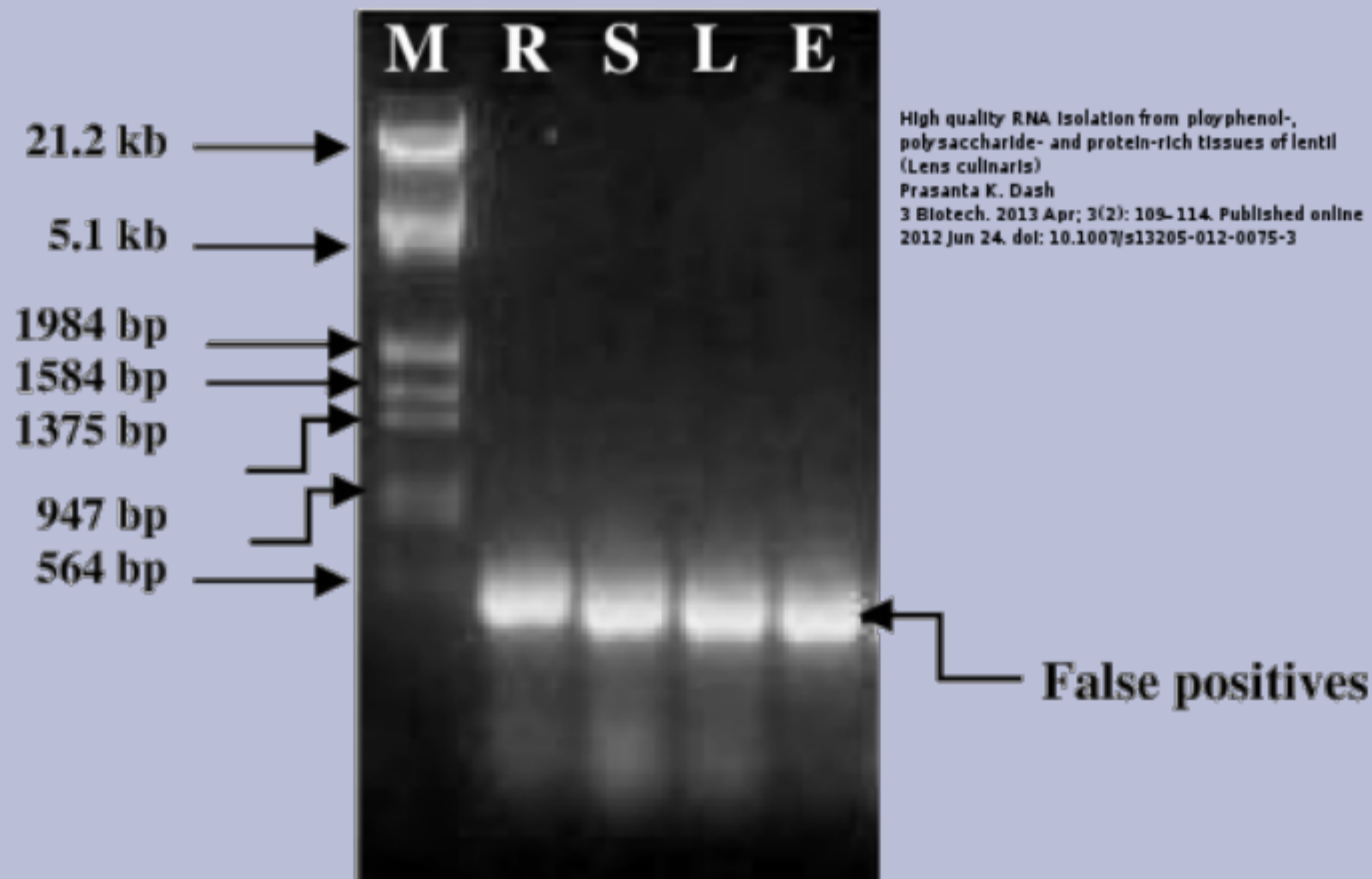
Η αξιολόγηση σε κάποιες περιπτώσεις



*Leishmania infantum*

# Μειονέκτημα

Ψευδώς θετικά – ψευδώς αρνητικά  
(επιμολύνσεις-μετά από θεραπεία-αναστολή)



False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy.

Borst A, Box AT, Fluit AC.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004 Aug; 23(4): 389-99.

## Άλλα μειονεκτήματα

- μόνο σε οργανωμένα εργαστήρια
- σημαντικού κόστους επένδυση
- ΔΕΝ αποτελεί το gold standard
- ΔΕΝ μπορεί να συντηρηθεί το δείγμα χημικά (-20°C;)

# ποσοτική [qPCR] ή *real-time PCR*

## TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

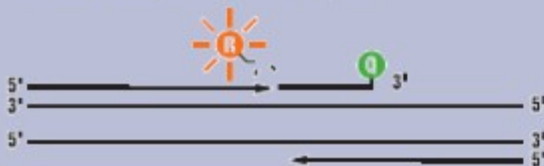
1. Polymerization: A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan probe, respectively.



2. Strand displacement: When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. Cleavage: During strand displacement, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. Polymerization completed: Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



## SYBR® GREEN I DYE ASSAY CHEMISTRY

1. Reaction setup: The SYBR® Green I dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



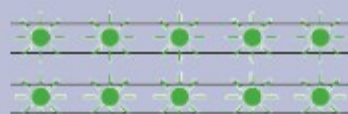
2. Denaturation: When the DNA is denatured, the SYBR® Green I dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. Polymerization: During amplification, the primer and FRET product is generated.



4. Polymerization completed: When polymerization is complete, SYBR® Green I dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the PCR system.



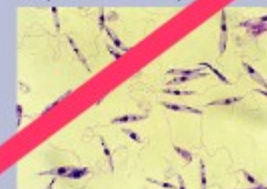
Αποφεύγονται οι επιμολύνσεις, υψηλή ευαισθησία/ειδικότητα, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται ανιχνευτής (probe). [κόστος;]

διάγνωση

Μειονέκτημα;;;

Ψευδώς θετικά – ψευδώς αρνητικά

• επιμολύνσεις (nested PCR)



*Leishmania infantum*

# Σύγκριση

TABLE 1 Comparison of PCR and FECT-microscopy for detection of intestinal parasites in stool samples

Parasite	No. (%) of samples ( $n = 889$ ) positive by:		
	PCR on genomic DNA extracted directly from feces	Microscopy of FECT concentrates	<i>Blastocystis</i> culture
<i>Giardia intestinalis</i>	24 (2.7)	9 (1.0)	NA <sup>a</sup>
<i>Cryptosporidium</i> sp.	16 (1.8)	0 (0.0)	NA
<i>Entamoeba histolytica</i>	4 (0.5)	1 (0.1)	NA
<i>Entamoeba dispar</i>	2 (0.2)	1 (0.1)	NA
<i>Dientamoeba fragilis</i>	167 (18.8)	NA	NA
<i>Blastocystis</i> sp.	NA	19 (2.1)	64 (7.2)
Other <sup>b</sup>	NA	28 (3.1)	NA

<sup>a</sup> NA, not applicable.

<sup>b</sup> Other parasites include *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, and *Endolimax nana*.

# Ποσοτικοποίηση

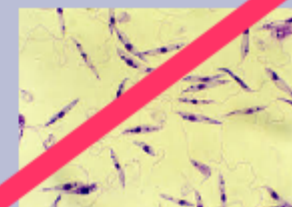
Η qPCR → ποσοτική εκτίμηση της ακολουθίας-στόχου  
στο δείγμα

Χρησιμότητα → πορεία λοίμωξης  
→ αποτελεσματικότητα της θεραπείας

Επίλυση προβλημάτων αξιολόγησης

Μειονέκτημα;

Η αξιολόγηση σε κάποιες περιπτώσεις



*Leishmania infantum*

# Πολυπλεκτική [multiplex] PCR

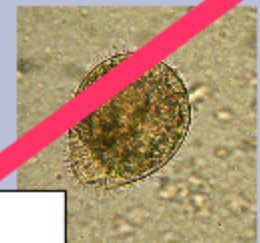
Συνήθως μέχρι 3-4 παράσιτα

*Entamoeba*, *Cryptosporidium*, *Giardia* τα συνηθέστερα

Ανάλογα με την περιοχή και άλλα

Μειονέκτημα

Πρέπει να είναι γνωστός ο "στόχος"



*Bacteroides coli*

Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR.

Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM.

# Ανίχνευση έκτοπου DNA

## Σχιστόσωμα σε δείγμα ορού

PCR DETECTION OF *S. MANSONI* IN HUMAN SAMPLES

161

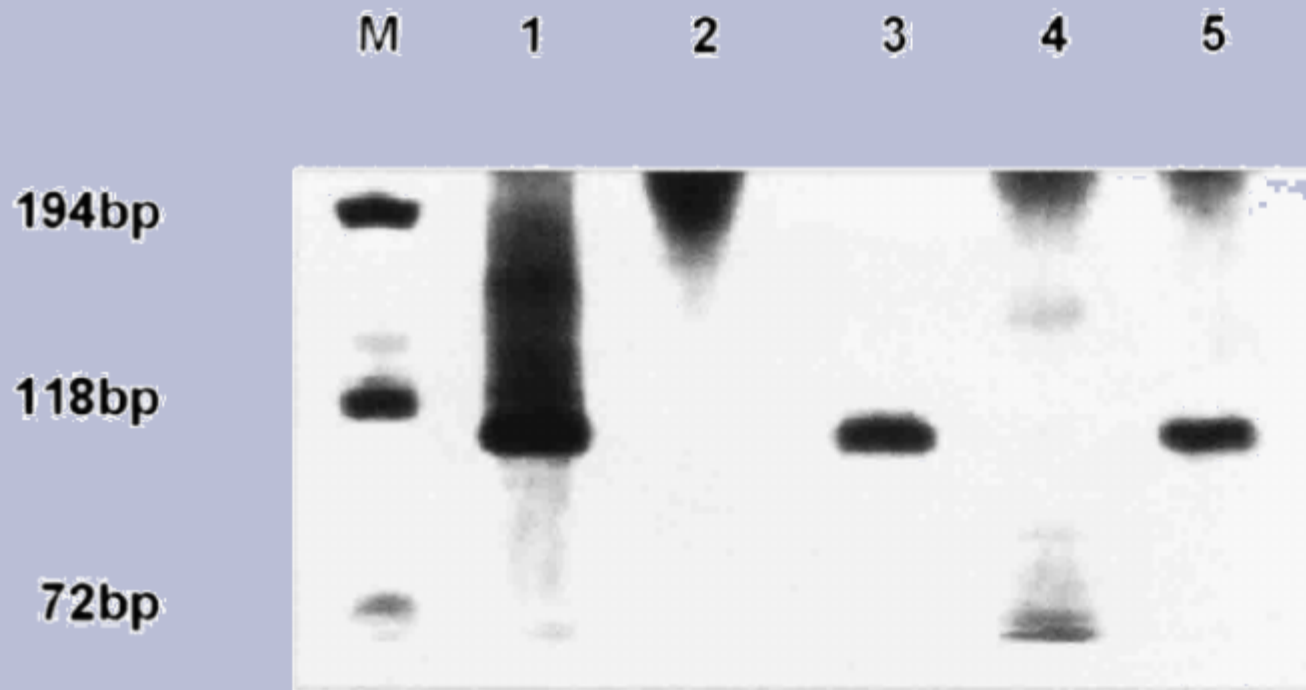
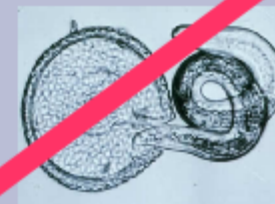


FIGURE 6. *Schistosoma mansoni* polymerase chain reaction (PCR) detection in clinical serum samples. The DNA from 4 serum samples was analyzed by PCR. **Lane M**, molecular weight marker ( $\phi$ x-174). **Lane 1**, positive control (*S. mansoni* egg DNA). **Lanes 2–5**, serum from patients with 0 (negative sample), 96, 0 (negative sample), and 216 eggs per gram of feces, respectively.

Μελιόνεκτημα

Πρέπει τα δείγμα να περιέχει τα αυγά



*Schistosoma mansoni*

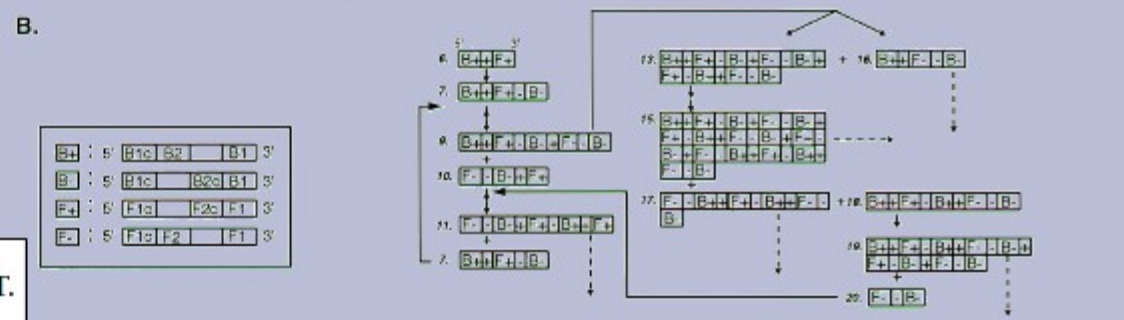
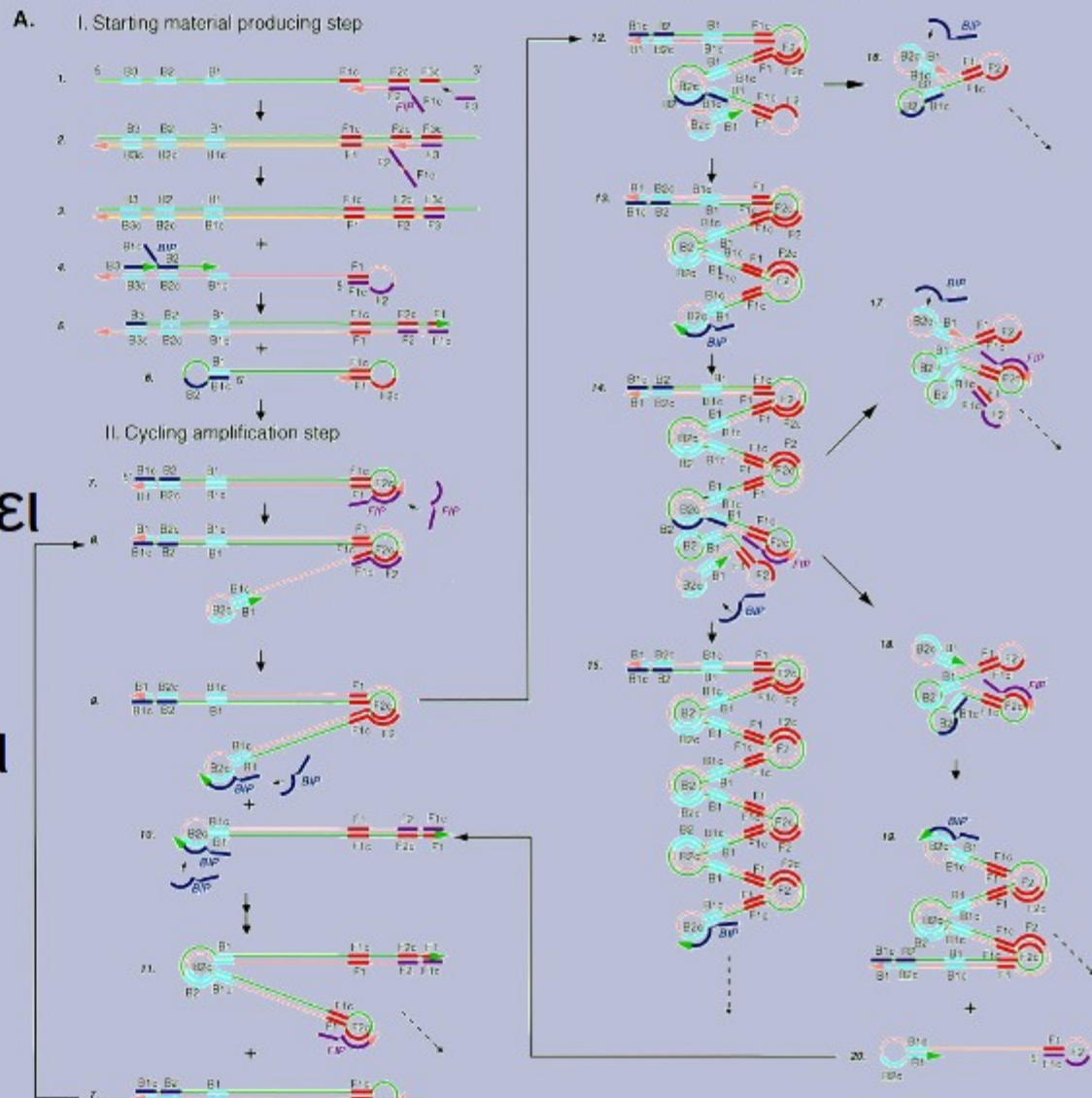
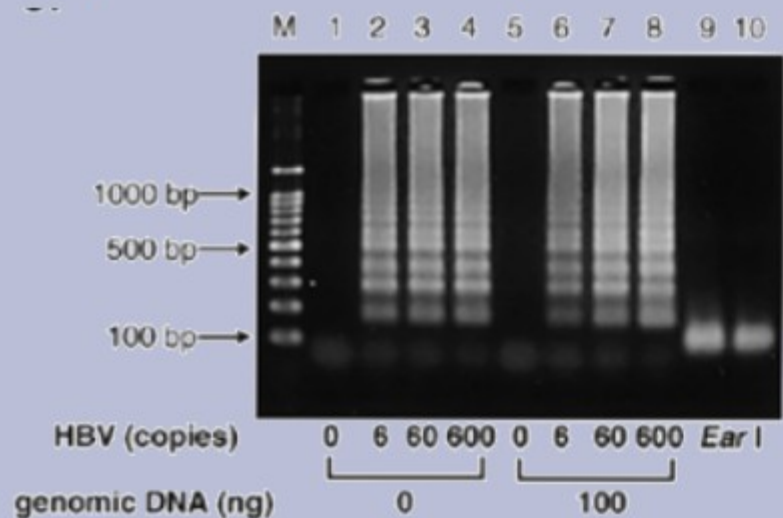
Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces.

Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A.

Am J Trop Med Hyg. 2002 Feb;66(2):157-62

# LAMP

Πρόκειται για μια τεχνική που επίσης πολλαπλασιάζει τμήμα DNA του υπό ανίχνευση παρασίτου Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για πολλά παράσιτα



Loop-mediated isothermal amplification of DNA.  
 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T.  
 Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15;28(12):E63

# LAMP

**Sensitive and Inexpensive Molecular Test for Falciparum Malaria: Detecting *Plasmodium falciparum* DNA Directly from Heat-Treated Blood by Loop-Mediated Isothermal Amplification,** Leo L.M. Poon,<sup>1\*</sup> Bonnie W.Y. Wong,<sup>1</sup> Edmund H.T. Ma,<sup>1</sup> Kwok H. Chan,<sup>1</sup> Larry M.C. Chow,<sup>2</sup> Wimal Abeyewickreme,<sup>3</sup> Noppadon Tangpukdee,<sup>4</sup> Kwok Y. Yuen,<sup>1</sup> Yi Guan,<sup>1</sup> Sornchai Looareesuwan,<sup>4</sup> and J.S. Malik Peiris<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Hong Kong SAR; <sup>2</sup> Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong SAR; <sup>3</sup> Department of Parasitology and Molecular Medicine Unit, Faculty of Medicine, University of Kelaniya, Sri Lanka; <sup>4</sup> Department of Clinical Tropical medicine, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand; \* address correspondence to this author at: Department of Microbiology, University of Hong Kong, Queen Mary Hospital, Pokfulam, Hong Kong SAR; fax 852-2855-1241, e-mail llmpoon@hkucc.hku.hk)

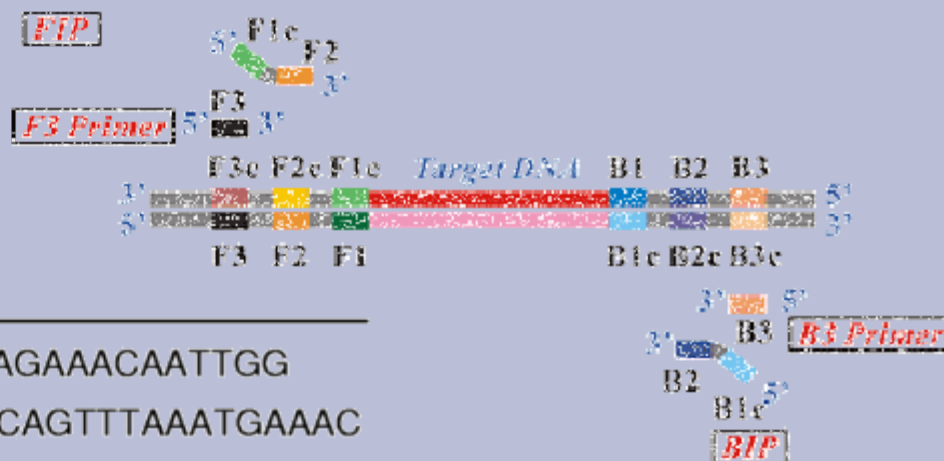
**Background:** Malaria is one of the most important parasitic infections in humans. A sensitive diagnostic test for malaria that could be applied at the community level could be useful in programs to control the disease. The aim of the present work was to develop a simple, inexpensive molecular test for *Plasmodium falciparum*.

**Methods:** Blood was collected from controls (n = 100) and from patients diagnosed with falciparum malaria infection (n = 102), who were recruited to the study. Heat-treated blood samples were tested by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *P. falciparum*. Results were interpreted by a turbidity meter in real time or visually at the end of the assay. To evaluate the assay, DNA from these samples was purified and tested by PCR. Results from the LAMP and PCR assays were compared.

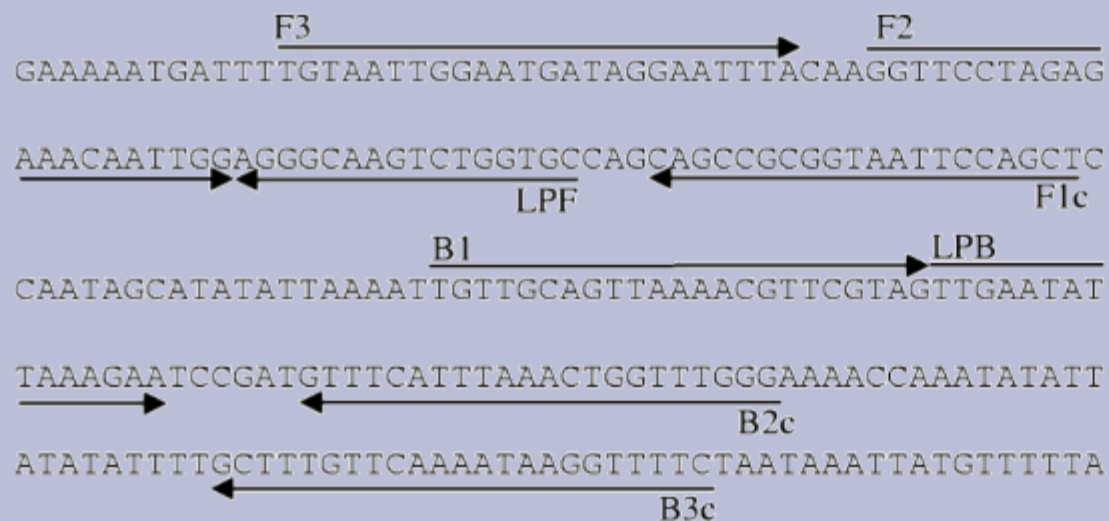
**Results:** The LAMP assay detected *P. falciparum* directly from heat-treated blood. The quantitative data from the assay correlated to the parasite counts obtained by blood-film microscopic analyses. When we used the PCR assay as the comparison method, the sensitivity and specificity of the LAMP assay were 95% and 99%, respectively.

**Conclusions:** Unlike PCR, the LAMP assay does not require purified DNA for efficient DNA amplification, thereby reducing the cost and turnaround time for *P. falciparum* diagnosis. The assay requires only basic instruments, and assay positivity can be verified by visual inspection.

# LAMP



REGION	PRIMER SEQUENCE (5' to 3')
F1P (F1C+F2)	AGCTGGAATTACCGCGGCTGGGTTCTAGAGAAACAATTGG
B1P (B1+B2C)	TGTTGCAGTTAAAACGTTTCGTAGCCCAAACCAGTTTAAATGAAAC
F3	TGTAATTGGAATGATAGGAATTTA
B3C	GAAAACCTTATTTGAACAAAGC
LPF	GCACCAGACTTGCCCT
LPB	TTGAATATTAAGAA



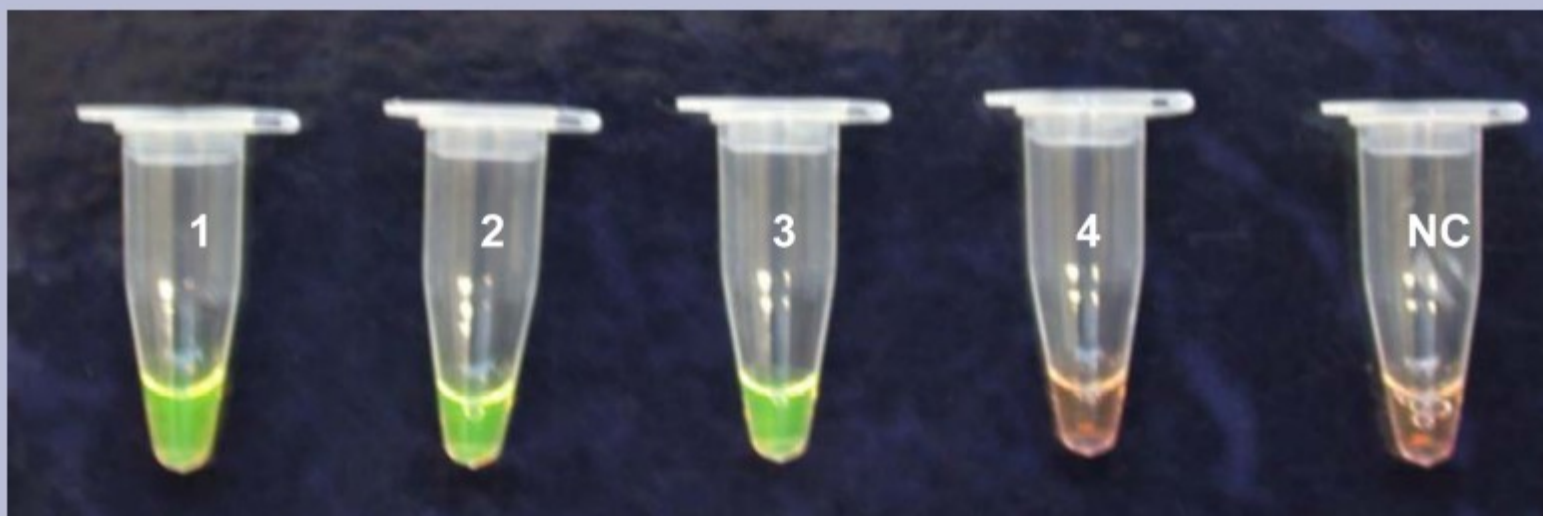
Sensitive and Inexpensive Molecular Test for Falciparum Malaria: Detecting Plasmodium falciparum

DNA Directly from Heat-Treated Blood by Loop-Mediated Isothermal Amplification,

Poon LLM, Wong BWY, Ma EHT, Chan KH, Chow LMC, Abeyewickreme W, Tangpukdee N, Yuen KY, Guan Y, Looareesuwan S, Malik Peiris JS

Clinical Chemistry. 2006 52(2):303-306 doi:10.1373/clinchem.2005.057901

# LAMP



Primer	Type	Sequence <sup>a</sup> (5'-3')	Length	Amplicon Size <sup>b</sup>	Target
SRA-F3	F3	GCGGAAGCAAGAATGACC	18	162	SRA gene
SRA-B3	B3	TCTTACCTTGTGACGCCTG	19	—	—
SRA-FIP	FIP (F1c+F2)	GGACTGCGTTGAGTACGCATCCGCAAGCACAGACCACAGC	40	—	—
SRA-BIP	BIP (B1c+B2)	CGCTCTTACAAGTCTTGCGCCCTTCTGAGATGTGCCCACTG	41	—	—
SRA-LF	LF	CGCGGCATAAAGCGCTGAG	19	—	—
SRA-LB	LB	GCAGCGACCAACGGAGCC	18	—	—

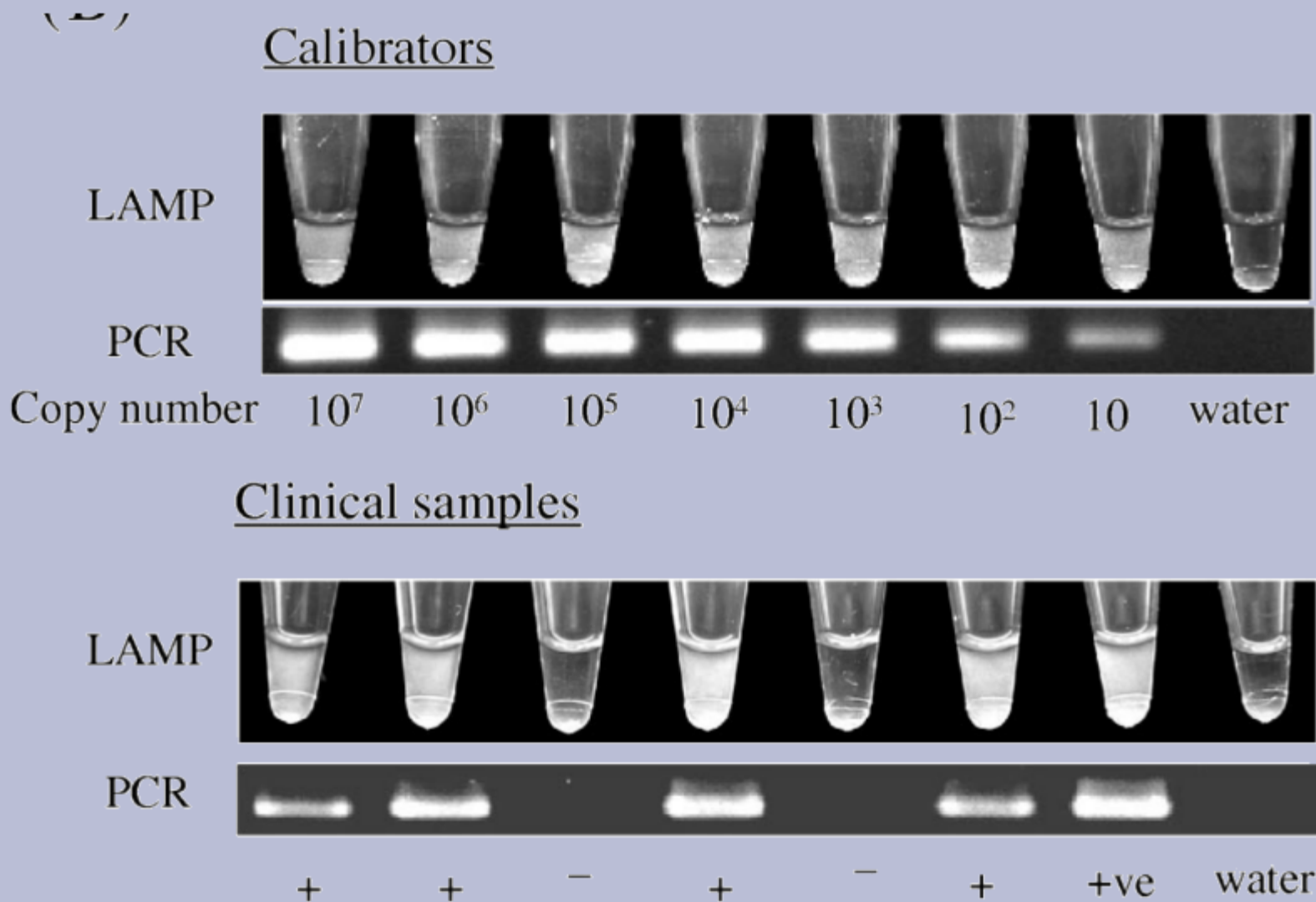
<sup>a</sup>Accession number Z37159.

<sup>b</sup>The length between F2 and B2 is 162 bp. However, the amplified amplicon sizes will be more than 162 bp since the FIP and BIP primers consist of F1c (21 bp) and B1c (21 bp), respectively.

doi:10.1371/journal.pntd.0000147.t002

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*.  
 Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR.  
 PLoS Negl Trop Dis. 2008 Feb 6;2(1):e147. doi: 10.1371/journal.pntd.0000147

# LAMP



Detection of 18S ribosomal RNA gene of *P. falciparum*.

Sensitive and Inexpensive Molecular Test for Falciparum Malaria: Detecting Plasmodium falciparum

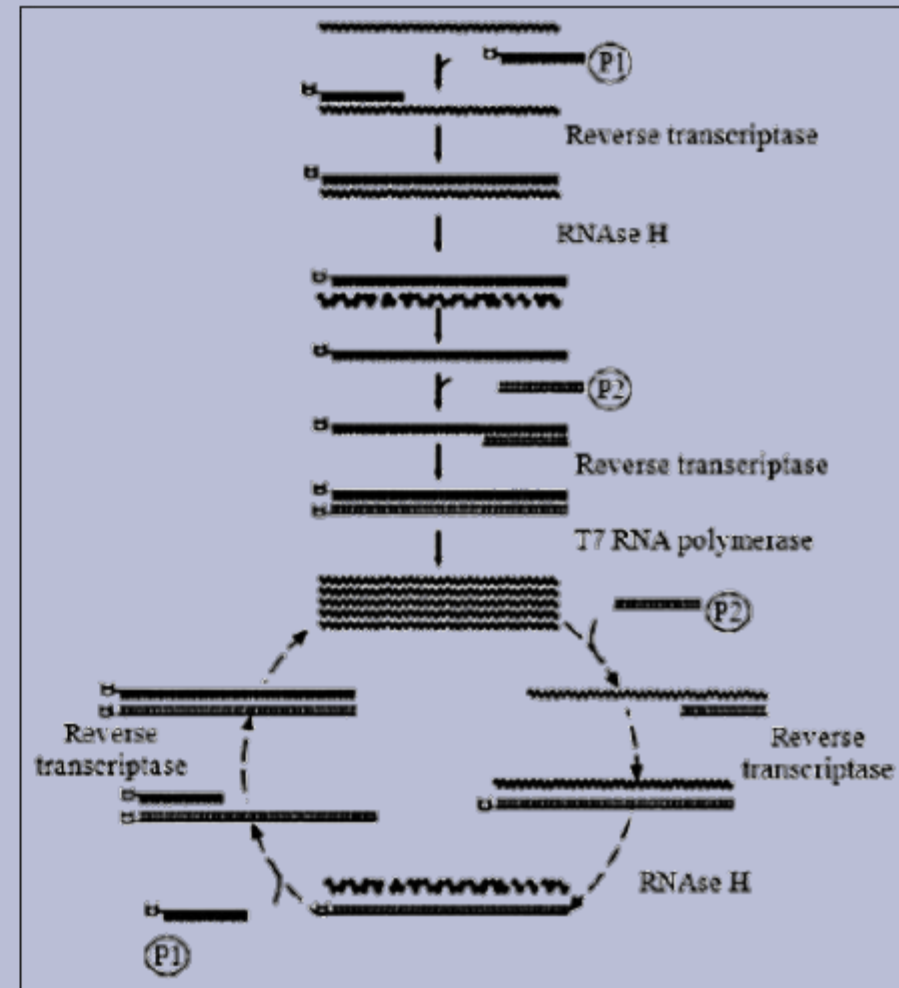
DNA Directly from Heat-Treated Blood by Loop-Mediated Isothermal Amplification,

Poon LLM, Wong BWY, Ma EHT, Chan KH, Chow LMC, Abeyewickreme W, Tangpukdee N, Yuen KY, Guan Y, Looareesuwan S, Malik Peiris JS

Clinical Chemistry. 2006 52(2):303-306 doi:10.1373/clinchem.2005.057901

# Nucleic Acid Sequence Based Amplification

NAAT  
Nucleic Acid  
Amplification Tests



# *Trichomonas vaginalis*

Μικροσκόπηση σε σχέση με μοριακές μεθόδους:  
44-68%.

Ταχεία αποικοδόμηση των παρασίτων

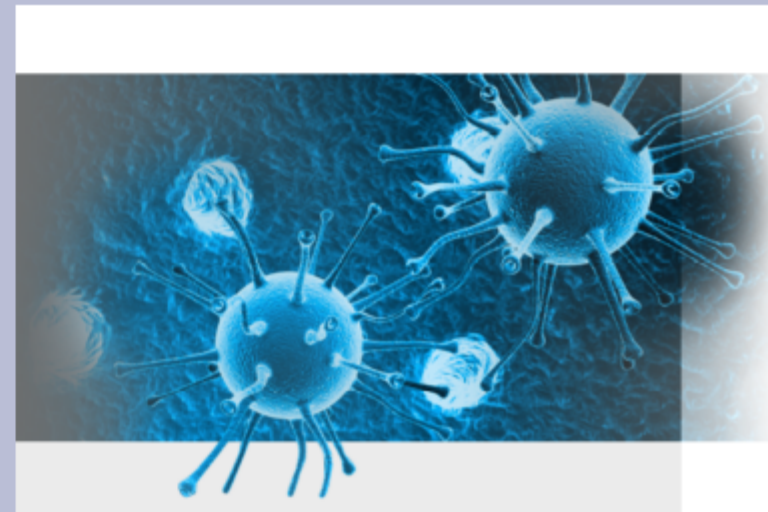
Διαθέσιμο EU CE και US FDA εμπορικό κιτ



# *Luminex*

Πρόκειται για μια τεχνική που χρησιμοποιεί σφαιρίδια με διαφορετική φθορίζουσα ουσία και διαφορετικό “στόχο”. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα πολλούς διαφορετικούς παθογόνους παράγοντες.

Είναι το μόνο “FDA approved”



# Luminex

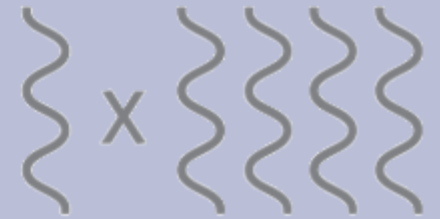
## Pre-PCR



Sample Pre-treatment  
45-60 minutes

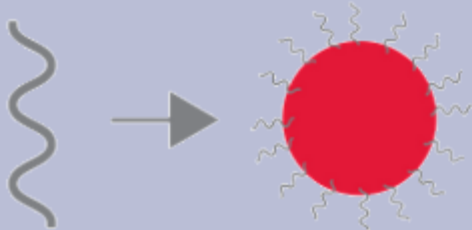


Nucleic Acid Extraction and Purification  
45 minutes



Multiplex Application  
2.5 hours

## Post-PCR



Bead Hybridization and Detection  
1 hour



Data Acquisition and Analysis by MAGPIX<sup>®</sup>  
or Luminex<sup>®</sup> 100/200<sup>™</sup>  
10 minutes

## Targets and Instrument Systems

CE Marked in EU  
and SFDA Approved

### Bacteria and Bacterial Toxins

<i>Campylobacter</i>	•
<i>Clostridium difficile</i> , Toxin A/B	•
<i>Escherichia coli</i> O157	•
Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC) H7	•
Shiga-like Toxin producing <i>E. coli</i> (STEC) <i>stx1/stx2</i>	•
<i>Salmonella</i>	•
<i>Shigella</i>	•
<i>Vibrio cholerae</i>	•
<i>Yersinia enterocolitica</i>	•

### Viruses

Adenovirus 40/41	•
Norovirus GI/GII	•
Rotavirus A	•

### Parasites

<i>Giardia</i>	•
<i>Cryptosporidium</i>	•
<i>Entamoeba histolytica</i>	•

### Internal Control

Bacteriophage M52	•
-------------------	---

### Instruments

MAGPIX® System	•
Luminex® 100/200™ System	•

# Luminex

# Το μέλλον (;)

Panmicrobial Oligonucleotide Array for Diagnosis of Infectious Diseases - rekonq

parasitic diagnosis mic... Panmicrobial Oligonucl...  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725825/>



Panmicrobial Oligonucleotide Array for Diagnosis of Infectious Diseases  
 Emerg Infect Dis. 2007 January, 13(1): 73-81.



## EMERGING INFECTIONOUS DISEASES\*



### Panmicrobial Oligonucleotide Array for Diagnosis of Infectious Diseases

Gustavo Palacios, Phenix-Lan Quan, [...], and W. Ian Lipkin

[Additional article information](#)

#### Abstract

To facilitate rapid, unbiased, differential diagnosis of infectious diseases, we designed GreeneChipPm, a panmicrobial microarray comprising 29,455 sixty-mer oligonucleotide probes for vertebrate viruses, bacteria, fungi, and parasites. Methods for nucleic acid preparation, random primed PCR amplification, and labeling were optimized to allow the sensitivity required for application with nucleic acid extracted from clinical materials and cultured

isolates. Analysis of nasopharyngeal aspirates, blood, urine, and tissue from persons with various infectious diseases confirmed the presence of viruses and bacteria identified by other methods, and implicated *Plasmodium falciparum* in an unexplained fatal case of hemorrhagic feverlike disease during the Marburg hemorrhagic fever outbreak in Angola in 2004-2005.

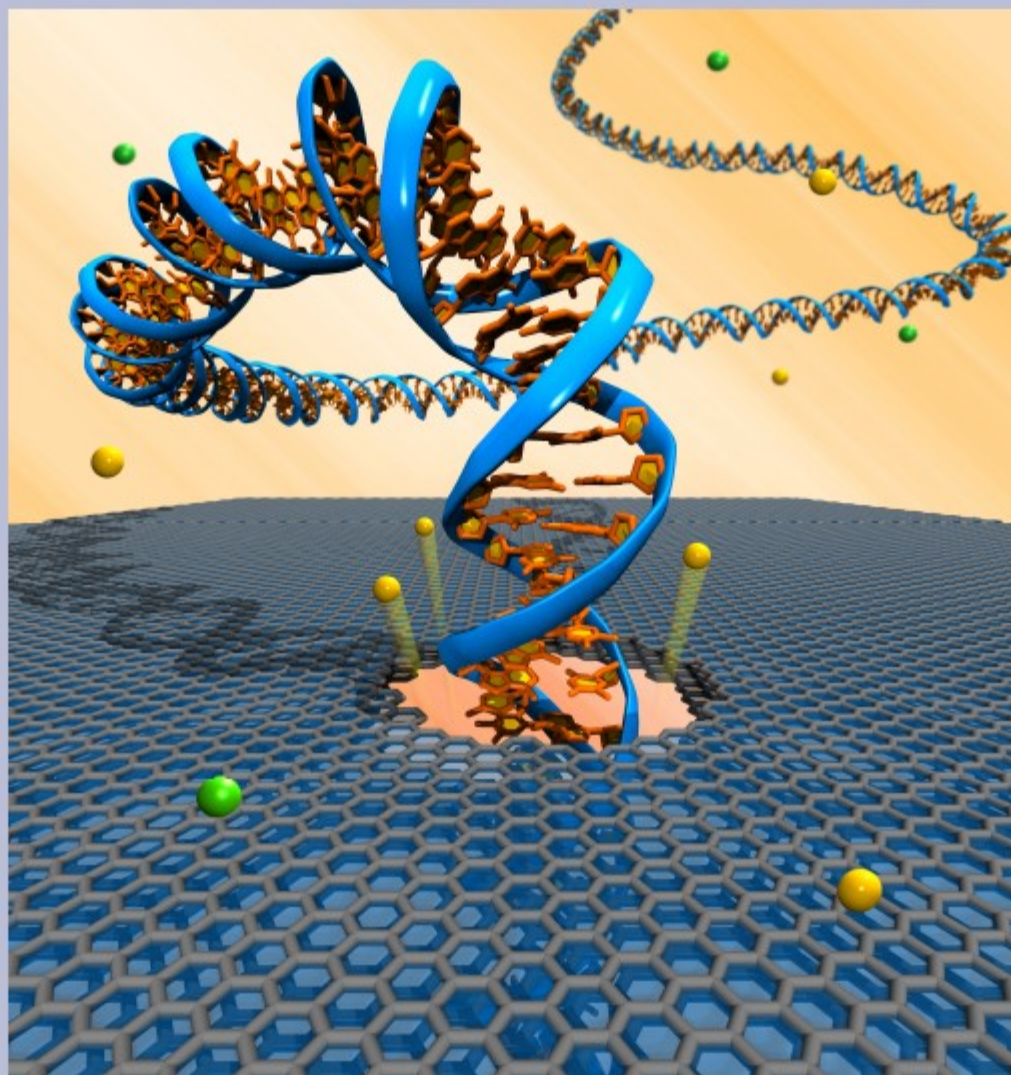
**Keywords:** Malaria, viral hemorrhagic fever, differential diagnosis, oligonucleotide microarrays, microarray analytical devices, communicable diseases, emerging communicable disease control, research

Rapid differential diagnosis of infectious diseases is increasingly important as novel pathogens emerge in new contexts and treatment strategies are beginning to be tailored to specific infectious agents. Because clinical syndromes are rarely specific for single pathogens, unbiased multiplex assays are essential. Methods for direct molecular detection of microbial pathogens in clinical specimens are rapid, sensitive, and may succeed when fastidious requirements for agent replication or the need for high-level biocontainment confound cultivation.

We have adopted a staged strategy for molecular pathogen surveillance and



# Το μέλλον (;)



# Περιβαλλοντικά δείγματα

- Χρησιμότητα → πηγή μόλυνσης  
→ εκτίμηση κινδύνου για την υγεία  
→ εκτίμηση επιδημιολογικών παραμέτρων του πληθυσμού (λύματα)

# Περιβαλλοντικά δείγματα

Νερό - λύματα  
Χώμα  
Τροφές  
Ζώα  
Διαβιβαστές



## Περιβαλλοντικά δείγματα

Οι μοριακές μέθοδοι έχουν λίγο ως πολύ τα ίδια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (όσα έχουν εφαρμογή) που συζητήθηκαν στην διάγνωση, και οι πιθανές λύσεις είναι παρόμοιες

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε δείγματα περιβάλλοντος, οι περιοριστικοί παράγοντες είναι συνήθως η συλλογή (δειγματοληψία) και η κατεργασία πριν την ανίχνευση

## Περιβαλλοντικά δείγματα

Επιπλέον παράμετροι που πρέπει να εκτιμηθούν:

- Συγκέντρωση των παρασίτων
- Παρουσία άγνωστων οργανισμών
- Αναστολή
- Βιωσιμότητα παρασίτων

## Υδάτινα δείγματα

Κυρίως αφορά παράσιτα (πρωτόζωα και έλμινθες) που μεταδίδονται κοπροστοματικά.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι τα *Cryptosporidium spp.* και *Giardia intestinalis* που συνδέονται με υδατογενείς επιδημίες και στις ανεπτυγμένες χώρες.

Άλλα παράσιτα είναι τα *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Acanthamoeba spp.*

# Υδάτινα δείγματα

Κατά κανόνα η διαδικασία ανίχνευσης ξεκινά με “συγκέντρωση” του δείγματος.

Τυποποιημένες μέθοδοι *Giardia-Cryptosporidium*:

EPA 1623

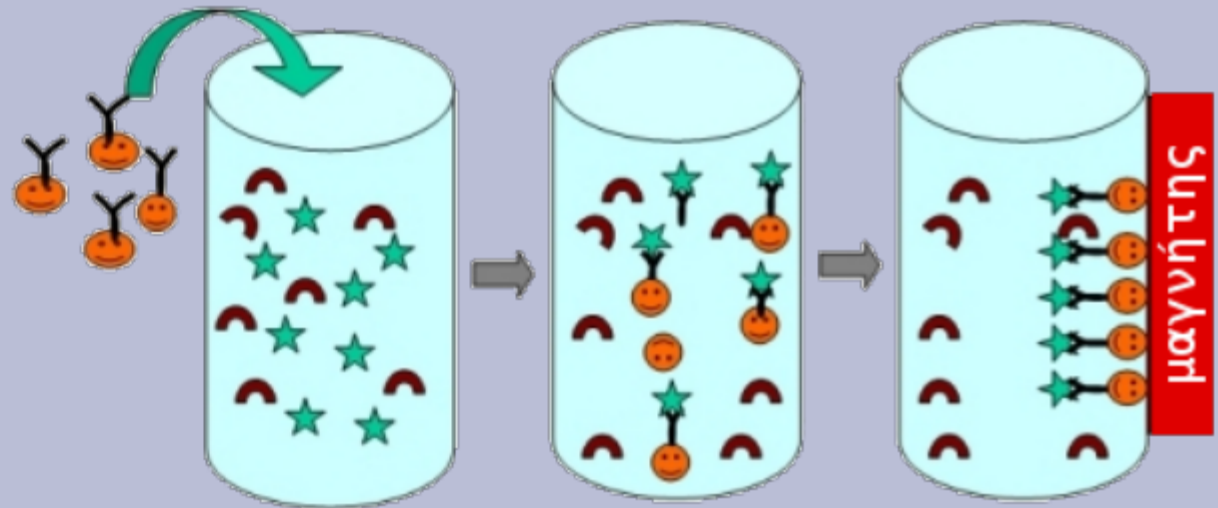
ISO 1553

## *(1) Συγκέντρωση*

Τεχνικές:

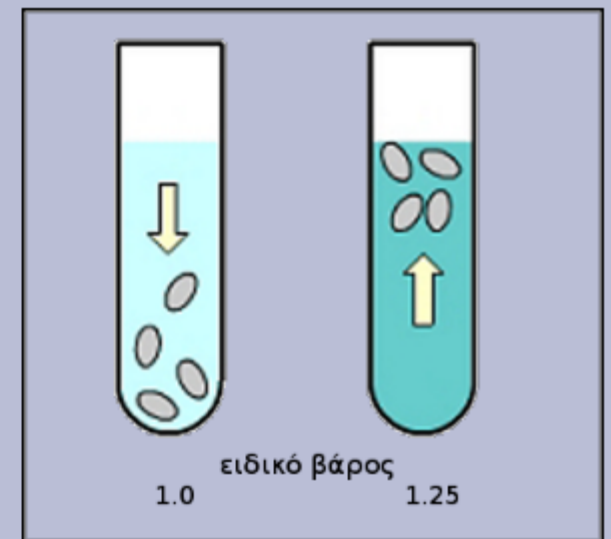
- Φιλτράρισμα (ειδικά φίλτρα)
- Φυγοκέντρωση
- Κροκίδωση (flocculation)

## (2) Καθαρισμός - Εμπλουτισμός



Τεχνικές:

- Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (περιορισμένες εφαρμογές)
- Φυγοκέντρωση σουκρόζης ή αντίστοιχη



## Δείγματα εδάφους

Αφορά παράσιτα (πρωτόζωα και έλμινθες) που μεταδίδονται κοπροστοματικά, αφού τα κόπρανα σε μεγάλο βαθμό μολύνουν πρώτα το έδαφος, αλλά και παράσιτα που κυρίως μεταδίδονται μέσω του εδάφους

Ιδιαίτερη και εδώ η *Acanthamoeba*.

## Δείγματα εδάφους

Το κυριότερο πρόβλημα → η αναστολή

- Ειδικά κιτ για την απομόνωση DNA, ή
- Διαδικασία απομόνωσης των παρασίτων από το δείγμα (συνήθως επίπλευση - χρονοβόρο)

## Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods

A. Lass · H. Pietkiewicz · E. Modzelewska ·  
A. Dumêtre · B. Szostakowska · P. Myjak

Received: 20 June 2008 / Accepted: 29 November 2008 / Published online: 23 December 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** Infections caused by *Toxoplasma gondii* are prevalent in humans and animals throughout the world. So far, there is no sufficient information concerning *T. gondii* oocysts prevalence in the environment, especially in soil. Therefore, the aim of this study was to estimate occurrence of *T. gondii* oocysts in soil and determine the genotype of detected parasites. A total of 101 soil samples were taken from different sites (sand-pits, “farming ground”, areas around rubbish dumps) located in the Tri-City (Poland). Oocysts were recovered using the flotation method. Then, PCR reactions targeting the B1 gene were performed for specific *T. gondii* detection. The positive samples were further confirmed by PCR amplification of a repetitive element (REP) sequence [GenBank accession number AF146527]. *Toxoplasma* DNA was found in 18 samples. Among them, seven samples were successfully genotyped at the SAG2 locus. They were classified as SAG2 type I (5 samples) and SAG2 type II (2 samples). This is one of the first investigations describing *T. gondii* oocyst detection in environmental soil samples with rapid molecular detection methods and genotyping. The results of our findings showed that soil contaminated with *T. gondii*

oocysts may play a role in the epidemiology of human toxoplasmosis in Poland.

### Introduction

*Toxoplasma gondii* is a widely distributed protozoan parasite that is able to infect humans as well as all warm-blooded animals. It causes toxoplasmosis—one of the most prevalent parasitic infections in humans. According to the serological investigations, it is estimated that about 30% of the human population are infected with this parasite [30, 33, 43].

Toxoplasmosis is generally asymptomatic in immunocompetent individuals. However, infection may take a severe course up to life-threatening conditions in immunocompromised patients, i.e. with AIDS or pharmacologically immunosuppressed [25, 28]. An especially significant problem is congenital toxoplasmosis that can be dangerous for foetus and infants if the mother suffers from primary infection during pregnancy [5, 44].

People may be infected with *T. gondii* mainly by consumption of raw and undercooked meat or by ingestion of oocysts that may be present in the environment (water, soil, fruits, and vegetables) contaminated with the faeces of infected cats, the only definitive hosts of the parasite [12, 14, 19]. Therefore, cats play a significant role in the epidemiology of toxoplasmosis. Oocysts are resistant to unfavourable environmental conditions and chemical inactivation. They are still infective in water for up to 54 months and in soil for more than 1 year [16, 20, 21]. Thus, basic environmental matrices like water and soil may be important sources of human contamination by *Toxoplasma* oocysts [3, 6, 24].

A few outbreaks of toxoplasmosis have been reported worldwide, where the direct source of *T. gondii* infection in

A. Lass · H. Pietkiewicz (✉) · E. Modzelewska ·  
B. Szostakowska · P. Myjak  
Department of Tropical Parasitology,  
Interfaculty Institute of Maritime and Tropical Medicine  
in Gdynia, Medical University of Gdańsk,  
Gdynia, Poland  
e-mail: hpict@umg.gda.pl

A. Dumêtre  
UMR-MD3 Relations Hôte-Parasite,  
Pharmacologie et Thérapeutique, Faculté de Pharmacie,  
27 Bd Jean Moulin,  
13385 Marseille Cedex 05, France

This is one of the **first investigations** describing *T. gondii* oocyst detection in **environmental soil samples** with rapid **molecular detection** methods and genotyping. The results of our findings showed that soil contaminated with *T. gondii* oocysts **may play a role in the epidemiology** of human toxoplasmosis in Poland.

## *Αναστολή της PCR*

Μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε είδος δείγματος  
Στα δείγματα του περιβάλλοντος όμως είναι σημαντικά  
συχνότερο το φαινόμενο

Δεν υπάρχει κάποια λύση που να μπορεί να  
εφαρμοστεί καθολικά, και από ότι φαίνεται δεν υπάρχει  
και δυνατότητα πρόβλεψης, από το είδος του  
δείγματος

# Λύσεις

Προσθήκη BSA στην αντίδραση ή άλλων ειδικών ουσιών

Έλεγχος του δείγματος για αναστολή

LAMP?



56

F. Du et al. / Veterinary Parasitology 187 (2012) 53–56

**Table 1**

Positive rate of *T. gondii* oocysts in the soil of pig farms exposed to high and low cat density.

Frequency of exposure to cat	No. of samples	PCR positive (%)	LAMP positive (%)
High	50	15 (30.0%)	26 (52.0%)
Low	45	5 (11.1%)	10 (22.2%)
Total	95	20 (21.1%)	36 (37.9%)

# Ψευδώς θετικά

Λόγω της παρουσίας γενετικού υλικού από πολλούς άγνωστους ή μερικώς χαρακτηρισμένους οργανισμούς, είναι πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα

PCR-blastocystis σε δείγματα νερού → Ψευδώς θετικά

## Ψευδώς θετικά

Σε δείγματα περιβάλλοντος είναι σημαντικό να επιβεβαιώνονται τα θετικά δείγματα (πως;)

Το πρόβλημα είναι μειωμένο σε εφαρμογές qPCR και LAMP(;)

## Προσδιορισμός είδους

Το μεγαλύτερο ίσως όφελος από την εφαρμογή μοριακών μεθόδων σε δείγματα περιβάλλοντος, είναι ότι μπορεί να προσδιοριστεί το είδος και έτσι να εκτιμηθεί και η σημασία για την Δημόσια Υγεία

[Διαφορετική οπτική:

παράσιτο σε κλινικό δείγμα = παθογόνο

παράσιτο στο περιβάλλον παθογόνο?]

## The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR

Anna Lass<sup>1</sup> · Beata Szostakowska<sup>1</sup> · Przemysław Myjak<sup>1</sup> · Krzysztof Korzeniewski<sup>2</sup>

Received: 13 May 2015 / Accepted: 16 July 2015 / Published online: 25 July 2015  
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** The aim of this study was to estimate the presence of *Echinococcus multilocularis* DNA in fruits, vegetables, and mushrooms in rural areas of Varmia-Masuria Province, Poland, which is the region with the **highest number** of human alveolar echinococcosis (AE) cases in this country. Recovery tests showed that *E. multilocularis* DNA is **detectable** in samples contaminated with **at least 100 eggs** of this tapeworm. In total, 103 environmental fruit, vegetable, and mushroom samples collected in forests, plantations, and kitchen gardens were analyzed using nested PCR assay based on the mitochondrial 12S **ribosomal RNA** (rRNA) gene. The parasite DNA was detected in 23.3 % of the samples. **Sequencing confirmed that the obtained PCR products represented *E. multilocularis*.** This study is the first environmental survey of the presence of *E. multilocularis* DNA in fruits, vegetables, and mushrooms intended for consumption. The results clearly demonstrate that it may be a direct source of human infections and shows the need to educate the public about the threat, especially people living in at-risk areas.

**Abstract** The aim of this study was to estimate the presence of *Echinococcus multilocularis* DNA in fruits, vegetables, and mushrooms in rural areas of Varmia-Masuria Province, Poland, which is the region with the highest number of human alveolar echinococcosis (AE) cases in this country. Recovery tests showed that *E. multilocularis* DNA is detectable in samples contaminated with at least 100 eggs of this tapeworm. In total, 103 environmental fruit, vegetable, and mushroom samples collected in forests, plantations, and kitchen gardens were analyzed using nested PCR assay based on the mitochondrial 12S ribosomal RNA (rRNA) gene. The parasite DNA was detected in 23.3 % of the samples. Sequencing confirmed that the obtained PCR products represented *E. multilocularis*. This study is the first environmental survey of the presence of *E. multilocularis* DNA in fruits, vegetables, and mushrooms intended for consumption. The results clearly demonstrate that it may be a direct source of human infections and shows the need to educate the public about the threat, especially people living in at-risk areas.

**Keywords** *Echinococcus multilocularis* · Eggs · Environment · PCR · Fruits · Vegetables · Mushrooms

✉ Anna Lass  
anna.lass@umg.edu.pl

Department of Tropical Parasitology, Institute of Maritime and Tropical Medicine in Gdynia, Medical University of Gdańsk, 9b Powoźnia Szyornikowskiego Str., 81-519 Gdynia, Poland

Epidemiology and Tropical Medicine Department in Gdynia, Military Institute of Medicine in Warsaw, Grodzkiego St. 4, 81-105 Gdynia, Poland

### Introduction

*Echinococcus multilocularis* is a cestode species of the genus *Echinococcus* and may cause alveolar echinococcosis (AE) being one of the most dangerous parasitic zoonosis with a high fatality rate reaching 50–70 %. The causative agent of the disease is the larval stage of the tapeworm which develops mainly in the liver and is characterized by numerous tumor-like vesicles that invade and destroy surrounding tissue. In some cases, metacestodes may spread from the liver to different organs, i.e., lungs, brain, or bones. The incubation time of the disease can vary between less than 5 and up to 15 years, and the initial phase is always asymptomatic (Arman and Lekerl 1996). The number of AE cases is increasing worldwide. The annual morbidity rate in Europe equals from 0.02 to 1.4 cases per 100,000 inhabitants but may rise up to 11–40 cases in highly endemic areas.

In Poland, alveococcosis, known for single casuistic cases up to the 1970s, has shown an increasing morbidity and mortality rate since 1990. Nowadays, Poland is the fourth European country to have a number of AE cases higher than 120 (according to data recorded until 2011) (Głuszczyk and Kalczak 1966; Wesolowski et al. 1970; Kern et al. 2003; Nabojski et al. 2013).

Transmission of *E. multilocularis* occurs predominantly during the sylvatic cycle. Definitive hosts are some carnivores: mainly foxes but also other wild canids (coyotes, raccoon dogs, wolves) or wild felids. However, in some areas, also domestic dogs or cats may play a role as a part of synanthropic cycle. Many species of small mammals may serve as intermediate hosts for *E. multilocularis* although the most important are small rodents belonging to the family Arvicolinae and Cricetidae. Humans belong to aberrant (nonspecific) hosts of the tapeworm (Thiess et al. 2001; Maehnicka-Rawińska et al. 2002; Romig 2003; Lekerl and Deplazes 2004).

# *Ανίχνευση ζώντων παρασίτων*

Θετικό δείγμα  $\neq$  μολυσματικό δείγμα

Η επιβεβαίωση της μολυσματικότητας με τις κλασσικές μεθόδους είναι συνήθως χρονοβόρα και επίπονη

# *Ανίχνευση ζώντων παρασίτων*

Το RNA είναι ένα πολύ ασταθέστερο μόριο σε σχέση με το DNA

Η RT-PCR έχει χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση RNA και συνακόλουθη ένδειξη της βιωσιμότητας των παρασίτων, σε δείγματα περιβάλλοντος

# Ανίχνευση *Cryptosporidium*

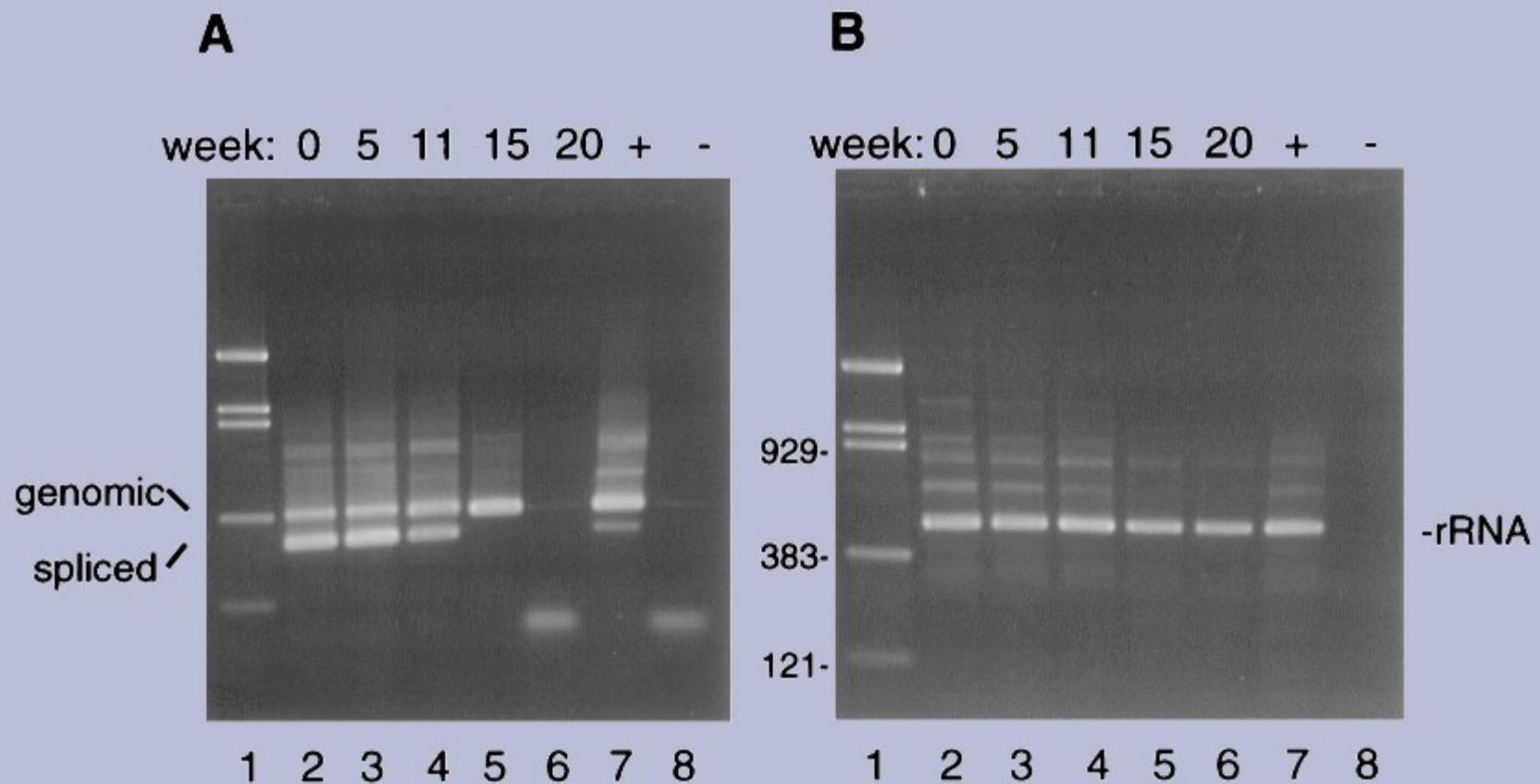


FIG. 1. RT-PCR detection of RNA in oocysts aged at room temperature for 20 weeks. (A) mRNA and genomic DNA amplification using the  $\beta$ -tubulin primers btub3 and btub6. The size difference between the genomic (366-bp) and the spliced (mRNA; 282-bp) product is due to the presence of an 84-bp intron. Notice the decay of the mRNA signal starting at week 11 and the disappearance of the DNA signal at week 20 (lane 6). A trace of PCR product is visible in the negative control (lane 8). (B) RT-PCR amplification of SSU rRNA showing no time-dependent decay of this transcript. Lanes 1, pBR/*Bst*/NI DNA ladder, with sizes of relevant bands (in base pairs) shown left of panel B; lanes 7, positive PCR control; lanes 8, negative PCR control.

# Ανίχνευση *Giardia*

Με στόχο το mRNA της HSP70

Heat the sample at 42°C for 15 min  
(To induce hsp 70 mRNA expression)

Freeze & thaw (5 times)

Isolate mRNA by magnetic beads

Heat 10µl of the sample with buffer,  
dNTPs & MgCl<sub>2</sub>, 99°C for 3 min

reverse transcription reaction  
(using random primers)

25°C 10min  
44°C 45min  
99°C 5min  
4°C -

PCR amplification  
(Giardia specific primers)

94°C 45sec  
55°C 30sec  
72°C 45sec  
30 cycles

Ethidium Bromide staining

Detection of viable *Giardia* cysts by amplification of heat shock-induced mRNA.  
Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Pepper IL.  
Appl Environ Microbiol. 1997 Jan;63(1):324-8

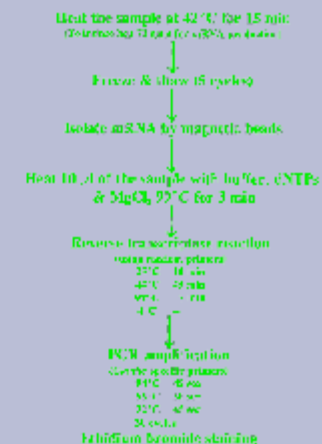
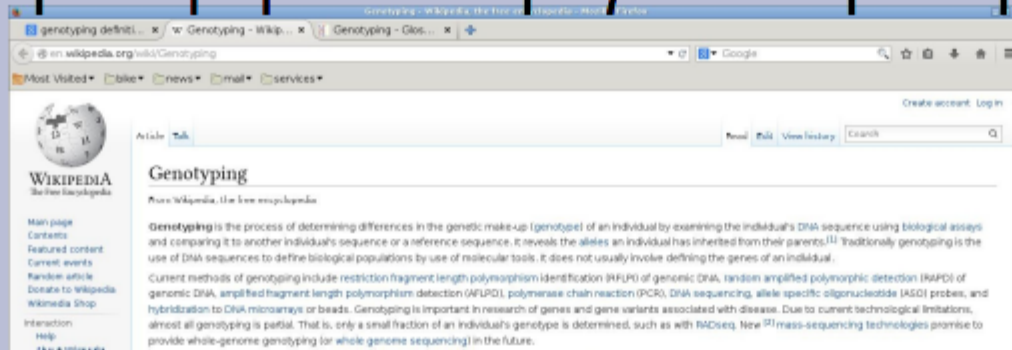


FIG. 1. Protocol for the detection of viable *Giardia* cysts in water by RT-PCR.

Παρόλη την αναμφισβήτητη πρόοδο των μοριακών μεθόδων, τα ευρήματα θα πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά λόγω των προβλημάτων που υπάρχουν με δείγματα περιβάλλοντος και της έλλειψης καθιερωμένων πρωτοκόλων

## Γονοτύπηση ή γονοτυποποίηση

- Η εντόπιση διαφορών στην γενετική πληροφορία



- Ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων αλληλομόρφων που έχει κληρονομήσει ένας οργανισμός



Ανίχνευση και χαρακτηρισμός της γενετικής ποικιλομορφίας

# Γονοτύπηση

Ο απλοποιημένος κανόνας είναι:

Οργανισμοί που έχουν τις λιγότερες διαφορές μεταξύ τους έχουν πιο πρόσφατο κοινό πρόγονο

Η διαφορά στην γενετική ποικιλομορφία μετράται από τις “τιμές” των γενετικών δεικτών (ή αλληλομόρφων)

