



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΧΑΤΖΗΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΟΥ ΕΙΡΗΝΗ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

Στη γιαγιά μου, Μαρία...

Διερεύνηση γενετικών βιοδεικτών που σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση του ξενιστή και την εξέλιξη της ασθένειας στη λείσμανίαση του σκύλου

Exploring canine genetic biomarkers associated with resistance to leishmaniasis

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στα Εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ).

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, την άριστη συνεργασία, το ειλικρινές ενδιαφέρον και την άμεση ανταπόκρισή του, οποτεδήποτε προέκυπτε κάποιο πρόβλημα κατά την εκπόνηση της διπλωματικής. Η κατανόηση και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε ήταν η κινητήριος δύναμη της προσπάθειάς μου.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω, επίσης, στην Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Σαραφίδου Θεολογία για τις επιστημονικές συμβουλές της και για τη διαρκή συμπαράστασή της καθόλη τη διάρκεια της μελέτης. Οι παρατηρήσεις της, καθώς και οι πολύωρες συζητήσεις μας αποτέλεσαν βασικά ερεθίσματα που με βοήθησαν να σχεδιάσω, να οργανώσω και να αναπτύξω την παρούσα εργασία.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Γιακουντή Αντώνιο για τις εποικοδομητικές του υποδείξεις και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Ακόμη, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους υποψήφιους διδάκτορες Σπανομήτρου Αντωνία, Κατσιαμάνη Λευκοθέα και Ράλλη Δημήτριο του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και την υποψήφια διδάκτορα Καλεμκερίδου Μαρία του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ), καθώς και όλα τα μέλη των παραπάνω εργαστηρίων για τη συνεχή υποστήριξη και βοήθειά τους, καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερω τους συναδέλφους κτηνιάτρους της Κλινικής Στρατιωτικών Σκύλων του Κέντρου Εκπαίδευσης και Νοσηλείας Κτηνιατρικού (KENOK) και τον Διοικητή του κ. Χονδροδίνη Χρήστο για την πρόθυμη συμμετοχή τους στη συλλογή των δειγμάτων.

Σε αυτό το σημείο επιθυμώ να ευχαριστήσω βαθιά την οικογένειά μου. Το σύζυγό μου Μάριο για την άμετρη συμπαράσταση, βοήθεια και κατανόηση που έδειξε καθόλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου και τον υιό μου Παναγιώτη που ήρθε στη ζωή μου και μου προσέφερε το πολύτιμο δώρο της μητρότητας. Τους γονείς μου Κυριακό και Γεωργία και του παππούδες μου Θανάση και Μαρία οι οποίοι υπήρξαν πάντα ένα ανεκτίμητο στήριγμα για εμένα και στους οποίους οφείλω όλη τη διαδρομή των σπουδών μου μέχρι σήμερα. Τέλος, ευχαριστώ την αδερφή μου, Μαρία, για τη συνεχή βοήθεια και συμπαράσταση που μου παρέχει όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Η λεισμανίαση του σκύλου είναι ένα πολυσυστηματικό, χρόνια εξελισσόμενο νόσημα, το οποίο προκαλείται από πρωτόζωα του γένους *Leishmania* spp. Η Ελλάδα θεωρείται ενδημική περιοχή, ο επιπολασμός στους πληθυσμούς των σκύλων είναι σημαντικός, και η πρόγνωση πολλές φορές δυσμενής. Πλήθος μελετών έχουν υποδείξει την επίδραση της ανοσολογικής αντίδρασης του ξενιστή στην εμφάνιση και σοβαρότητα των συμπτωμάτων καθώς και στην τελική εξέλιξη της νόσου. Επιπρόσθετα έχουν γίνει μελέτες για τη συσχέτιση της ανοσοαπόκρισης αυτής με γενετικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), με σκοπό την καθιέρωσή τους ως γενετικούς βιοδείκτες. Στο πλαίσιο αυτό, για την παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήθηκαν σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα και επιλέχθηκαν ορισμένα SNPs του γονιδιώματος του σκύλου, τα οποία φαίνεται να σχετίζονται με τον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης και της συνεπακόλουθης εξέλιξης της ασθένειας σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από τη *L. infantum*. Η παρουσία των πολυμορφισμών αυτών μελετήθηκε σε γενετικό υλικό 36 στρατιωτικών σκύλων εργασίας των φυλών Malinois και German Shepherd. Το δείγμα χωρίστηκε σε δύο ομάδες με βάση την παρουσία ή απουσία αντισωμάτων έναντι της *L. infantum* στον ορό του αίματος. Ο μοριακός έλεγχος υλοποιήθηκε με ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM-analysis) για την παρουσία οχτώ (8) υποψήφιων SNPs, με τη χρήση ισάριθμων ζευγών εκκινητών. Τα αποτελέσματα των δοκιμών ήταν ποικίλα και πολλές αντιδράσεις επηρεάστηκαν δυσμενώς από συσχετιζόμενους με την ποιότητα των δειγμάτων παράγοντες, των εκκινητών και τις εκάστοτε εφαρμοζόμενες συνθήκες. Τα δεδομένα της ανάλυσης που αξιολογήθηκαν επαρκώς αφορούσαν δυο ζεύγη εκκινητών. Στα αποτελέσματα της ανάλυσης HRM για το SNP rs24210895 φάνηκε πως κάποια από τα δείγματα του μάρτυρα ομαδοποιούνται με κάποια από το test group και συνεπώς δεν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση του γονοτύπου για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό μεταξύ θετικών και αρνητικών ζώων στο δείγμα που εξετάστηκε. Αντίστοιχα, για το SNP rs22529878 παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ κάποιων δειγμάτων, όμως στην αλληλούχηση κατά Sanger που ακολούθησε για επιβεβαίωση, δεν εντοπίστηκε πολυμορφισμός στη θέση στόχο. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος του δείγματος και το χαμηλό ποσοστό εμπιστοσύνης της αλληλούχησης στη θέση που εντοπίζεται ο πολυμορφισμός δεν επιτρέπουν την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει τη χρησιμότητα της ανάλυσης HRM, ως μία γρήγορη, αξιόπιστη και οικονομική μέθοδο για τη μελέτη των SNPs. Επίσης, προκύπτουν ορισμένες ενδείξεις για την απουσία συσχέτισης συγκεκριμένων πολυμορφισμών με την έκβαση της μόλυνσης από *L. infantum*. Συγχρόνως, καταδεικνύονται οι ανάγκες επανασχεδιασμού ορισμένων παραμέτρων του πειράματος και μελέτης δείγματος μεγαλύτερου μεγέθους, με στόχο την αντιμετώπιση των δυσχερειών που προέκυψαν και τη λήψη στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων.

Λέξεις-κλειδιά: Λεισμανίαση του σκύλου, ανοσοαπόκριση, γενετικοί βιοδείκτες, μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), Ανάλυση Καμπυλών Τήξης Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRM)

Abstract

Canine visceral leishmaniasis is a multisystemic, chronically developing disease, caused by an intracellular parasite of the genus *Leishmania* spp. Greece is considered an endemic region where the prevalence in dog populations is significant and the prognosis is often poor. Numerous studies have indicated the influence of the host's immune response on the onset and severity of symptoms as well as on the final course of the disease. Furthermore, sufficient research has been carried out about the correlation of this immune response with genetic factors, including Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), aiming to establish them as genetic biomarkers. In reference to the aforementioned facts, for the accomplishment of this thesis, relevant literature data have been searched and some specific SNPs of the canine genome have been selected, according to their possible association with the type of immune response and the consequent progression of the disease in dogs infected with the parasite *L. infantum*. The presence of these SNPs was investigated in the genome of 36 military working dogs of the Malinois and German Shepherd breeds. The samples were divided into two groups, based on the presence or absence of anti-*L. infantum* antibodies in blood serum. Molecular screening was implemented by high-resolution melt analysis (HRM-analysis) regarding eight (8) SNPs, using the same number of primer pairs. The results were diverse and many assays were adversely affected by factors related to the quality of samples, the primers and the applied conditions. Data available for evaluation involved two SNPs. The results of the HRM analysis for SNP rs24210895 indicated that some of the control samples were grouped with some of the test samples and therefore there is no clear differentiation of the genotype regarding this specific polymorphism. Accordingly, SNP rs22529878 presented a variation between specific samples, but the examined polymorphism was not detected during the subsequent Sanger sequencing. However, the small sample size and the low confidence level of sequencing at the location of the polymorphism, did not allow reliable results to be drawn. In conclusion, the present study confirms the utility of HRM analysis, as a highly sensitive, simple and low-cost method for SNP detection. Moreover, it provides some evidence for the lack of association of specific canine SNPs with the outcome of *L. infantum* infection. Simultaneously, the necessity of redesigning certain parameters of the experiment and including a larger sample size are demonstrated, to deal with the difficulties that arose and obtain statistically significant results.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, Immune Response, Genetic Biomarkers, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), High Resolution Melt Analysis (HRM)

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
Περιεχόμενα	7
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή – Βασικές έννοιες	9
1.1. Η λείσμανίαση του σκύλου	9
1.1.1 Το παράσιτο	9
1.1.2. Η μορφολογία του παρασίτου	9
1.1.3. Μετάδοση και κύκλος ζωής του παρασίτου.....	10
1.1.4. Επιζωοτιολογικά και επιδημιολογικά δεδομένα	12
1.1.5. Παθογένεια.....	13
1.1.6. Κλινικές εκδηλώσεις της νόσου	13
1.1.7. Εργαστηριακά ευρήματα	15
1.1.8. Διάγνωση	15
1.1.9. Κλινική σταδιοποίηση, θεραπεία και πρόγνωση της λείσμανίασης του σκύλου	16
1.1.10. Πρόληψη	16
1.2. Η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή κατά τη μόλυνση από το παράσιτο <i>L. infantum</i>	17
1.2.1. Επισκόπηση των ανοσολογικών μεταβολών που οφείλονται στη λείσμανίωση	18
1.2.2. Τα κύτταρα της μυελοειδούς κυτταρικής σειράς και ο ρόλος τους στην αντιμετώπιση της <i>L. infantum</i>	18
1.2.3. Αποκρίσεις Τ λεμφοκυττάρων οι οποίες συντελούν στον έλεγχο της μόλυνσης από την <i>L.infantum</i>	19
1.2.4. Ρυθμιστικές αποκρίσεις των Τ κυττάρων κατά τη διάρκεια κλινικής νόσου	20
1.2.5. Ισορροπία μεταξύ των Τ και Β λεμφοκυττάρων	21
1.3. Μελέτη γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση στη λείσμανίαση του σκύλου - Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) και η τεχνολογία καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης (HRM analysis)	21
1.3.1. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs)	22
1.3.2. Τεχνολογία καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης (High Resolution Melt Analysis - HRM Analysis)	22
1.4. Σκοπός της εργασίας.....	24
Κεφαλαίο 2: Υλικά και Μέθοδοι.....	25
2.1. Αναζήτηση στη βιβλιογραφία για γενετικούς βιοδείκτες.....	25
2.2. Αξιολόγηση των υποψήφιων SNPs	25
2.3.. Σχεδιασμός εκκινητών (primers).....	26

2.4. Ομαδοποίηση των σκύλων και δειγματοληψία	26
2.5. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας	27
2.5.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα σκύλου.....	28
2.5.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	29
2.5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	30
2.5.4. Ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM-analysis) ...	32
2.5.5. Αλληλούχηση κατά Sanger	35
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα.....	36
3.1. Αναζήτηση στη βιβλιογραφία για γενετικούς βιοδείκτες.....	36
3.2. Αξιολόγηση των υποψήφιων SNPs	40
3.3. Σχεδιασμός εκκινητών (primers).....	41
3.4. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας	42
3.4.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα σκύλου.....	42
3.4.2. Αποτελέσματα ανάλυσης HRM.....	46
3.5. Αποτελέσματα αλληλούχησης κατά Sanger	53
Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα - Συζήτηση	56
4.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	56
4.2. Μέγεθος δείγματος και ομαδοποίηση.....	57
4.3. Μέθοδοι Απομόνωσης DNA.....	57
4.4. Ανάλυση Καμπυλών Τήξης Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRM).....	58
4.5. Μελλοντικές προοπτικές.....	60
Βιβλιογραφία.....	63
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	70
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	74

Κεφάλαιο

1

Εισαγωγή – Βασικές έννοιες

1.1. Η λεισμανίαση του σκύλου

1.1.1 Το παράσιτο

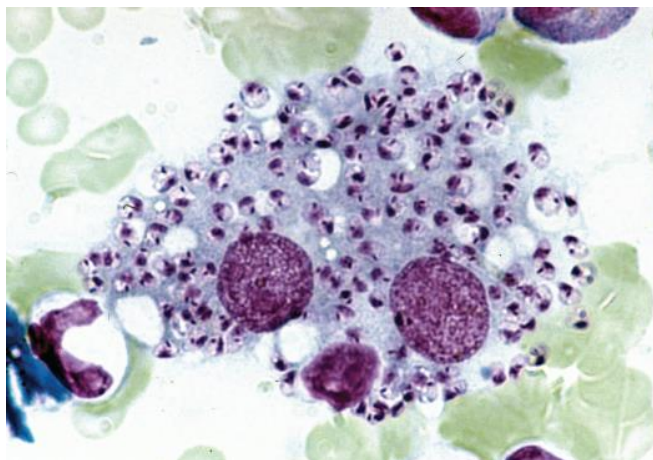
Τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* είναι ενδοκυττάρια παράσιτα που ανήκουν στην οικογένεια Trypanosomatidae του φύλου Sarcomastigophora¹. Το γένος αυτό περιλαμβάνει περίπου 30 πρωτόζωα, τα οποία αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα της λεισμανίασης των ζώων και των ανθρώπων και εμφανίζουν ευρεία γεωγραφική εξάπλωση².

Στους τελικούς ξενιστές του παράσιτου περιλαμβάνονται θηλαστικά όπως ο άνθρωπος, ο σκύλος, η γάτα, ο λύκος, η αλεπού, το τσακάλι καθώς και διάφορα είδη τρωκτικών και πτηνών. Ενδιάμεσο ξενιστή του παρασίτου αποτελούν οι θηλυκές σκνίπες του γένους *Phlebotomus*, στην Ευρώπη, Ασία και Αφρική και *Lutzomyia* στην Αμερική, οι οποίες μεταδίδουν το παράσιτο στους τελικούς ξενιστές κατά την απομύζηση του αίματος. Με βάση το μοτίβο ανάπτυξής του παρασίτου στο έντερο της σκνίπας, τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* ταξινομούνται στα υπογένη *Leishmania* (π.χ. *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*) τα οποία πολλαπλασιάζονται στο μεσέντερο (middle gut) και *Viannia* (π.χ. *L. braziliensis*, *L. peruviana*) που πολλαπλασιάζονται στο οπίσθιο έντερο (hind gut)³. Από τα παραπάνω είδη, περίπου 20 θεωρούνται παθογόνα για τον άνθρωπο^{2,4,5}, ενώ 10 έχουν απομονωθεί από σκύλους, συμπεριλαμβανομένων των *L. infantum* (*Syn. L. chagasi*), *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. arabica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana* και *L. colombiensis*.⁵⁻¹⁰ Η πιο ευρέως διαδεδομένη και καλά χαρακτηρισμένη λοίμωξη του σκύλου προκαλείται από το παράσιτο *L. infantum* που ανήκει στο σύμπλεγμα της *L. donovani*¹ και μολύνει τόσο σκύλους όσο και ανθρώπους σε χώρες της Μεσογείου, την Πορτογαλία, τη Δυτική Αφρική, τη Νότια Ασία, τη Λατινική Αμερική και τις ΗΠΑ^{6,11-13}. Πιθανολογείται πως η *L. infantum* είναι απόγονος της *L. donovani* που εμφανίστηκε στη Δυτική Αφρική², ενώ η *L. chagasi* θεωρείται το ίδιο είδος, το οποίο εισήχθη στον Νέο Κόσμο μετά την άφιξη των Ευρωπαίων αποίκων¹⁴. Η παρούσα διπλωματική εστιάζει συγκεκριμένα στο παράσιτο *L. infantum*.

1.1.2. Η μορφολογία του παρασίτου

Το παράσιτο εμφανίζεται με δυο μορφές, τη μαστιγοφόρα προμαστιγωτή μορφή με την οποία απαντάται στο έντερο της θηλυκής σκνίπας και την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή (Εικόνα 1) η οποία παρατηρείται εντός των μονοκυττάρων των σαρκοφάγων θηλαστικών. Η προμαστιγωτή μορφή είναι επιμήκης (12-25 X 1.5-3.5 μm) με πυρήνα, κινετοπλάστη, μαστίγιο (12-28 μm) και κινείται προς την κατεύθυνση του μαστίγιου. Η

αμαστιγωτή μορφή είναι ωοειδής (2-5 X 1,5-2 μm), με πυρήνα, κινετοπλάστη και ενδοκυτταρικό μαστίγιο, που βρίσκεται σε ειδική θήκη¹.



Εικόνα 1.1.: *Leishmania infantum* αμαστιγωτή μορφή σε μακροφάγο σκύλου (© Torsten Naucke)

1.1.3. Μετάδοση και κύκλος ζωής του παρασίτου

Από την ανακάλυψη της λείσμανιάσης του σκύλου στην Τυνησία, από τους Nicolle και Comte το 1908¹⁵, ο σκύλος παρουσιάζεται ως η σημαντικότερη δεξαμενή της *Leishmania spp.* στη φύση, παίζοντας το βασικότερο ρόλο στη μετάδοσή του παρασίτου¹⁶.



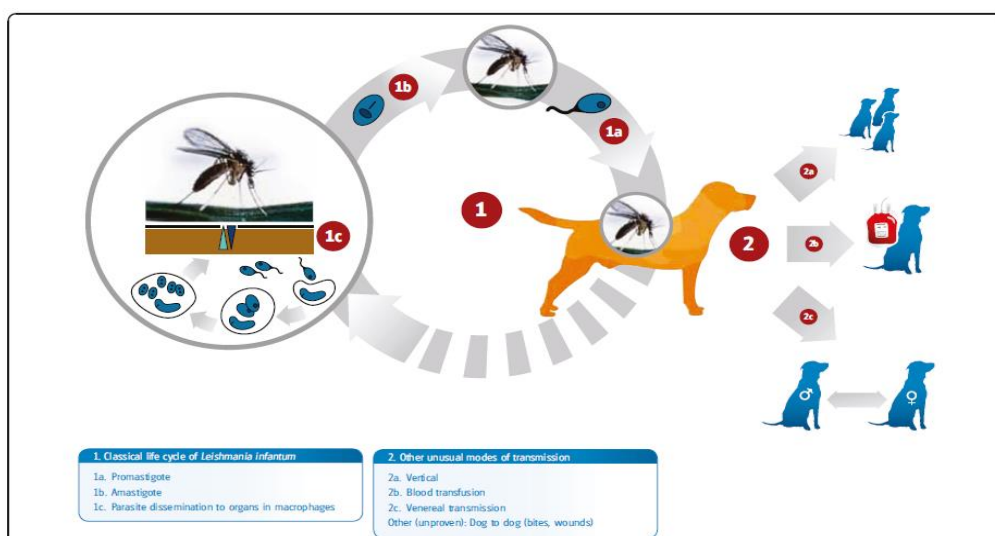
Εικόνα 1.2: *Phlebotomus papatasi*, Female © ECDC/Photographer

Μεταξύ των πάνω από 800 ειδών σκνίπας που εκτιμάται ότι υπάρχουν, περίπου 98 είδη είναι σήμερα αποδεδειγμένα φορείς της *Leishmania spp.*¹⁷. Ειδικότερα, οι σκνίπες *Phlebotomus spp.* (Εικόνα 2) είναι οι φορείς του παρασίτου σε Ευρώπη, Ασία και Αφρική, ενώ οι σκνίπες του είδους *P. perniciosus* θεωρούνται ο σημαντικότερος φορέας της *L. infantum* στην Ευρώπη (CDC). Οι ενήλικες θηλυκές σκνίπες δραστηριοποιούνται κατά τους θερμούς μήνες του έτους και κατά κύριο λόγο κατά τη διάρκεια της νύχτας.^{18,19} Η μετάδοση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της απομύζησης αίματος, όπου η σκνίπα προσεγγίζει τον ξενιστή, επιλέγοντας σημεία του σώματός του με λεπτότερες στιβάδες δέρματος, διεισδύει στην επιδερμίδα και πραγματοποιεί το νύγμα²⁰. Μέσω του αίματος μολυσμένου ξενιστή, η θηλυκή σκνίπα προσλαμβάνει την αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου η οποία βρίσκεται μέσα στα μονοκύτταρα/ μακροφάγα. Με την πέψη του μολυσμένου κυττάρου, το παράσιτο απελευθερώνεται στο πίσω τμήμα του μεσεντέρου της σκνίπας και πολλαπλασιάζεται με απλή διαίρεση και λαμβάνει την προμαστιγωτή μορφή του. Στη συνέχεια, το παράσιτο μεταναστεύει

στον οισοφάγο και στα μέρη του στόματος (φάρυγγα, cibarium και προβοσκίδα) του μολυσμένου φορέα και από εκεί μεταδίδεται στον ξενιστή κατά την απομύζηση αίματος από αυτόν.

Όταν η μολυσμένη σκνίπα εισάγει τα στοματικά της μόρια στο δέρμα και εκτελεί τις κινήσεις της αναρρόφησης αίματος, ενοφθαλμίζει στον ξενιστή την προμαστιγωτή μορφή, η οποία εισβάλλει στα κύτταρα του αίματος (μακροφάγα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα). Μέσα σε αυτά, μετατρέπεται σε αμαστιγωτή μορφή, πολλαπλασιάζεται με απλή διαίρεση (περίπου 200 παράσιτα/ κύτταρο) και προκαλεί τη ρήξη των προσβεβλημένων κυττάρων. Τα παράσιτα που απελευθερώνονται μετά τη ρήξη, προσβάλλουν εκ νέου άλλα κύτταρα και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται κάθε 12-24 ώρες¹. Στη συνέχεια, τα παράσιτα εξαπλώνονται στον οργανισμό του ξενιστή μέσω της εισβολής των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και προσβάλλουν πληθώρα οργάνων, όπως ο σπλήνας, το ήπαρ, ο μυελός των οστών, οι λεμφαδένες και άλλοι ιστοί.

Σε ενδημικές περιοχές και κάτω από ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, ένας σκύλος μπορεί να λάβει, κατά τη διάρκεια της νύχτας, περισσότερα από 100 τσιμπήματα ανά ώρα²¹ ενώ ταυτόχρονα το ποσοστό των μολυσμένων σκνιπών μπορεί να είναι μέχρι και 10,5%²². Με βάση αυτά τα στοιχεία, εκτιμάται ότι ένας σκύλος λαμβάνει περίπου ένα μολυσματικό νύγμα ανά ώρα²¹, γεγονός που επαναλαμβάνεται κάθε νύχτα, για πολλούς μήνες κάθε χρόνο. Με βάση τα παραπάνω, είναι προφανές ότι τα σκυλιά που ζουν σε ενδημικές περιοχές, ειδικά εκείνα που περνούν τη νύχτα σε εξωτερικούς χώρους, εκτίθενται συνεχώς στο παράσιτο^{23,24-26}.



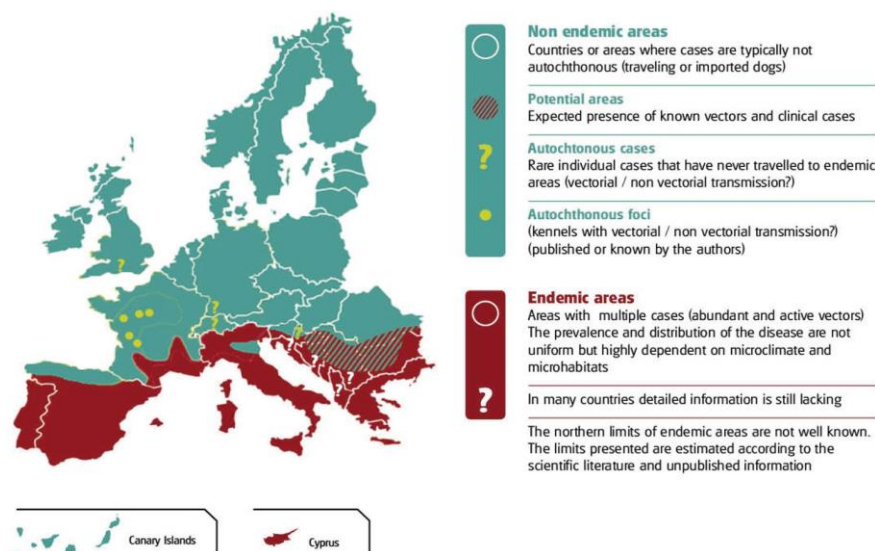
Εικόνα 1.3: Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *L. infantum* με ενδείξεις των αποδεδειγμένων και μη αποδεδειγμένων οδών μετάδοσης σε σκύλους. Solano-Gallego et al. *Parasites & Vectors* 2011

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης, οι περιπτώσεις μετάδοσης χωρίς την μεσολάβηση σκνιπών. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει σαφώς τον πιθανό αντίκτυπο μη παραδοσιακών οδών μετάδοσης, όπως είναι η σεξουαλική μετάδοση και η μετάδοση μέσω του πλακούντα (κάθετη), η οποία μπορεί να έχει επιδημιολογική σημασία στη διάδοση και τη συντήρηση της νόσου, ειδικά απουσία του εντόμου φορέα²⁹. Άλλες μορφές μετάδοσης που έχουν περιγραφεί και οφείλουν να εξετάζονται ως πιθανές σε σκύλους και ανθρώπους είναι, η μόλυνση κατά τη μεταγγίση αίματος³⁰ από μολυσμένους δότες^{31,32} καθώς και κατά τη μεταμόσχευση οργάνων^{33,34}, αλλά και κατά την κοινή χρήση μολυσμένων βελόνων³⁵. Παρά το γεγονός πως οι σκνίπες αποτελούν τον κατεξοχήν φορέα του παρασίτου, θεωρείται πιθανό η *Leishmania* να μεταδίδεται και από άλλα αιματοφάγα αρθρόποδα, όπως κρότωνες ή ψύλλους²⁷⁻²⁸. Επιπλέον, ένας

ύποπτος τρόπος μετάδοσης είναι η άμεση μετάδοση του παρασίτου μεταξύ των ξενιστών, μέσω ανοιχτών τραυμάτων και δερματικών ελκών^{36,37}.

1.1.4. Επιζωοτιολογικά και επιδημιολογικά δεδομένα

Η λεκάνη της Μεσογείου είναι μια περιοχή ενδημική για τη λείσμανίαση του σκύλου, με τη νόσο να αποτελεί ένα σημαντικό κτηνιατρικό πρόβλημα και να εγείρει ανησυχίες και για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, η κατανομή της είναι ετερογενής και δεν έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί εξίσου όλες οι χώρες³⁸.



Εικόνα 1.4: Η κατανομή της νόσου από το παράσιτο *L. infantum* στον πληθυσμό των σκύλων στην Ευρώπη, Solano-Gallego et al. *Parasites & Vectors* 2011

Στις χώρες της Νότιας Ευρώπης, ο οροθετικός επιπολασμός της λείσμανίασης του σκύλου φτάνει σε υψηλά επίπεδα και η έγκαιρη ανίχνευση των μολυσμένων ζώων θεωρείται κρίσιμη για τον έλεγχο της εξάπλωσης της νόσου. Η νόσος είναι ευρέως διαδεδομένη στην Ισπανία και μπορεί να θεωρηθεί ενδημική σχεδόν σε ολόκληρη την επικράτεια³⁹⁻⁴¹. Στην Ιταλία, βρέθηκε επιπολασμός της τάξεως του 14% κυρίως στις άκρως ενδημικές περιοχές, όπως είναι η περιοχή της Καμπανίας, ενώ στη Γαλλία υψηλότερες τιμές εντοπίζονται στις περιοχές που βρίσκονται πλησιέστερα της Μεσόγειου. Στην Πορτογαλία, ο επιπολασμός υπολογίζεται στο 6,31%, με το υψηλότερο ποσοστό να εντοπίζεται σε περιοχές στο εσωτερικό της χώρας⁴²⁻⁴⁵. Η λείσμανίαση του σκύλου είναι ενδημική και στην Ελλάδα, με τη μέση οροθετικότητα να υπολογίζεται στο 13,8% με ποσοστά που ξεπέρασαν το 50% στα βόρεια της χώρας⁴⁶. Την τελευταία δεκαετία καταγράφηκαν περιστατικά λείσμανίασης του σκύλου και στα Βαλκάνια, υποδηλώνοντας την τάση να γίνει η νόσος ενδημική και σε αυτήν την περιοχή. Η νόσος δε θεωρείται ενδημική στις περισσότερες χώρες της Ανατολικής, Κεντρικής και Βόρειας Ευρώπης^{47,48}.

Τέλος, η υπερθέρμανση του πλανήτη μπορεί να οδηγήσει σε διεύρυνση της περιοχής δράσης των φορέων³⁸, με άμεσο αποτέλεσμα τόσο την εξάπλωση όσο και την αύξηση του επιπολασμού της λείσμανίασης, ενώ συμπληρωματικά στα παραπάνω φαίνεται πως συνηγορεί και η αυξημένη μετακίνηση μολυσμένων ζώων από ενδημικές σε μη ενδημικές περιοχές.

1.1.5. Παθογένεια

Συνοπτικά η παθογόνος δράση της *L. infantum* συνίσταται α) στη διατάραξη της ομοιοστασίας (pH, ιοντικό φορτίο) του περιβάλλοντος ιστού, όταν κατά τη λύση των μολυσμένων κυττάρων απελευθερώνονται τοξικά ένζυμα και ελεύθερες ρίζες, β) στη χρόνια ενεργοποίηση των φυσικών κυτταροτοξικών κυττάρων από τις κυτταροκίνες των ενεργοποιημένων ανοσοαρμόδιων κυττάρων, γ) στην ανάπτυξη των αντιδράσεων υπερευαισθησίας και δ) στη χρόνια υψηλή συγκέντρωση ανοσοσυμπλόκων στην κυκλοφορία του αίματος και στα όργανα του σώματος⁴⁹⁻⁵⁰. Επιπλέον από τη χρόνια συγκέντρωση ανοσοσυμπλόκων στους ιστούς, προάγεται η ανοσοφαγοκυττάρωση, η καταστροφή των κυττάρων του ξενιστή και η παραγωγή αυτοαντισωμάτων, ενώ η συνεχής απαίτηση του παρασίτου για συγκεκριμένα στοιχεία, όπως η τρυπτοφάνη, είναι πιθανό να προκαλέσει αντίστοιχη ανεπάρκεια στον ξενιστή.¹

Η λείσμανίαση του σκύλου αποτελεί ένα νόσημα στο οποίο υπάρχει εμπλοκή πολλών και διαφορετικών ιστών και οργάνων του σώματος μέσω κοκκιωματώδους φλεγμονής ή ανοσοδιαμεσολαβούμενων μηχανισμών (όπως είναι η παρουσία αυτοαντισωμάτων και η εναπόθεση ανοσοσυμπλόκου) ενώ δεν αποκλείεται η συνύπαρξη των δυο παραπάνω⁵¹⁻⁵². Η κοκκιωματώδης φλεγμονή που παρατηρείται στην λείσμανίαση του σκύλου, χαρακτηρίζεται από διήθηση και πολλαπλασιασμό μακροφάγων, ιστιοκυττάρων, λεμφοκυττάρων, κυττάρων πλάσματος και μερικές φορές ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων και φαίνεται πως αποτελεί σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα των παθολογικών ευρημάτων στους βλεννογόνους, τους λεμφαδένες, τον μυελό των οστών, το σπλήνα, το ήπαρ, το έντερο, τα οστά και το γενετικό σύστημα των αρρένων^{51,53-65}. Από την άλλη πλευρά, οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα σε ασθενείς με λείσμανίαση, φαίνεται πως είναι οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες των παθολογικών ευρημάτων στους νεφρούς⁶⁶. Τέλος, οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο δέρμα, τους μυς, τις αρθρώσεις και τις οφθαλμικές βλάβες φαίνεται πως αποτελούν αποτέλεσμα της συνύπαρξης των δυο παραπάνω παθολογικών μηχανισμών⁶⁷⁻⁷⁰.

1.1.6. Κλινικές εκδηλώσεις της νόσου

Η λείσμανίαση του σκύλου αποτελεί ένα πολυσυστηματικό νόσημα, με χρόνια εξέλιξη, που εκδηλώνεται με ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων και κλινικών συνδρόμων. Καθένα από τα κλινικά συμπτώματα αλλά και τα εργαστηριακά ευρήματα που εμφανίζονται σε σκύλους που έχουν διαγνωστεί με λείσμανίαση αποτελεί παθολογικό αντίκτυπο της βλάβης ενός ή περισσότερων οργάνων⁷¹. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου ποικίλλουν από ασθενή σε ασθενή, καθώς παρατηρείται το φαινόμενο εμφάνισης διαφορετικών συνδυασμών αλλά και διαφορετικής έντασης των συμπτωμάτων της νόσου. Αυτός ο κλινικός πολυμορφισμός μπορεί να αποδοθεί σε ένα σύνολο παραγόντων που περιλαμβάνουν τη μολυσματική ικανότητα του παράσιτου και το μέγεθος του παρασιτικού φορτίου αλλά και το γενετικό υπόβαθρο και την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή²⁰. Είναι γεγονός, πως σε πολλές έρευνες παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ κλινικής σοβαρότητας και παρασιτικού φορτίου αλλά και μεταξύ κλινικής σοβαρότητας και συγκέντρωσης στον ορό των ειδικών αντισωμάτων έναντι της *Leishmania*⁷²⁻⁷⁴. Ακόμη, το γενετικό υπόβαθρο και η αναλογική κατάσταση του ξενιστή φαίνεται πως κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της ασθένειας, καθώς κάποιοι ασθενείς είναι σε θέση να ελέγξουν τη λοίμωξη για πολλά χρόνια, χωρίς την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων, και μερικές φορές μπορεί να οδηγηθούν ακόμη και στην αυτοϊαση. Αντιθέτως, υπάρχουν πολλά παραδείγματα ασθενών που μετά τη μόλυνση μπορεί να εμφανίσουν οξεία εξέλιξη της νόσου με βαριά

κλινική εικόνα ή ακόμη και προοδευτική εξέλιξη της νόσου, που όμως εάν δεν υιοθετηθεί σωστή διαχείριση και θεραπεία, μπορεί να αποβεί μοιραία για τον ασθενή. Συνεπώς, είναι εμφανές πως η κλινική διάγνωση της λείσμανιάσης του σκύλου είναι πολύπλοκη



Εικόνα 1.5: Διαφορετικές μορφές δερματικών αλλοιώσεων σε σκύλους που νοσούν από λείσμανίαση. A) Αποφολιδωτική περιοφθαλμική αλωπεκία και βλεφαρίτιδα. B) Ελκώδεις ρινικές βλεννογονοδερματικές βλάβες. C) Βλατιδώδεις δερματίτιδα στη βουβωνική χώρα. D) Οζώδεις κραταιόμορφες βλάβες που συνορεύουν με το ρύγχος. E) Ελκώδεις ερυθρηματώδεις βλάβες στην πελματιαία επιφάνεια του ποδιού και μεταξύ των φυμάτων. F) Ονυχογρύπωση. Solano-Gallego et al. Parasites & Vectors 2011



Εικόνα 1.6: Μερικές χαρακτηριστικές κλινικές εκδηλώσεις της λείσμανιάσης του σκύλου. A) Επίσταξη, B) Αμφοτερόπλευρη ραγοειδίτιδα και θολότητα του κερατοειδούς, C) Πυώδης επιπεφυκίτιδα και βλεφαρίτιδα, D) Αποφολιδωτική αλωπεκία στο οπίσθιο πόδι και ιγνυακή λεμφαδενομεγαλία. E) Εκδηλωμένη καχεξία και γενικευμένη αποφολιδωτική αλωπεκία. Solano-Gallego et al. Parasites &

Τα κλινικά συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν από τρεις μήνες έως αρκετά χρόνια μετά τη μόλυνση των σκύλων⁷⁵. Τα συνήθη συμπτώματα της νόσου συνοψίζονται στις εικόνες 1.5 και 1.6, με πιο κοινά τη λεμφαδενοπάθεια, τις δερματικές αλλοιώσεις, την ανορεξία και την απώλεια σωματικού βάρους. Η νεφρική νόσος πολλές φορές είναι η μόνη κλινική εκδήλωση της λείσμανιάσης του σκύλου, με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια να αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα αποτελέσματα της πορείας της νόσου και την πιο κοινή αιτία θανάτου των ασθενών σκύλων^{76, 77}.

1.1.7. Εργαστηριακά ευρήματα

Τα κυριότερα εργαστηριακά ευρήματα σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από λείσμανίαση συνοψίζονται στον Πίνακα 1 και αποτελούν συμπληρωματικό εργαλείο στη διάγνωση της νόσου, ενώ κάποια από αυτά θεωρούνται καλοί δείκτες για την πρόγνωση και τη θεραπευτική προσέγγιση της νόσου. .

Πίνακας 1:1. Εργαστηριακά ευρήματα που παρατηρούνται στη λείσμανίαση του σκύλου λόγω του παρασίτου *L. infantum*⁷⁷

Πλήρες αιμοδιάγραμμα (CBC)/ Αιμόσταση	Βιοχημικό προφίλ ορού με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
Ήπια έως μέτρια μη αναγεννητική αναιμία	Υπερπρωτεϊναιμία
Λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία: λεμφοπενία, ουδετεροφιλία, ουδετεροπενία	Υπερσφαιριναιμία (πολυκλωνική βήτα ή/και γάμμα-σφαιριναιμία)
Θρομβοκυταροπάθεια Θρομβοπενία	Υπολευκωματιναιμία Μειωμένος λόγος λευκωματίνης/ σφαιρινών (A/G)
Μειωμένη δευτερογενής αιμόσταση και ινωδόλυση	Νεφρική αζωθαιμία
	Αυξημένη δραστηριότητα ηπατικών ενζύμων
	Πρωτεϊνουρία

1.1.8. Διάγνωση

Κύριος σκοπός της διάγνωσης είναι τόσο η επιβεβαίωση της νόσου σε σκύλους με κλινικά συμπτώματα ή/και κλινικοπαθολογικά ευρήματα που συμφωνούν με τη λείσμανίαση του σκύλου, όσο και ο προσυμπτωματικός έλεγχος κλινικά υγιών σκύλων που ζουν ή ταξιδεύουν σε ή από ενδημικές περιοχές, σκύλων αιμοδοτών, σκύλων που θα χρησιμοποιηθούν ως γεννήτορες, σκύλων που εισάγονται από το εξωτερικό καθώς και σε σκύλους που πρόκειται να εμβολιαστούν για λείσμανίωση. Οι εργαστηριακές εξετάσεις, αποτελούν σημαντικό εργαλείο στα χέρια του κλινικού κτηνίατρου, καθώς προσφέρουν αιτιολογική διάγνωση είτε μέσω της επιβεβαίωσης της παρουσίας του παρασίτου *L. infantum* στον οργανισμό του ασθενούς (άμεσες εργαστηριακές δοκιμές) είτε μέσω της διερεύνησης της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή στο παράσιτο (έμμεσες εργαστηριακές δοκιμές). Η εργαστηριακή επιβεβαίωση της μόλυνσης επιτυγχάνεται με τη χρήση παρασιτολογικών, ορολογικών και μοριακών τεχνικών, καθεμιά από τις οποίες εμφανίζει αντίστοιχα οφέλη και αδυναμίες, οι οποίες και περιγράφονται στον Πίνακα ΠΑ1 του Παραρτήματος Α.

1.1.9. Κλινική σταδιοποίηση, θεραπεία και πρόγνωση της λεισμανίασης του σκύλου

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα κλινικής σταδιοποίησης της λεισμανίασης του σκύλου στην Ευρώπη είναι αυτό που προτείνεται από τη LeishVet και συμβάλλει στην καθιέρωση ακριβέστερης διάγνωσης, πρόγνωσης και θεραπείας⁷⁸ ομαδοποιώντας τα προσβεβλημένα σκυλιά ανάλογα με τη σοβαρότητα της κλινικής τους εικόνας. Η ταξινόμηση των ασθενών βασίζεται στην κλινική εξέταση, η οποία συσχετίζεται με τα επίπεδα αντισωμάτων έναντι της *L. infantum* στο αίμα και τα βιοχημικά-αιματολογικά ευρήματα, συμπεριλαμβανομένης της λεπτομερούς αξιολόγησης της νεφρικής λειτουργίας σύμφωνα με τη Διεθνή Εταιρεία Νεφρικού Ενδιαφέροντος (IRIS)⁷⁷.

Η θεραπεία της λεισμανίασης διαφοροποιείται ανάλογα με το κλινικό στάδιο στο οποίο κατατάσσεται ο κάθε ασθενής σκύλος. Στόχος της θεραπείας είναι η κλινική ίαση και η βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς, αλλά και η αποκατάσταση των εργαστηριακών διαταραχών και η μείωση του τίτλου των αντισωμάτων εναντίον της *L. infantum*. Πολλές φορές, κρίνεται σκόπιμη και η θεραπεία των ασυμπτωματικών φορέων με στόχο τη μείωση του παρασιτικού φορτίου και την αποτροπή εμφάνισης κλινικής νόσου. Η χρήση των αντιλεισμανιακών φαρμάκων οδηγεί τις περισσότερες φορές σε βελτίωση της κλινικής εικόνας του ζώου, όμως σπάνια επιτυγχάνεται η εκμηδένιση του παρασιτικού φορτίου. Συνεπώς, οι σκύλοι που υποβάλλονται σε θεραπεία οφείλουν να βρίσκονται υπό τη συνεχή παρακολούθηση του κλινικού κτηνιάτρου. Σε σκύλους που έχουν ανακάμψει πλήρως κλινικά μετά από θεραπεία, η παρακολούθηση γίνεται στο εξής κάθε 6-12 μήνες. Η κλινική σταδιοποίηση της λεισμανίασης του σκύλου και τα τρέχοντα πρωτόκολλα θεραπείας με βάση τις οδηγίες της LeishVet συνοψίζονται στον Πίνακα ΠΑ2 του Παραρτήματος Α. Στον πίνακα φαίνεται, επίσης, και η πιθανή εξέλιξη της υγείας του ζώου μετά τη θεραπεία (πρόγνωση).

1.1.10. Πρόληψη

Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος της πρόληψης, στις ενδημικές περιοχές της νόσου. Η πρόληψη αφορά τόσο στη μείωση της έκθεσης των σκύλων στα τσιμπήματα της σκνίπας, όσο και στην πρόληψη της ανάπτυξης κλινικών συμπτωμάτων σε σκύλους που αναπόφευκτα θα μολυνθούν από το παράσιτο.

Ορισμένα μέτρα που είναι χρήσιμα για την πρόληψη των τσιμπημάτων της σκνίπας είναι η αποφυγή της διαβίωσης του σκύλου σε εξωτερικούς χώρους κατά τη διάρκεια της περιόδου που τσιμπάνε οι σκνίπες, δηλαδή από το σούρουπο ως την αυγή καθώς και η αποφυγή μικροπεριβάλλοντος που είναι ευνοϊκό για τις σκνίπες, όπως σωροί από πέτρες και ξύλα, στο χώρο όπου διαβιούν οι σκύλοι^{79,80}. Κατά κύριο λόγο, όμως, η πρόληψη των τσιμπημάτων της σκνίπας περιλαμβάνει την εφαρμογή τοπικού εντομοκτόνου μακράς διάρκειας δράσης καθ' όλη την περίοδο της δραστηριότητας των σκνιπών. Η εφαρμογή των εντομοκτόνων μπορεί να γίνει είτε σε μορφή σκευασμάτων επίχυσης (spot on) είτε με τη χρήση περιλαίμιων⁷⁷.

Όμως, καθώς η χρήση των τοπικών εντομοκτόνων μειώνει τον κίνδυνο μόλυνσης αλλά δεν προλαμβάνει την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων αφού ο σκύλος προσβληθεί, στις ενδημικές περιοχές, συστήνεται να ακολουθείται μια προσέγγιση η οποία να συνδυάζει διάφορες μεθόδους πρόληψης. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει τόσο τη χρήση εντομοαπωθητικών όσο και τη διενέργεια προληπτικού εμβολιασμού κατά της λεισμανίασης του σκύλου για βέλτιστη πρόληψη τόσο κατά τη λοίμωξης όσο και της

ανάπτυξης κλινικής νόσου⁷⁷. Στην Ευρώπη είναι διαθέσιμα δύο εμβόλια τα οποία μπορούν να χορηγηθούν μόνο σε υγιείς οροαρνητικούς σκύλους ηλικίας έξι μηνών και άνω⁸¹. Δεν προλαμβάνουν τη μόλυνση αλλά την εξέλιξη της νόσου και μειώνουν την πιθανότητα ανάπτυξης κλινικών συμπτωμάτων.

Τέλος, τα τελευταία χρόνια, γίνονται έρευνες⁸² που αφορούν στην εύρεση ορισμένων γενετικών βιοδεικτών οι οποίοι φαίνεται να μπορούν να προβλέψουν εάν ο σκύλος εμφανίζει προδιάθεση στην εμφάνιση νόσου μετά τη μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum*. Η παραλλαγή αυτή, οφείλεται στη διαφοροποίηση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή κατά τη μόλυνση από το παράσιτο, η οποία όπως θα δούμε στη συνέχεια της εργασίας, φαίνεται να εξαρτάται και από γενετικούς παράγοντες. Η εύρεση αξιόπιστων βιοδεικτών και η ανίχνευσή τους στους σκύλους, είναι ένα ισχυρό εργαλείο στα χέρια του κλινικού κτηνιάτρου, καθώς μπορεί να επιλέξει το πρωτόκολλο πρόληψης με βάση την ευαισθησία που εμφανίζει κάθε ασθενής στην εκδήλωση της λείσμανιάσης. Ακόμη, σκύλοι που εμφανίζουν ευαισθησία, θα μπορούσαν δυνητικά να μην συμπεριλαμβάνονται στα προγράμματα αναπαραγωγής και να αντικαθίστανται από γεννιότερες ανθεκτικούς στη λείσμανιάση, με στόχο οι επόμενες γενιές να μην εμφανίζουν το γενετικό μοτίβο που θα τους κάνει περισσότερο επιρρεπείς στην εκδήλωση της νόσου.

1.2. Η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή κατά τη μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum*

Η ανοσοαπόκριση στη λείσμανιάση του σκύλου παίζει σημαντικό ρόλο στην κατανόηση της παθογένεσης της νόσου⁸³⁻⁸⁴. Το είδος της ανοσοαπόκρισης κάθε ασθενούς μπορεί να προκαλέσει ένα μοτίβο ανθεκτικότητας ή ευαισθησίας κατά τη διάρκεια της παρασιτικής μόλυνσης, με αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση να εκδηλώνονται διαφορετικές κλινικές μορφές της νόσου⁸⁴⁻⁸⁵.

Οι ακριβείς μηχανισμοί του ανοσοποιητικού που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα ή την ευαισθησία στη λοίμωξη και την επακόλουθη ασθένεια για τη λείσμανιάση του σκύλου δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Ωστόσο, φαίνεται ότι παράγοντες όπως η φυλή, η ανοσοκαταστολή, οι συνυπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις ή λοιμώξεις και η διατροφική κατάσταση του ζώου μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της μόλυνσης⁸⁶. Άλλοι παράγοντες που θα μπορούσαν να καθορίσουν το αποτέλεσμα της μόλυνσης περιλαμβάνουν τη μολυσματική ικανότητα των παρασίτων *L. infantum*⁸⁷, καθώς και τον τρόπο ενοφθαλμισμού των παρασίτων στον ξενιστή, αν δηλαδή η μετάδοση γίνεται μέσω του τσιμπήματος της σκνίπας ή μέσω άλλων οδών μετάδοσης.

Όλες οι φυλές σκύλων είναι δυνητικά ευπαθείς στη λοίμωξη από το παράσιτο *L. infantum*, όμως φαίνεται η πιθανότητα και το αποτέλεσμα της μόλυνσης να επηρεάζονται από παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και το ποσοστό του χρόνου που διαβιώνει το ζώο σε εξωτερικούς χώρους, ειδικά κατά τη διάρκεια της νύχτας⁸⁸⁻⁹¹. Ωστόσο, έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα ημίαιμα ζώα και οι αυτόχθονες φυλές από ενδημικές περιοχές αναπτύσσουν διάφορους βαθμούς ανθεκτικότητας στη νόσο⁹².

Ένα σημαντικό συστατικό, αυτής της γενετικής παραλλαγής φαίνεται να είναι η φύση της ανοσοαπόκρισης κατά τη μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum*⁴⁹. Για να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο οι γενετικές παραλλαγές επηρεάζουν τη φύση της ανοσοαπόκρισης, οφείλουμε αρχικά να περιγράψουμε πως αντιδρά το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή στη μόλυνση από το παράσιτο.

Ο έλεγχος κατά τη μόλυνση από το παράσιτο *Leishmania infantum* από το ανοσοποιητικό σύστημα των σκύλων, απαιτεί μια εξισορρόπηση μεταξύ φλεγμονωδών και ρυθμιστικών αποκρίσεων⁹³. Η ισορροπία που απαιτείται είναι συγκεκριμένα μεταξύ των προφλεγμονωδών Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων τύπου 1 (T_H1) CD4+, που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των παρασίτων και των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση μιας ανοσοκατασταλτικής και ρυθμιστικής απόκρισης, η οποία απαιτείται για να περιοριστεί η υπερβολική φλεγμονή, που όμως εάν κυριαρχήσει θα οδηγήσει σε εξέλιξη της νόσου⁹³. Ο τρόπος με τον οποίο συμβαίνει αυτή η ευαίσθητη αλληλεπίδραση μεταξύ των ανοσοκυττάρων στον σκύλο συνοψίζεται κυρίως στις προοδευτικές αλλαγές που παρατηρούνται στα κύτταρα της μυελοειδούς κυτταρικής σειράς (κυρίως τα μακροφάγα), τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα.

1.2.1. Επισκόπηση των ανοσολογικών μεταβολών που οφείλονται στη λεισμανίωση

Ως υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό παράσιτο το οποίο ζει μέσα σε κύτταρα της μυελοειδούς κυτταρικής σειράς (μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα), η *L. infantum* έχει μια ιδιαίτερη επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα κατά τη διάρκεια της νόσου⁹³. Η ανοσοαπόκριση παίζει κρίσιμο ρόλο στην ικανότητα του σκύλου να καταπολεμά τη νόσο και να αποτρέψει την εξέλιξη της. Τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, συγκεκριμένα, καθορίζουν την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος είτε να καταπολεμά τη λοίμωξη είτε να υποκύπτει σε αυτή. Μετά την αρχική μόλυνση, τα παράσιτα αλλάζουν μορφή και μεταβάλλονται από την προμαστιγωτή στην αμαστιγωτή μορφή τους, εντός των φαγοκυττάρων⁹⁴⁻⁹⁵. Οι αμαστιγωτες μορφές του παρασίτου έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται εντός του κυττάρου έως ότου αυτό οδηγηθεί σε λύση και τα παράσιτα απελευθερωθούν ξανά στην κυκλοφορία του αίματος, με στόχο να επαναμολύνουν άλλα κύτταρα. Εναλλακτικά, η ανάπτυξη του παρασίτου μπορεί και να περιοριστεί εντός των φαγοκυττάρων, με αποτέλεσμα να επιτευχθεί ο έλεγχος της μόλυνσης⁹⁶⁻⁹⁷.

1.2.2. Τα κύτταρα της μυελοειδούς κυτταρικής σειράς και ο ρόλος τους στην αντιμετώπιση της *L. infantum*

I. Τα ουδετερόφιλα

Τα ουδετερόφιλα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση κατά τη μόλυνση από τη *L. infantum*, ως κύτταρα πρώτης απόκρισης της φυσικής ανοσίας⁹³. Στο σκύλο, φτάνουν πρώτα στο σημείο της μόλυνσης, όπου μπορούν και φαγοκυτταρώνουν τα παράσιτα. Σε περιπτώσεις υποκλινικής νόσου, το γεγονός αυτό αποτελεί ένα μέσο εξάλειψης των παρασίτων μέσω της οξειδωτικής έκρηξης των ουδετερόφιλων (neutrophil oxidative burst)⁹⁸. Η φαγοκυττάρωση των παρασίτων από τα ουδετερόφιλα πυροδοτεί επίσης την απελευθέρωση των κυτοκινών TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όγκων α) και IFN-γ (ιντερφερόνη γ), που εκτός από το να στρατολογούν μακροφάγα στους μολυσμένους ιστούς, εμπλέκονται και στην ενεργοποίηση αυτών και στη θανάτωση των παρασίτων⁹⁹⁻¹⁰⁰.

Έχει κατά καιρούς προταθεί η άποψη, πως κατά τη διάρκεια της κλινικής νόσου, τα παράσιτα ενδέχεται να προκαλέσουν πρόωμη απόπτωση των ουδετερόφιλων⁹³. Όμως, σε χρόνιες λοιμώξεις από *Leishmania infantum*, έχει παρατηρηθεί, επίσης, το φαινόμενο τα παράσιτα να καταφέρνουν να «ξεγελάσουν» τα ουδετερόφιλα αποφεύγοντας τους μηχανισμούς άμυνας τους και να τα χρησιμοποιήσουν ώστε να πολλαπλασιαστούν μέσα τους με αργούς ρυθμούς, παρατείνοντας ταυτόχρονα και τον χρόνο ζωής των κυττάρων αυτών⁹³. Ο μηχανισμός αυτός περιγράφεται από τους

ερευνητές ως «δούρειος ίππος», καθώς το παράσιτο χρησιμοποιεί τα ουδετερόφιλα ώστε να «κρυφτεί» από τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τα αρχικά στάδια της λοίμωξης, στη συνέχεια να πολλαπλασιαστεί και εν τέλει να προκαλέσει ρήξη των κυττάρων και απελευθέρωση των παρασίτων στον εξωκυττάριο χώρο όταν οι συνθήκες είναι περισσότερο ευνοϊκές για την επιβίωσή τους¹⁰¹⁻¹⁰³.

II. Th17 κύτταρα

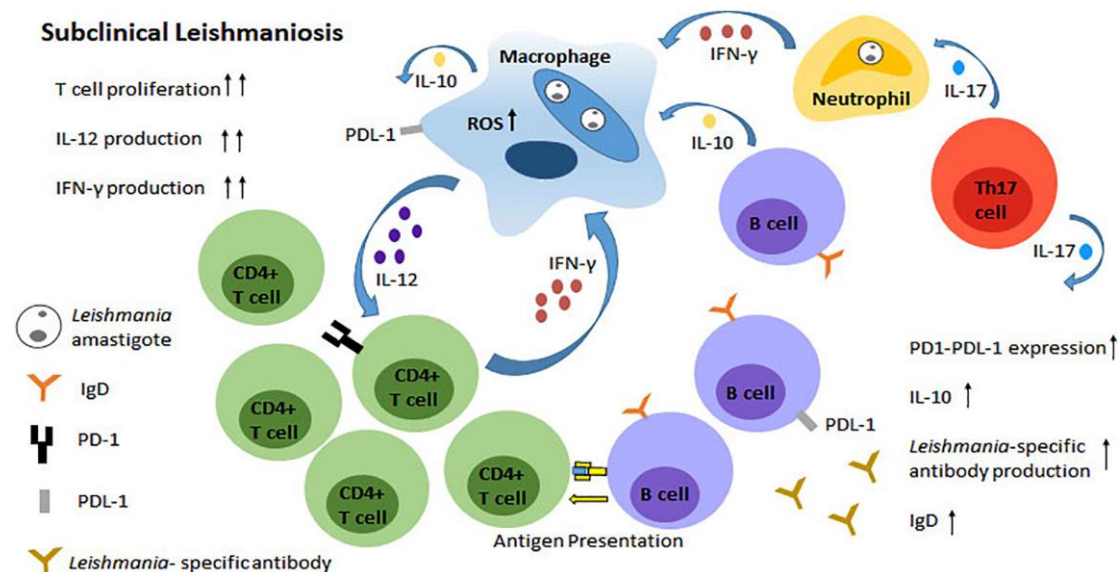
Πρόσφατα έχει αποδειχθεί πως και τα Th17 κύτταρα έχουν φλεγμονώδη ρόλο κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από τη *L. infantum*⁹³. Η ιντερλευκίνη 17 (IL-17) που απελευθερώνεται από τα κύτταρα αυτά, φαίνεται να στρατολογεί ουδετερόφιλα και μακροφάγα στη θέση της λοίμωξης¹⁰⁴. Όμως, κατά τη διάρκεια της κλινικής νόσου, η συνεχής παραγωγή της IL-17 φαίνεται να οδηγεί σε υπερστρατολόγηση ουδετερόφιλων στο σημείο της φλεγμονής¹⁰⁵, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ιστικές βλάβες, όπως συμβαίνει και στις ανθρώπινες μορφές δερματικής και βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης¹⁰⁶.

III. Τα μακροφάγα

Τα μακροφάγα είναι τα κύρια κύτταρα-ξενιστές για τη *Leishmania*⁹³. Κατά την φαγοκυττάρωση του παρασίτου, τα μακροφάγα ενεργοποιούν και απελευθερώνουν δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) για να αποτρέψουν τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό του παρασίτου¹⁰⁷. Κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης, όμως, το παράσιτο επιβιώνει εντός μιας δομής που εντοπίζεται στο φαγολυσώσωμα, του παρασιτοφόρου κενού¹⁰⁸. Εντός του παρασιτοφόρου κενού, το παράσιτο χειρίζεται τα συστήματα απόκρισης των μακροφάγων ώστε να αποφύγει την καταστροφή του από τα ROS, απορρυθμίζοντας βασικές λειτουργίες τους και κυρίως τροποποιώντας τη διαδικασία μεταγωγής μηνυμάτων^{51, 109-110}. Συγκεκριμένα, φαίνεται να επηρεάζονται οι υποδοχείς ανίχνευσης του παρασίτου, όπως για παράδειγμα οι toll-like receptors (TLR), με αποτέλεσμα να προκαλείται μείωση της παραγωγής ιντερλευκίνης 12 (IL-12). Η IL-12 είναι σημαντική για τον περιορισμό της επιβίωσης των παρασίτων εντός των κυττάρων, καθώς η παραγωγή της από τα μακροφάγα προάγει μια απόκριση τύπου T_H1¹¹¹.

1.2.3. Αποκρίσεις T λεμφοκυττάρων οι οποίες συντελούν στον έλεγχο της μόλυνσης από την *L. infantum*

Μια τυπική T_H1 απόκριση χαρακτηρίζεται από αύξηση του πολλαπλασιασμού των CD4+ T λεμφοκυττάρων και παραγωγή IFN-γ⁹³. Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση των ενδοκυττάρων παρασίτων μέσω της παραγωγής IFN-γ, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τα μακροφάγα. Παράλληλα παράγουν ιντερλευκίνη 2 (IL-2), που φαίνεται πως επάγει τον πολλαπλασιασμό περισσότερων T κυττάρων⁹³. Επιπλέον, κατά της διάρκεια μιας T_H1 απόκρισης, επάγεται και ο πολλαπλασιασμός κυτταροτοξικών CD8+ T κυττάρων, τα οποία βοηθούν στον έλεγχο της νόσου σκοτώνοντας μολυσμένα μακροφάγα¹¹¹²⁻¹¹³. Για να αποφευχθεί οποιαδήποτε ανεπιθύμητη βλάβη από αυτές τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που προαναφέρθηκαν, παράγεται μια μικρή ποσότητα ιντερλευκίνης 10 (IL-10)¹¹⁴⁻¹¹⁶, ενώ έχει επίσης αποδειχθεί ότι εμφανίζονται αυξημένα επίπεδα ιντερλευκίνης 18 (IL-18) και 6 (IL-6) στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος, οι οποίες φαίνεται να βοηθούν την IL-12 στην ενεργοποίηση των μακροφάγων¹¹⁷. Οι παραπάνω μεταβολές στα κύτταρα του ανοσοποιητικού καθώς και στο προφίλ των κυτοκινών κατά τα πρώτα στάδια της λοίμωξης συνοψίζονται στην Εικόνα 1.7.



Εικόνα 1.5: Υποκλινική λείσμανίαση. Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης τα ουδετερόφιλα φαγοκυττάρωνουν τα παράσιτα και οδηγούν σε καταστροφή τους μέσω ROS. Τα Th17 κύτταρα παράγουν IL-17. Υπάρχει αυξημένη παραγωγή IL-12 από τα μακροφάγα, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των CD4+ T κυττάρων και την παραγωγή IFN-γ, τόσο από CD4+ T κύτταρα όσο και από ουδετερόφιλα. Αυτή η προφλεγμονώδης κατάσταση έχει ως αποτέλεσμα τα ενεργοποιημένα μακροφάγα να παράγουν ROS και να αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων. Η αντιγονοπαρουσίαση, εδώ μέσω των B κυττάρων, αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων ενώ η αναγνώριση του αντιγόνου από τα B λεμφοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση ειδικών αντιλειτουργικών αντισωμάτων. Toerpp, A. J., & Petersen, C. A. (2020). Research in Veterinary Science

Εφόσον δεν ελεγχθεί αποτελεσματικά ο πολλαπλασιασμός του παρασίτου, το ανοσοποιητικό σύστημα αρχίζει να χάνει την ικανότητά του να διατηρεί αυτή τη λεπτή ισορροπία της φλεγμονώδους αντίδρασης, με αποτέλεσμα την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων^{114,118}.

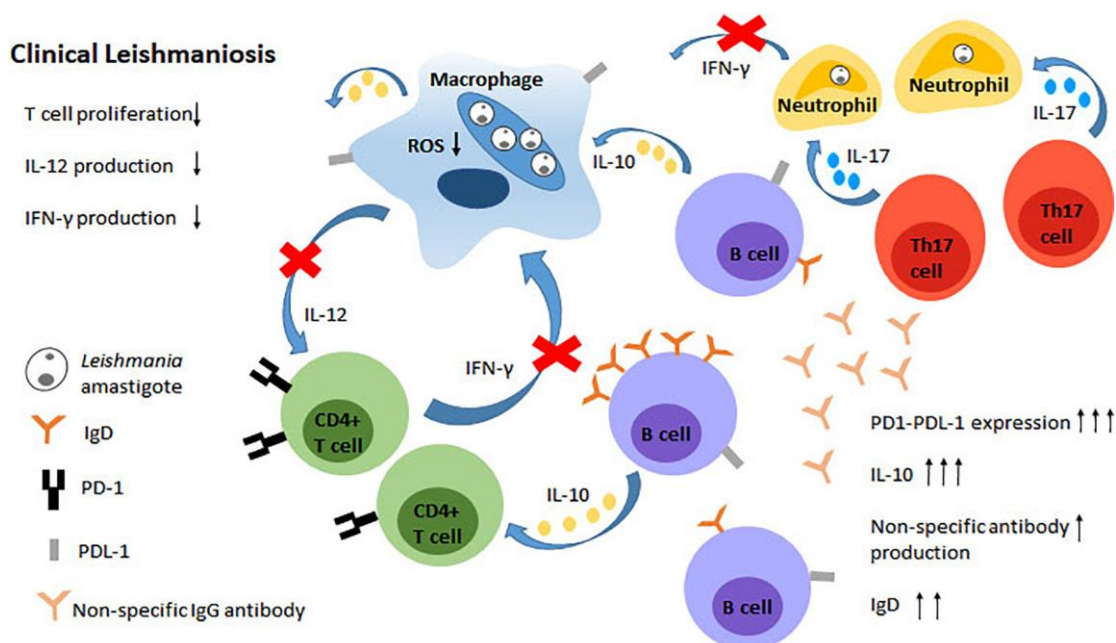
1.2.4. Ρυθμιστικές αποκρίσεις των T κυττάρων κατά τη διάρκεια κλινικής νόσου

Καθώς η νόσος εξελίσσεται, υπάρχει μια αλλαγή στην ανοσοαπόκριση, από T_H1 απόκριση σε ένα άλλο είδος ρυθμιστικής απόκρισης. Αυτή η αλλαγή ή αλλιώς η αποτυχία διατήρησης της «λεπτής ισορροπίας» όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οφείλεται σε αλλαγές στο προφίλ έκφρασης των κυτοκινών καθώς και σε παρατεταμένη έκθεση του οργανισμού στο αντιγόνο⁹³. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από μια μετάβαση σε μια πιο ρυθμιστική ανοσολογική απόκριση¹¹⁹, με αύξηση στον πολλαπλασιασμό των ρυθμιστικών T κυττάρων και των ρυθμιστικών κυτοκινών, ιδιαίτερα της IL-10. Η αυξημένη παραγωγή IL-10 οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των προφλεγμονωδών T βοηθητικών λεμφοκυττάρων τύπου 1 (T_H1) CD4+, με επακόλουθο τη μειωμένη παραγωγή IFN-γ, τη μη-ενεργοποίηση των μακροφάγων και συνεπώς τη μείωση της θανάτωσης των παρασίτων εντός των κυττάρων¹²⁰⁻¹²². Η μείωση της ανοσολογικής απόκρισης T_H1 σε συνδυασμό με τις αυξημένες χυμικές αποκρίσεις έχουν ως αποτέλεσμα την εξάντληση των T κυττάρων (T cell exhaustion) και την επιβίωση των παρασίτων (Εικόνα 1.8)⁹³. Η εξάντληση των T κυττάρων είναι μια δυσλειτουργία των T κυττάρων ως αποτέλεσμα της παρατεταμένης έκθεσης στο αντιγόνο και χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση πολλαπλών επιφανειακών υποδοχέων¹²³, όπως είναι οι PD-1 (programed death-1) και CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4). Η αλλαγή στον φαινότυπο των T κυττάρων είναι κρίσιμη για τη μετάβαση από την αρχική φλεγμονώδη ανοσολογική απόκριση, ικανή να μειώσει το παρασιτικό φορτίο του οργανισμού, σε μια ρυθμιστική κατάσταση στην οποία η ανάπτυξη των παρασίτων είναι απεριόριστη.

1.2.5. Ισορροπία μεταξύ των T και B λεμφοκυττάρων

Τα T κύτταρα και τα B κύτταρα αλληλεπιδρούν κατά τη διάρκεια της λείσμανιάσης του σκύλου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των B κυττάρων για την παραγωγή αντισωμάτων κατά της *L. infantum*, καθώς και B κυττάρων που δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) και ενεργοποιούν T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι μια άλλη ισορροπία, με τα B κύτταρα να παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο είτε στην πρόληψη της εξέλιξης της νόσου είτε στην παθολογία της νόσου και στο μη περιορισμό της ανάπτυξης των παρασίτων. Τα B κύτταρα που θα αναπτύξουν μια ρυθμιστική λειτουργία, θα οδηγήσουν σε νόσο, καθώς καταστέλλουν την ενεργοποίηση T βοηθητικών λεμφοκυττάρων και επάγουν την παραγωγή IL-10¹⁶⁴ μέσω της αυξημένης παραγωγής αντισωμάτων.

Η παραγωγή IL-10 από τα μακροφάγα δρα ως βρόχος αρνητικής ανάδρασης, που δρα στα μακροφάγα για να μειώσει την ενεργοποίησή τους και να αποτρέψει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ικανών να σκοτώσουν τα παράσιτα⁹³.



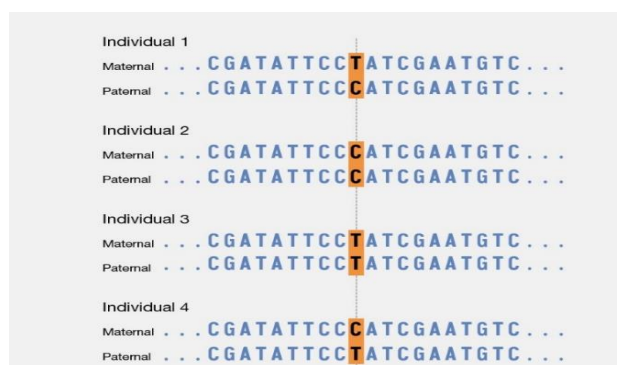
Εικόνα 1.6: Κλινική λείσμανίαση. Μετά τη παρατεταμένη επιβίωση των παρασίτων στα ουδετερόφιλα που δεν μπορούν να υποστούν απόπτωση, αυτά προάγουν απενεργοποιημένα, μολυσμένα μακροφάγα. Τα κύτταρα Th17 παράγουν IL-17 στρατολογώντας περισσότερα ουδετερόφιλα και μακροφάγα στο σημείο της μόλυνσης. Υπάρχει μειωμένη παραγωγή της IL-12 από μακροφάγα που οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των CD4+ T κυττάρων και μειωμένη παραγωγή IFN-γ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή ROS και αύξηση του πολλαπλασιασμού των παρασίτων. Η αυξημένη επιφανειακή έκφραση της IgD οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της IL-10 από B κύτταρα, αναστέλλοντας περαιτέρω την ενεργοποίηση μακροφάγων και τον πολλαπλασιασμό των T_H1 κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της κλινικής λείσμανιάσης υπάρχει αυξημένη παραγωγή μη-ειδικών αντισωμάτων IgG που οδηγεί σε δημιουργία ανοσοσυμπλόκων και παθολογικές καταστάσεις. Η χρόνια έκθεση στο αντιγόνο (*Leishmania*) οδηγεί στην εξάντληση των T κυττάρων που χαρακτηρίζεται από σημαντικά αυξημένη επιφανειακή έκφραση του υποδοχέα PD-1, ο οποίος είναι αυξημένος και στην επιφάνεια των B κυττάρων. Toerr, A. J., & Petersen, C. A. (2020). Research in Veterinary Science

1.3. Μελέτη γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση στη λείσμανίαση του σκύλου - Μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμοί (SNPs) και η τεχνολογία καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης (HRM analysis)

Η φύση της ανοσοαπόκρισης κάθε ασθενούς στη μόλυνση από το παράσιτο *L.infantum*, συνεπώς, φαίνεται πως επηρεάζει την εξέλιξη της νόσου και προσδίδει σε κάθε σκύλο ένα μοτίβο ανθεκτικότητας ή ευαισθησίας στη λείσμανίωση. Μεταξύ άλλων, έχει βρεθεί ότι γενετικοί παράγοντες έχουν αξιοσημείωτο αντίκτυπο στην ανοσολογική απόκριση κατά τη μόλυνση, με αποτέλεσμα πολλές φορές να συζητάμε για συγκεκριμένες φυλές σκύλων οι οποίες φαίνονται να είναι περισσότερο ευαίσθητες ή ανθεκτικές στη νόσο, όπως είναι οι σκύλοι της φυλής *Ibizan Hounds*⁹². Τα τελευταία χρόνια, αρκετές ερευνητικές ομάδες⁸² επιδιώκουν να βρουν ένα γενετικό μοτίβο που θα μπορούσε να προβλέψει την εξέλιξη της λείσμανιάσης σε κάθε μεμονωμένο ασθενή. Στις μελέτες αυτές περιλαμβάνονται ανοσολογικές μελέτες φυλής, συσχετισμοί σε ευρεία κλίμακα γονιδιώματος (GWAS), μελέτες γονιδιακών πολυμορφισμών (SNPs) ή απευθείας αλληλούχησης γονιδίων καθώς και προσεγγίσεις που εστιάζουν στη μελέτη των μεταγραφικών προτύπων⁸². Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εστιάζει κυρίως σε μελέτες μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs).

1.3.1. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs)

Οι πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου ή μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) είναι μια παραλλαγή της αλληλουχίας του DNA που συμβαίνει όταν υπάρχει μεταβολή σε ένα μεμονωμένο νουκλεοτίδιο στην αλληλουχία του γονιδιώματος και η συγκεκριμένη αλλαγή είναι παρούσα τουλάχιστον στο 1% του πληθυσμού¹²⁴. Για παράδειγμα ένα SNP είναι η αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου που περιέχει θυμίνη με ένα που περιέχει γουανίνη σε ένα συγκεκριμένο κομμάτι του DNA. Τα SNPs εμφανίζονται φυσιολογικά στο DNA κάθε μεμονωμένου ανθρώπου, όμως πολλά από αυτά χρησιμεύουν και ως μοριακοί βιοδείκτες διαφόρων νοσημάτων όπως είναι λόγου χάρη ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II¹²⁴. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί έχουν μελετηθεί και στη λείσμανίαση του σκύλου, ενώ οι έρευνες που μελετούν αυτούς τους πολυμορφισμούς διεξάγονται με ποικίλους τρόπους, όπως είναι η χρήση ειδικών μικροσυστοιχειών (CanineHD Whole-Genome Genotyping BeadChip® της Illumina), μέσω φασματομετρίας μάζας (Sequenom's MassARRAY®) ή με απευθείας αλληλούχηση των γονιδίων ή των γενετικών περιοχών στις οποίες εντοπίζονται (Sanger αλληλούχηση, NGS).

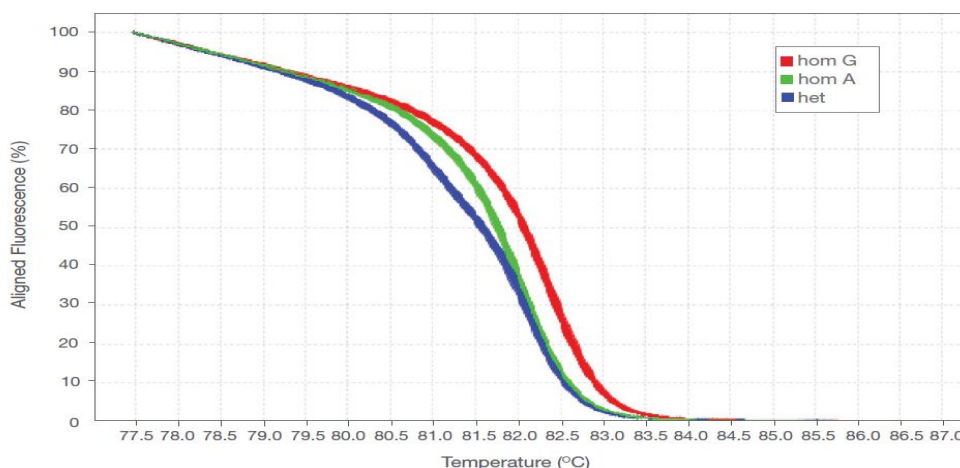


Εικόνα 1.7: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs)
πηγή: National Human Genome Research Institute

1.3.2. Τεχνολογία καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης (High Resolution Melt Analysis - HRM Analysis)

Ένας ακόμα τρόπος μελέτης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, είναι η χρήση της τεχνολογίας καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης (High Resolution Melt - HRM Analysis), που είναι μια καινοτόμος τεχνική που βασίζεται στην ανάλυση της τήξης του

DNA. Η HRM χαρακτηρίζει τα δείγματα DNA σύμφωνα με τη συμπεριφορά της διάστασής τους καθώς μεταβαίνουν από δίκλωνο DNA (dsDNA) σε μονόκλωνο DNA (ssDNA) με την αύξηση της θερμοκρασίας¹²⁶. Πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης HRM, η αλληλουχία στόχος πρέπει να ενισχυθεί σε υψηλό αριθμό αντιγράφων παρουσία μιας φθορίζουσας ουσίας που συνδέεται στο dsDNA¹²⁵. Μια τέτοια ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία είναι η EvaGreen. Η φθορίζουσα αυτή ουσία δεν αλληλεπιδρά με το ssDNA αλλά συνδέεται ενεργά με το dsDNA και φθορίζει έντονα όταν δεσμεύεται σε αυτό. Η ενίσχυση ακολουθείται από ένα στάδιο τήξης υψηλής ανάλυσης με χρήση συγκεκριμένων οργάνων (θερμοκυκλοποιητές ανίχνευσης φθορισμού και εξειδικευμένα λογισμικά) ικανών να συλλαμβάνουν μεγάλο αριθμό δεδομένων φθορισμού ανά αλλαγή θερμοκρασίας, με υψηλή ακρίβεια¹²⁶.



Εικόνα 1.8: Καμπύλη τήξης υψηλής ανάλυσης με μετάλλαξη ενός μόνο σημείου (κανονικοποιημένη). Η γραφική παράσταση δείχνει την απότομη μείωση στο φθορισμό όταν το δίκλωνο DNA διασπάται σε μονόκλωνο. Κόκκινο = ομόζυγο με γουανίνη, Πράσινο = ομόζυγο με αδενίνη, Μπλε = ετερόζυγο. Πηγή: A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis, Applied Biosystems

Ο φθορισμός, δηλαδή, μετράται συνεχώς καθώς μεταβάλλεται η θερμοκρασία και απεικονίζεται σε διάγραμμα έναντι αυτής. Στα αρχικά στάδια της HRM και καθώς έχει προηγηθεί η ενίσχυση, ο φθορισμός είναι υψηλός. Καθώς η θερμοκρασία ανεβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάλυσης και το dsDNA διασπάται σε ssDNA, η φθορίζουσα απελευθερώνεται, προκαλώντας μείωση στον φθορισμό η οποία απεικονίζεται στο αντίστοιχο διάγραμμα¹²⁶. Το αποτέλεσμα είναι μια καμπύλη τήξης η οποία είναι μοναδική για κάθε προϊόν PCR¹²⁵ (Εικόνα 1.10).

Η ανάλυση HRM παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα ως μέθοδος μελέτης πολυμορφισμών. Είναι μια ευαίσθητη, αξιόπιστη και αποδοτική τεχνική με χαμηλό κόστος σε σχέση με άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη γενετικών παραλλαγών¹⁷³⁻¹⁷⁴. Δεν απαιτεί την αγορά δαπανηρών αναλώσιμων, ούτε επιπλέον εξοπλισμού, καθώς αποτελεί ένα επιπρόσθετο στάδιο μετά την αντίδραση PCR, ενώ εκτελείται σε σύστημα «κλειστού σωλήνα», το οποίο αποτρέπει τις επιμολύνσεις. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να αναλύει ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό δειγμάτων με μεγάλη ακρίβεια και σε σύντομο χρονικό διάστημα. Με βάση όλα τα παραπάνω, διαπιστώνεται πως η ανάλυση HRM είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη, αξιόπιστη και οικονομική τεχνική για την ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με ασθένειες, ειδικά σε δείγματα με χαμηλής συχνότητας μεταλλάξεις. Σε κάθε περίπτωση όμως, πρέπει να τονιστεί πως η ανάλυση HRM δίνει μια ένδειξη για την ύπαρξη ή όχι πολυμορφισμού και πως τα θετικά αποτελέσματα πρέπει πάντα να επιβεβαιώνονται μέσω αλληλούχησης.

1.4. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν διττός. Αρχικά, στόχος ήταν να πραγματοποιηθεί βιβλιογραφική αναζήτηση γενετικών βιοδεικτών που εμφανίζουν πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης και της συνεπακόλουθης εξέλιξης της ασθένειας σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο *L. infantum*. Όπως περιεγράφηκε, η φύση της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή κατά τη μόλυνση από το παράσιτο επηρεάζει την πορεία της, καθώς μπορεί είτε να το εξοντώσει ενδοκυτταρικά συνεισφέροντας στον έλεγχο της λοίμωξης, είτε να συμβάλλει στην επικράτηση έντονων φλεγμονωδών διεργασιών που συνηγορούν στην εξέλιξη της νόσου. Επιπροσθέτως, φαίνεται πως γενετικοί παράγοντες έχουν αξιοσημείωτο αντίκτυπο στην ανοσολογική απόκριση κατά τη μόλυνση. Οι γενετικοί παράγοντες που μελετήθηκαν ως βιοδείκτες αφορούσαν σε πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (SNPs). Στο δεύτερο σκέλος, έγινε διερεύνηση της παρουσίας των παραπάνω πολυμορφισμών στο γονιδίωμα σκύλων εργασίας των φυλών Μαλινουά (Malinois) και Γερμανικών Ποιμενικών (German Shepherd). Η διερεύνηση έγινε με χρήση της ανάλυσης καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM) και στόχος ήταν να αποδειχτεί η πιθανή συσχέτιση τους με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ή ευαισθησία των σκύλων στη μόλυνση από το παράσιτο.

2.1. Βιβλιογραφική αναζήτηση γενετικών βιοδεικτών

Το πρώτο κομμάτι της διπλωματικής περιλαμβάνει τη βιβλιογραφική αναζήτηση γενετικών βιοδεικτών οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται με τον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης και την εξέλιξη της ασθένειας σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο *L. infantum*. Η ανοσοαπόκριση παίζει κρίσιμο ρόλο στην ικανότητα του σκύλου να καταπολεμά τη νόσο και να αποτρέπει την εξέλιξη της και μελέτες έχουν δείξει πως η φύση της επηρεάζει και από γενετικούς παράγοντες. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των παρασίτων εντός του οργανισμού συνεπάγεται ανεξέλεγκτες φλεγμονώδεις διεργασίες που οδηγούν σε εξέλιξη της νόσου με έντονη συμπτωματολογία και ραγδαία αύξηση των αντισωμάτων έναντι της *L. infantum*. Ενναλλακτικά, η ανάπτυξη του παρασίτου μπορεί και να περιοριστεί εντός των φαγοκυττάρων, με αποτέλεσμα να επιτευχθεί ο έλεγχος της μόλυνσης¹³¹⁻¹³². Για την αναζήτηση των γενετικών βιοδεικτών χρησιμοποιήθηκαν αρχικά δυο βάσεις δεδομένων, PubMed και Google Scholar. Οι όροι της αναζήτησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι “Susceptibility to canine visceral leishmaniasis”, “genetics canine leishmaniasis”, “genetic control of canine leishmaniasis”, “canine leishmaniasis genetic markers”, και οποιοσδήποτε συνδυασμός τους. Η αναζήτηση έλαβε χώρα μεταξύ Σεπτεμβρίου 2020 και Ιανουαρίου 2021. Αρχικά έγινε επιλογή των μελετών με βάση τον τίτλο τους και στη συνέχεια από αυτές που επιλέχθηκαν έγινε μια δεύτερη διαλογή με βάση την περίληψή τους. Ως κριτήρια επιλογής τέθηκαν τα εξής: οι μελέτες να παρουσιάζουν συσχέτιση μεταξύ γενετικών παραγόντων του σκύλου, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών πολυμορφισμών, και ανθεκτικότητας/ ευαισθησίας στη λείσμανίαση ή την ανοσολογική απόκριση στη λοίμωξη από το παράσιτο *L. infantum* ή το παρασιτικό φορτίο της *L. infantum* ή την κλινική εικόνα των σκύλων που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο. Δεν συμπεριλήφθηκαν μελέτες που αφορούσαν σε άλλους ζωικούς οργανισμούς (πχ μυοειδή) ή τον άνθρωπο, καθώς και μελέτες που αφορούσαν αποκλειστικά στη δερματική μορφή της λείσμανίασης. Η τελική επιλογή έγινε αφού διαβάστηκαν τα άρθρα στο σύνολό τους και πληρούσαν τα κριτήρια που θέσαμε παραπάνω.

2.2. Αξιολόγηση των υποψήφιων SNPs

Από την καθεμιά από τις μελέτες που επιλέξαμε όπως παραπάνω αξιολογήθηκαν αρχικά 1 με 3 SNPs. Η αρχική εκτίμηση έγινε με βάση τη συχνότητα ελαχίστου αλληλομόρφου (MAF), που είναι η συχνότητα εμφάνισης του πιο σπάνιου αλληλομόρφου σε έναν γενετικό τόπο ενός πληθυσμού, και το P_{value} που εμφάνιζαν στην εκάστοτε μελέτη και περιλάμβανε συνολικά 14 βιοδείκτες όπως αυτοί περιγράφονται στον Πίνακα 6 των αποτελεσμάτων. Καθώς κάθε ερευνητική ομάδα είχε διαφορετική κωδικοποίηση για τα SNPs τα οποία μελετούσε, εντοπίστηκε αρχικά η επίσημη ονομασία τους, η οποία υπάρχει σε βάσεις δεδομένων και ξεκινάει με rs_. Κάποιοι μελέτες περιείχαν το επίσημο όνομα των SNPs και συνεπώς ήταν εύκολη η

εύρεση πληροφοριών για αυτά, ενώ άλλες όχι. Στις μελέτες που χρησιμοποιήθηκε η μικροσυστοιχία CanineHD BeadChip της Illumina, πραγματοποιήθηκε επικοινωνία με την εταιρεία και μας παραχώρησαν το αρχείο excel το οποίο περιείχε την αντιστοιχία των κωδικών των SNPs που δίνονται από την εταιρεία και των επίσημων ονομασιών τους. Στον Πίνακα 6 των αποτελεσμάτων, φαίνεται επίσης η επίσημη ονομασία όλων των SNPs που εξετάστηκαν, όπως αυτή εντοπίστηκε μετά από την παραπάνω έρευνα, εκτός από ένα, το DLADRB1*01502 που περιεγράφηκε από τους Quinnett et al., του οποίου η αντίστοιχη ονομασία δε βρέθηκε. Εφόσον εντοπίστηκαν τα rs των SNPs, έγινε αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) και GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), στο γονιδίωμα του σκύλου (*Canis lupus familiaris*) για περαιτέρω πληροφορίες. Οι πληροφορίες που μας ενδιέφερε να ανακτήσουμε για αυτά ήταν τα αλληλόμορφα που εμφανίζουν, η αλληλουχία της γειτονικής περιοχής τους, το χρωμόσωμα που εντοπίζονται και οτιδήποτε άλλο θα μπορούσε να βοηθήσει στη μελέτη μας. Η αλληλουχία της γειτονικής περιοχής του κάθε πολυμορφισμού ήταν σημαντική καθώς απαιτείται ο σχεδιασμός εκκινητών (primers) για την ενίσχυση κάθε τμήματος πριν την ανάλυση HRM, αλλά και γιατί ήταν σημαντικό να εντοπίσουμε αν ανιχνεύεται και κάποιο άλλο SNP, σε γειτνίαση με αυτό που ψάχνουμε, γεγονός που θα περιέπλεκε το αποτέλεσμα του πειράματος.

2.3.. Σχεδιασμός εκκινητών (primers).

Αφού έγινε μια αρχική επιλογή των SNPs τα οποία θα ελεγχθούν στα πλαίσια της διπλωματικής και εντοπίστηκαν οι απαραίτητες πληροφορίες για αυτά, έγινε ο σχεδιασμός των εκκινητών για κάθε ένα από αυτά. Οι εκκινητές είναι μικρού μήκους μονόκλωνα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία οριοθετούν την περιοχή του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε με την PCR. Είναι συμπληρωματικά προς τις δυο αλυσίδες του DNA και ο ρόλος τους είναι να παρέχουν 3' ελεύθερα άκρα τα οποία αναγνωρίζει η DNA πολυμεράση ώστε να δημιουργήσει θέσεις έναρξης αντιγραφής. Αρχικά, σχεδιάστηκαν δυο ζεύγη εκκινητών (εμπρόσθιος και ανάστροφος) για κάθε υποψήφιο SNP με τη βοήθεια του εργαλείου Primer Design Tool του NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν φαίνονται στον Πίνακα 7 των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια επιλέχθηκε το καλύτερο ζεύγος εκκινητών για κάθε SNP, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, ενώ κάποια SNPs απορρίφθηκαν λόγω αδυναμίας σχεδίασης κατάλληλων εκκινητών. Οι λυοφυλιοποιημένοι εκκινητές συντέθηκαν από την εταιρία Eurofins Genomics, αναμείχθηκαν με νερό και ρυθμίστηκαν σε συγκέντρωση 50pm/μl.

2.4. Ομαδοποίηση των σκύλων και δειγματοληψία

Για το σκοπό της παρούσας διπλωματικής επιλέχθηκαν σκύλοι εργασίας των φυλών Malinois και German Shepherds της Στρατιωτικής Υπηρεσίας και την Πολεμικής Αεροπορίας που διαβιούν στην ευρύτερο γεωγραφικό διαμέρισμα της Θεσσαλίας και την περιφερειακή ενότητα της Φθιώτιδας.

Είναι εμβολιασμένοι, διαθέτουν μοναδικό αριθμό σήμανσης (microchip) και ακολουθούν συγκεκριμένο αντιπαρασιτικό πρόγραμμα, ενώ μηνιαίως γίνεται έκχυση τοπικού εντομοκτόνου μακράς δράσης με τη μορφή αμπούλας (spot-on). Ελέγχονται κλινικά μηνιαίως από κτηνίατρο στα πλαίσια μηνιαίας υγειονομικής εξέτασης, καθώς και εκτάκτως όποτε αυτό απαιτηθεί. Ετησίως, για προληπτικούς λόγους, διενεργούνται εξετάσεις αίματος οι οποίες περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων και ορολογικές δοκιμές για διάγνωση πιθανής νόσου από παράσιτα όπως *L. infantum* και *D. Immitis* αλλά και από την ρικέτσια *Ehrlichia canis*. Συνεπώς, υπάρχει συνεχής επιτήρηση της κατάστασης της υγείας τους καθώς και πλήρες ιστορικό για καθένα από τους σκύλους

αυτούς. Η κτηνιατρική περίθαλψη των σκύλων που συμμετείχαν στην έρευνα είναι ευθύνη του Κέντρου Εκπαίδευσης και Νοσηλείας Κτηνιατρικού (KENOK), το οποίο εδρεύει στη Λάρισα. Οι σκύλοι διαμένουν σε ειδικά κατασκευασμένα ευρύχωρα κελιά, με εσωτερικό και εξωτερικό χώρο, συνεπώς είναι εύκολη η είσοδος των εντόμων σε αυτά, ενώ κατά τις νυκτερινές ώρες, πολλοί από αυτούς εκτελούν περίπολα και υπηρεσίες φυλάξεως. Με βάση το ιστορικό τους, τα ζώα που επιλέχθηκαν, δεν είχαν εμφανίσει συνυπάρχουσες λοιμώξεις από *Ehrlichia canis* ή *Dirofilaria immitis*, ούτε ήταν ανοσοκατασταλμένα. Η ηλικία και το φύλο τους ποικίλλουν και φαίνονται στους Πίνακες ΠΑ3 και ΠΑ4 του Παραρτήματος.

Ο διαχωρισμός των σκύλων έγινε σε δυο ομάδες, με βάση τα αποτελέσματα των ορολογικών δοκιμών για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *L. infantum* κάθε ετήσιας εξέτασης. Οι σκύλοι που είχαν εμφανίσει θετικό τίτλο αντισωμάτων για τουλάχιστον 2 συνεχόμενες δοκιμές περιληφθήκανε στην ομάδα των οροθετικών σκύλων (Seropositive Group, Group P, Test Group) ανεξαρτήτως αν είχαν εμφανίσει συμπτώματα ή αν βρίσκονταν σε θεραπεία ενάντια της νόσου κατά τη δεδομένη χρονική στιγμή. Αντίθετα, σκύλοι που δεν είχαν εμφανίσει ποτέ θετικό τίτλο αντισωμάτων ή είχαν εμφανίσει μικρό τίτλο και θεωρήθηκαν ως ύποπτοι αλλά τελικά ήταν αρνητικοί κατά την επαναληπτική δοκιμή μετά από ένα μήνα, εντάχθηκαν στην ομάδα των οροαρνητικών σκύλων (Seronegative Group, Group N, Control Group). Οι ομάδες φαίνονται αναλυτικά στους Πίνακες ΠΑ3 και ΠΑ4 του Παραρτήματος Α.

Η δειγματοληψία έλαβε χώρα από τον Οκτώβριο του 2020 έως και τον Απρίλιο του 2021, κατά τη διάρκεια των μηνιαίων ή ετήσιων υγειονομικών επιθεωρήσεων. Από κάθε σκύλο λαμβάνονταν 10 ml αίματος από την κεφαλική φλέβα. Από αυτά, 6 ml τοποθετήθηκαν σε 2 φιαλίδια αιμοληψίας με EDTA, ώστε να αποθηκευτεί το ολικό αίμα που απαιτείται για τις τεχνικές μοριακής βιολογίας. Τα φιαλίδια αυτά κωδικοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη. Τα υπόλοιπα 4 ml τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό και φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 10 λεπτά για το διαχωρισμό του ορού του αίματος, ο οποίος φυλάχθηκε στην κατάψυξη για ορολογικές και βιοχημικές δοκιμές, σε περίπτωση που κρίνονταν απαραίτητο.

Για την παρούσα διπλωματική εργασία δεν ήταν απαραίτητη η χορήγηση έγκρισης από την αρμόδια κτηνιατρική υπηρεσία με βάση την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2010/63/ΕΕ του ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 «περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς», με το οποίο έχει προσαρμοστεί η Ελληνική Νομοθεσία με το ΠΔ 56/2013 - ΦΕΚ 106/Τεύχος Α΄/10-5-2013, που τροποποιείται από το ΠΔ 86/2020 - ΦΕΚ 199/Τεύχος Α΄/19-10-2020. Με βάση την παραπάνω νομοθεσία, δεν απαιτείται ειδική άδεια για πρακτικές που δεν ενδέχεται να προκαλέσουν πόνο, ταλαιπωρία, αγωνία ή μόνιμη βλάβη ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που προκαλεί η εισαγωγή βελόνας σύμφωνα με την ορθή κτηνιατρική πρακτική (Άρθρο 1, παρ. 5στ.ΠΔ 56/2013). Καθώς η αιμοληψία διενεργήθηκε μια φορά, από κτηνίατρο, στα πλαίσια κτηνιατρικής πρακτικής (ετήσια προληπτική εξέταση), μετά από επικοινωνία με τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής Περιφέρειας Θεσσαλίας, καθορίστηκε πως δεν είναι αναγκαία η χορήγηση άδειας, καθώς δεν επηρεάζεται η ευζωία των ζώων, με βάση τη Νομοθεσία, με τη διενέργεια της συγκεκριμένης πρακτικής.

2.5. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

Οι παρακάτω τεχνικές έλαβαν χώρα στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στα Εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ).

2.5.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα σκύλου

2.5.1.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα σκύλου με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης

Το παρακάτω πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε υπό στείρες συνθήκες αναφορικά με τους χώρους και τον χρησιμοποιούμενο εξοπλισμό. Τα βήματα που ακολουθήσαμε ήταν τα εξής:

1. Αποψύχουμε τα δείγματα ολικού αίματος που είναι αποθηκευμένα σε σωληνάκια με EDTA.
2. Σε σωληνάκι erppendorf 2ml, τοποθετούμε 1 ml δείγματος, προσθέτουμε 0,8ml 1x SSC buffer και ανακατεύουμε. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 13000 rpm.
3. Αφαιρούμε 1 ml από το υπερκείμενο και το απορρίπτουμε.
4. Προσθέτουμε εκ νέου 1ml 1x SSC buffer, ανακατεύουμε στον κυκλοποιητή(vortex), φυγοκεντρούμε όπως παραπάνω για 1 λεπτό και αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο.
5. Προσθέτουμε 500μl 0,2M CH_3COONa σε κάθε pellet και κάνουμε ένα σύντομο vortex. Στη συνέχεια προσθέτουμε 50 μl 5% SDS και 10μl proteinase K (10mg/ml), και μετά από ένα σύντομο vortex, επωάζουμε το μείγμα για μια 1 ώρα στους 55°C.
6. Προσθέτουμε 0,5ml φαινόλη and 0,5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη και αναδεύουμε ήπια για 30 δεύτερα. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 2 λεπτά στις 12000 rpm.
7. Προσεκτικά, αφαιρούμε την υδατική φάση σε ένα νέο σωληνάκι erppendorf 1,5ml, προσθέτουμε 1 ml κρύας ισοπροπανόλης και 3μl γλυκογόνου, ανακατεύουμε και επωάζουμε για 15 λεπτά στους -20°C.
8. Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 12000 rpm. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε.
9. Ξεπλένουμε με διάλυμα 70% αιθανόλης (EtOH), φυγοκεντρούμε εκ νέου για 2 λεπτά στις 12000 rpm, στεγνώνουμε καλά και επαναδιαλύουμε σε 30 μl H_2O or TE. Το DNA που απομονώσαμε μπορεί να τοποθετηθεί στην κατάψυξη ώστε να διατηρηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Μετά την παρασκευή των DNA, χρησιμοποιήσαμε το μηχάνημα Quawell Q3000 UV Spectrophotometer για να μετρήσουμε τις συγκεντρώσεις και την καθαρότητα των δειγμάτων.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA παρασκευάστηκαν ως εξής:

SSC buffer: Για την παρασκευή διαλύματος SSC buffer 20x διαλύουμε 175.3 g χλωριούχου νατρίου και 88.2 g κιτρικού νατρίου σε 800ml νερό. Ρυθμίζουμε το pH στο 7 και στη συνέχεια προσθέτουμε νερό εωςότου ο όγκος να φτάσει στο 1 L. Στη συνέχεια αποστειρώνουμε το διάλυμα. Καθώς η πειραματική διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω απαιτεί συγκέντρωση SSC 1x, αραιώνουμε αντίστοιχα με προσθήκη νερού.

10% Sodium dodecyl sulfate (SDS): Για την παρασκευή διαλύματος SDS 10%, διαλύουμε 100g electrophoresis-grade SDS σε 900ml νερό. Θερμαίνουμε στους 68° C ώστε να ενισχύσουμε τη διάλυσή του. Ρυθμίζουμε το pH στο 7. Προσθέτουμε νερό εωςότου ο όγκος να φτάσει το 1L. Καθώς η πειραματική διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω απαιτεί συγκέντρωση SDS 5%, αραιώνουμε αντίστοιχα με προσθήκη νερού.

3M Sodium Acetate (CH₃COONa, οξικό οξύ): Για την παρασκευή διαλύματος CH₃COONa 3M διαλύουμε 408.1 g οξικού οξέος σε 800ml νερό. Ρυθμίζουμε το pH στο 5,2 και στη συνέχεια προσθέτουμε νερό εωσότου ο όγκος να φτάσει στο 1 L. Στη συνέχεια αποστειρώνουμε το διάλυμα. Καθώς η πειραματική διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω απαιτεί συγκέντρωση οξικού οξέος 0,2M, αραιώνουμε αντίστοιχα με προσθήκη νερού.

Υλικά- Αντιδραστήρια

- SSC buffer: NaCl & sodium citrate
- NaCl: Sodium Chloride (USP, BP, Ph. Eur., JP) pure, pharma grade, PanReac, AppliChem, ITW Reagents
- Sodium citrate: Trisodium citrate dihydrate, 99%, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific
- CH₃COONa: Sodium Acetate trihydrate, Merck
- SDS for molecular biology, PanReac, AppliChem, ITW Reagents
- Proteinase K, Macherey-Nagel Germany
- Φαινόλη/ χλωροφόρμιο/ ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1, PanReac, AppliChem, ITW Reagents
- Αιθανόλη, J.T.Baker

2.5.1.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα σκύλου με χρήση του PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen

Η παρακάτω διαδικασία ήταν απαραίτητο και πάλι να γίνει υπό στείρες συνθήκες. Η απομόνωση του DNA με το PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) βασίζεται στην επιλεκτική σύνδεση του DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι αυτό που προτείνεται με βάση τον κατασκευαστή για απομόνωση DNA από δείγμα ολικού αίματος. Μετά το πέρας της διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Quawell Q3000 UV Spectrophotometer για την μέτρηση των συγκεντρώσεων και της καθαρότητας των δειγμάτων γονιδιωματικού DNA. Τα δείγματα DNA που έχουν απομονωθεί μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως ή να αποθηκευτούν στην κατάψυξη (- 20° C) για μακροχρόνια χρήση.

2.5.1.3. Απομόνωση DNA από γέλη αγαρόζης (gel extraction)

Η απομόνωση του DNA από το gel αγαρόζης βασίζεται στην επιλεκτική σύνδεση του DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο παρουσία χαοτροπικών αλάτων και έγινε με χρήση του kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι αυτό που προτείνεται με βάση τον κατασκευαστή για απομόνωση DNA από gel αγαρόζης. Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης, χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Quawell Q3000 UV Spectrophotometer για την μέτρηση των συγκεντρώσεων και την καθαρότητα των δειγμάτων καθαρού γονιδιωματικού DNA. Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθούν αμέσως ή να αποθηκευτούν στην κατάψυξη (- 20° C) για μακροχρόνια χρήση.

2.5.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων απομόνωσης του DNA και με τα δυο πρωτόκολλα, έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε και για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR. Η τεχνική περιγράφεται αναλυτικά στο παράρτημα Α. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA

που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε χρησιμοποιείται και διαφορετική πυκνότητα αγαρόζης. Τα μεγαλύτερα μόρια DNA απαιτούν μικρότερες συγκεντρώσεις αγαρόζης, ενώ τα μικρά διαχωρίζονται επιτυχώς στα πυκνά πηκτώματα στα οποία μπορούν και κινούνται εύκολα. Για την ηλεκτροφόρηση των γονιδιωματικών DNA που απομονώθηκαν από τα δείγματα με τις δυο μεθόδους που περιγράφηκαν παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ενώ για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (~100bp) χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα 2,5%. Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 1%, σε μια κωνική φιάλη προστίθενται 100 ml διαλύματος TBE 0,5x και 1gr αγαρόζης και το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Αφού κρυώσει λίγο προστίθενται 3μl βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA μέσω σχηματισμού δεσμών Van der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάστηκαν με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή και είναι τα ακόλουθα:

TBE (Tris/Borate/EDTA) 5X: Ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων.

EDTA (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) 0,5 M

Loading buffer 6x: Χρησιμοποιείται για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος, ενώ περιέχει και χρωστική για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.

Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

Υλικά-Αντιδραστήρια

- TBE 50x: Tris base, Borate acid, EDTA
- Loading buffer 6x: Bromophenol Blue 0,25%, Xylene Cyanol 0,25%, Γλυκερόλη 30%
- Αγαρόζη, Nippon Genetics Europe
- DNA μοριακός μάρτυρας (ladder) 100 bp, EnzyQuest
- Βρωμιούχο αιθίδιο, Merck
- Bromophenol blue (Rasch Research Organics)
- Xylene Cyanol (Merck)
- Γλυκερόλη 86-88%, Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich
- EDTA, EDTA Disodium Salt 2-hydrate (Reag. USP, Ph. Eur.) for analysis, ACS, PanReac, AppliChem, ITW Reagents
- Tris Base, ULTROL Grade, Merck
- Βορικό οξύ (Merck)

2.5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)¹²⁷⁻¹²⁸

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια απλή, ευαίσθητη και ευρέως χρησιμοποιούμενη ενζυμική δοκιμασία, η οποία επιτρέπει την απομόνωση και ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών ενός προτύπου (template) DNA από μια σύνθετη δεξαμενή DNA. Κάθε ανάλυση PCR απαιτεί την παρουσία του πρότυπου DNA (εκμαγείο, DNA template), των εκκινητών (primers), νουκλεοτιδίων (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) και μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Τα προαναφερθέντα συστατικά αναμιγνύονται σε δοκιμαστικό σωλήνα και στη συνέχεια τοποθετούνται σε μηχανή που επιτρέπει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης

του DNA σε τρία βασικά βήματα(αποδιάταξη, υβριδοποίηση, επέκταση) , τα οποία και περιγράφονται αναλυτικά στο παράρτημα Α. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος της ανίχνευσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός της ενισχυμένης αλληλουχίας εκτελούνται στο τέλος της αντίδρασης και περιλαμβάνουν περαιτέρω ανάλυση όπως ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης και ανάλυση της εικόνας που προκύπτει.

Πίνακας 2: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR και PCR υψηλής ακρίβειας

PCR		PCR υψηλής ακρίβειας	
Συστατικά	Όγκος (μl)	Συστατικά	Όγκος (μl)
Template DNA (40 mg)	2	Template DNA (30 mg)	1
10x KAPA Taq Buffer (1X)	2	5X KAPA HiFi Buffer (Fidelity)	5
dNTP mix (10 mM – 0,2 mM)	0,4	10 mM KAPA dNTP Mix	0,75
Fprimer (10 μM – 0,4 μM)	0,8	Fprimer (10 μM – 0,3 μM)	0,75
Rprimer (10 μM – 0,4 μM)	0,8	Rprimer (10 μM – 0,3 μM)	0,75
KAPA Taq DNA polymerase	0,1	1 U/μL KAPA HiFi DNA Polymerase	0,5
Water	13,9	PCR-grade Water	16,25
Final Volume	20	Final Volume	25

Στο εργαστήριο μας για την ανάλυση PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR Kit της KAPABIOSYSTEMS (La Roche Ltd) και ο θερμοκυκλοποιητής T100™ Thermal Cycler της BIORAD. Κατά τα τελευταία στάδια των πειραμάτων χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί αντίδραση PCR υψηλής ακρίβειας με το ένζυμο HiFi DNA πολυμεράση της KapaBiosystems, με χρήση του αντίστοιχου κίτ (Kapa HiFi PCR Kit, KAPABIOSYSTEMS). Το συγκεκριμένο κίτ περιλαμβάνει μια πολυμεράση υψηλής ακρίβειας. Η ακρίβεια μιας πολυμεράσης αναφέρεται στην ικανότητά της να εισάγει τη σωστή βάση κατά τη διάρκεια της PCR. Αντίθετα, ο ρυθμός εσφαλμένης ενσωμάτωσης είναι γνωστός ως ποσοστό σφάλματος της πολυμεράσης. Συνεπώς, σε μια PCR υψηλής ακρίβειας, χρησιμοποιείται μια DNA πολυμεράση με χαμηλό ποσοστό σφάλματος, με αποτέλεσμα υψηλό βαθμό ακρίβειας κατά την αντιγραφή του DNA. Συγκεκριμένα, η HiFi DNA πολυμεράση της KapaBiosystems έχει πολύ μικρό ποσοστό σφάλματος, της τάξεως του 1 σφάλματος ανά $3,6 \times 10^6$ νουκλεοτίδια που ενσωματώνονται. Τα συστατικά των επιμέρους αντιδράσεων καθώς και το θερμικό προφίλ τους περιγράφονται στους Πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 3: Θερμικό προφίλ PCR και PCR υψηλής ακρίβειας

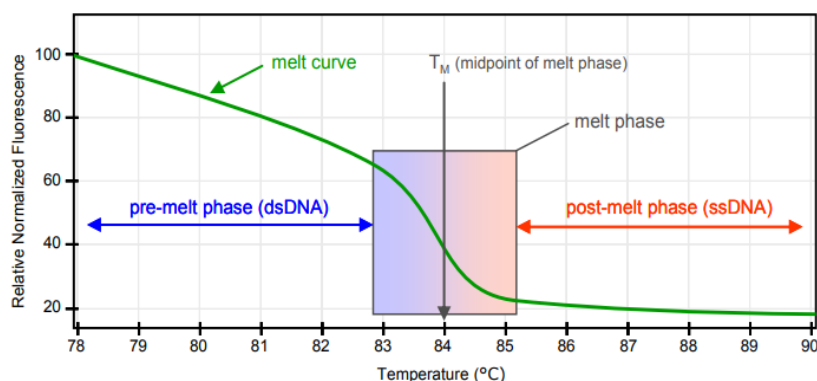
Στάδιο	PCR		PCR υψηλής ακρίβειας		#Κύκλοι
	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	
Αρχική αποδιάταξη (Initial denaturation)	95°C	3 min	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη (Denaturation)	95°C	30 sec	98°C	20 sec	35
Υβριδοποίηση (Annealing)	Tm – 5°C (53 °C)	30 sec	62 °C	15 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	1 min/kb	72 °C	15 sec	

(Extension)		(100b- 10 sec)			
Τελική επιμήκυνση (Final extension)	72 °C	1 min	72 °C	40 sec	1
Hold	4 °C	∞	4 °C	∞	

2.5.4. Ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM-analysis)¹²⁵⁻¹²⁶

Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή, η ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM-analysis) είναι ένας τρόπος μελέτης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) που βασίζεται στην ανάλυση της τήξης του DNA. Η HRM χαρακτηρίζει τα δείγματα DNA σύμφωνα με τη συμπεριφορά της διάστασής τους καθώς μεταβαίνουν από δίκλωνο DNA (dsDNA) σε μονόκλωνο DNA (ssDNA) με την αύξηση της θερμοκρασίας¹²⁶. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία δεν αλληλεπιδρά με το ssDNA αλλά συνδέεται ενεργά με το dsDNA και φθορίζει έντονα όταν δεσμεύεται σε αυτό¹²⁶. Πριν από την εκτέλεση μιας ανάλυσης HRM, η αλληλουχία στόχος πρέπει να πολλαπλασιαστεί σε υψηλό αριθμό αντιγράφων και αυτό γίνεται συνήθως χρησιμοποιώντας μια αντίδραση ενίσχυσης του DNA, όπως είναι η qPCR, παρουσία μιας χρωστικής 3^{ης} γενιάς, όπως η EvaGreen®. Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) το προϊόν PCR μετράται σε κάθε κύκλο.

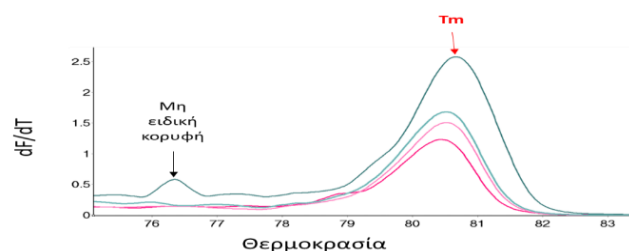
Συγκεκριμένα η ποσότητα του μορίου στόχου (πχ DNA) μετριέται μετά από κάθε κύκλο μέσω χρωστικών φθορισμού που αποδίδουν αυξανόμενο σήμα φθορισμού σε άμεση αναλογία με τον αριθμό των παραγόμενων μορίων προϊόντος PCR. Τα δεδομένα που συλλέγονται στην εκθετική φάση της αντίδρασης δίνουν ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με την αρχική ποσότητα του στόχου ενίσχυσης. Οι χρωστικές 3^{ης} γενιάς επιλέγονται κατά την ανάλυση HRM γιατί θεωρούνται λιγότερο τοξικές και πιο



Εικόνα 2.19: Βασικές αρχές ενός τυπικού διαγράμματος HRM. Η καμπύλη τήξης (πράσινη) απεικονίζει τη μετάβαση από τον υψηλό φθορισμό της αρχικής φάσης προ τήξης στο βασικό φθορισμό στη φάση μετά την τήξη. HRM Assay Design and Analysis CorProtocol™ 6000-1-July 06

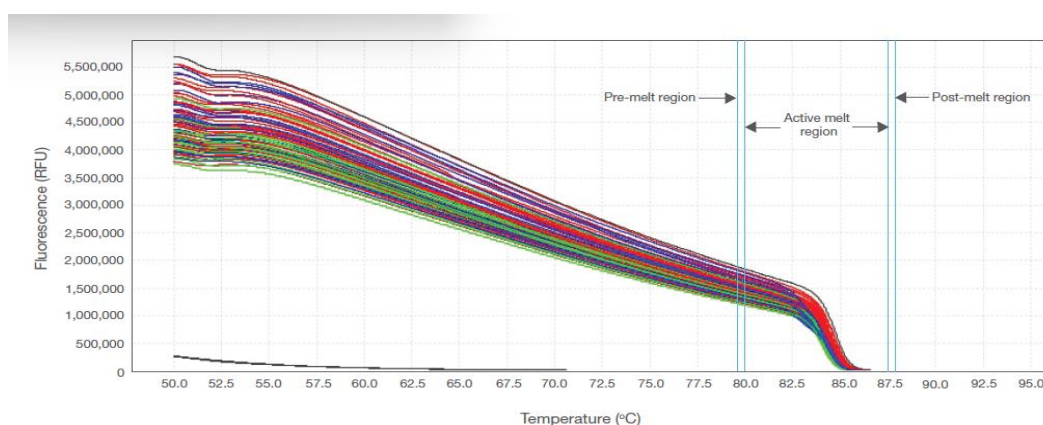
σταθερές. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της qPCR, το τμήμα DNA που έχει πολλαπλασιαστεί θερμαίνεται διαδοχικά από τους 55° C μέχρι τους 95° C. Μέσα σε αυτό το φάσμα βρίσκεται και η θερμοκρασία τήξης (Melting Temperature) του δείγματος, δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία οι δύο κλώνοι διαχωρίζονται. Ένα από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι πως η πορεία της ελέγχεται σε πραγματικό χρόνο μέσω της παρατήρησης των αλλαγών στο φθορισμό της χρωστικής. Η αλλαγή στο φθορισμό της χρωστικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί αρχικά για τη μέτρηση της αύξησης της συγκέντρωσης του DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης ενίσχυσης του

και στη συνέχεια για την απευθείας μέτρηση της θερμικά επαγόμενης διάστασης του DNA από την ανάλυση HRM.



Εικόνα 2.2.: Διάγραμμα της διαφοράς φθορισμού στην αλλαγή θερμοκρασίας (dF/dT) ως προς τη θερμοκρασία. Η ψηλότερη κορυφή αντιπροσωπεύει το T_m του κύριου προϊόντος, ενώ οι μικρότερες αποτελούν μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης PCR.

Κατά την ανάλυση της τήξης, ο φθορισμός αρχικά είναι υψηλός επειδή το δείγμα ξεκινά ως dsDNA, αλλά μειώνεται προοδευτικά καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται και το DNA διασπάται σε μονούς κλώνους. Ο ρυθμός μείωσης του φθορισμού είναι γενικά μεγαλύτερος κοντά στη θερμοκρασία τήξης (T_m) του προϊόντος PCR. Το T_m ορίζεται ως το σημείο στην καμπύλη τήξης όπου το 50% του DNA είναι δίκλωνο και το 50% είναι μονόκλωνο. Η παρατηρούμενη συμπεριφορά «τήξης» κάθε δείγματος είναι χαρακτηριστική του συγκεκριμένου δείγματος DNA. Οι καμπύλες τήξης προκύπτουν από την κατασκευή διαγράμματος του κανονικοποιημένου φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία (Εικόνες 2.1-2.2). Στο διάγραμμα αυτό τα T_m s των προϊόντων εμφανίζονται ως κορυφές. Στο ίδιο διάγραμμα είναι πιθανό να εμφανίζονται και μη ειδικά προϊόντα, τα οποία απεικονίζονται ως κορυφές χαμηλότερης έντασης και αντιπροσωπεύουν προϊόντα που έχουν μικρότερο μήκος και άρα αποδιατάσσονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από το κύριο προϊόν της αντίδρασης. Τα προϊόντα αυτά μπορεί να είναι είτε διμερή εκκινητών είτε άλλα μη ειδικά προϊόντα PCR και η παρουσία ή απουσία τους αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας ή όχι αντίστοιχα του προϊόντος της PCR.



Εικόνα 2.310: Καμπύλη τήξης (ακατέργαστα δεδομένα). Τα δεδομένα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια ενός πειράματος HRM παρουσιάζουν μια σειρά από αρχικές μετρήσεις φθορισμού, καθιστώντας δύσκολη τη διάκριση των διαφορών στην αλλαγή του φθορισμού για μεμονωμένα δείγματα. Η ενεργή περιοχή τήξης (active melt region) ορίζεται από περιοχές πριν (pre-melt) και μετά (post melt) τη τήξη (διπλές ράβδοι) που χρησιμοποιούνται για την ευθυγράμμιση των δεδομένων, δημιουργώντας μια πιο καθαρή άποψη των αποτελεσμάτων της σύγκρισης των καμπύλων τήξης. (Τα διαφορετικά χρώματα της κάθε καμπύλης αντιπροσωπεύουν διαφορετικά δείγματα). A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis, Applied Biosystems

Το τελευταίο στάδιο της ανάλυσης HRM είναι η επεξεργασία των δεδομένων. Τα μη επεξεργασμένα δεδομένα που συλλέγονται από ένα πείραμα HRM εμφανίζουν μια

σειρά αρχικών ενδείξεων φθορισμού, καθιστώντας δύσκολη τη διάκριση των διαφορών μεταξύ δειγμάτων (Εικόνα 2.3.). Το κανονικοποιημένο διάγραμμα παρέχει μια κλιμακούμενη προβολή των δεδομένων, επιτρέποντας την εύκολη διάκριση των παραλλαγών της αλληλουχίας που εμφανίζουν πραγματικές διαφορές στη συμπεριφορά της καμπύλης τήξης τους. Καθώς κάθε καμπύλη τήξης είναι μοναδική για κάθε δείγμα DNA, σύγκριση των καμπυλών τήξης ως προς το σχήμα ή/και σε σύγκριση με δείγματα μάρτυρες, δίνει πληροφορίες για την ομοιότητα του DNA των δειγμάτων. Οι καμπύλες τήξης δύο δειγμάτων που έχουν τη ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία θα εφάπτονται πλήρως ή μια της άλλης, ωστόσο εάν υπάρχει διαφορά ακόμη και σε ένα ζεύγος βάσεων, η θερμοκρασία και συνεπώς η καμπύλη τήξης θα αλλάξει. Έτσι, διαφορετικοί γονότυποι δίνουν καμπύλες τήξης με διαφορετική κλίση και διαφορετικές τιμές T_m .

Για την ανάλυση HRM, στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε το SsoFast EvaGreen® Supermix (Bio-rad Laboratories), που περιέχει τη χρωστική EvaGreen®. Οι θερμικές συνθήκες και τα συστατικά της αντίδρασης προσαρμόστηκαν όπως στους Πίνακες 4 και 5, και αποτελούν μια σύνθεση ανάμεσα στο πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία του Supermix (Bio-rad Laboratories) και αυτό που προτείνει η εταιρεία του θερμοκυκλοποιητή Rotor-Gene® Q (QIAGEN). Η ανάλυση HRM απαιτεί έναν θερμικό κυκλοποιητή PCR και ένα όργανο με οπτικό σύστημα ικανό να συλλέγει τα πολυάριθμα σημεία φθορισμού δεδομένων. Είναι καλύτερο όταν ένα όργανο μπορεί να εκτελέσει και τις δύο λειτουργίες και για αυτό χρησιμοποιήσαμε το Rotor-Gene® Q (QIAGEN) του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ).

Πίνακας 4: Τα συστατικά της αντίδρασης HRM

Συστατικά	Όγκος (μl)
SsoFast EvaGreen Supermix 2X	10 μl
10 μM Fprimer	1 μl
10 μM Rprimer	1 μl
Template DNA (30 ng/μl)	(1 μl)
Water	7 μl
Final Volume (χωρίς Template)	19 μl

Πίνακας 5: Θερμικό προφίλ qPCR/HRM

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	#Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (Initial denaturation)	98°C	5 min	1
Αποδιάταξη (Denaturation)	95°C	15 sec	40
Υβριδοποίηση/ Επιμήκυνση (Annealing/Extension)	62 °C	30 sec	
HRM	65-95 °C (in 0,2 °C inc.)	5 sec/step	1

2.5.5. Αλληλούχηση κατά Sanger

Η αλληλούχηση του DNA με τη μέθοδο Sanger είναι μια ενζυμική μέθοδος αλληλούχησης με «τερματισμό επιμήκυνσης της αλυσίδας» με τη βοήθεια τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων (Dideoxynucleotides, ddNTPs). Για το σκοπό της παρούσας διπλωματικής, δείγματα DNA στάλθηκαν σε εξωτερικό συνεργάτη για αλληλούχηση κατά Sanger (CeMIA SA, Cellular and molecular immunological applications). Το μέγεθός τους έπρεπε να είναι ιδανικά μεταξύ 100 και 1000 βάσεων και ο λόγος 260/280 να υπολογίζεται περίπου στο 1,8. Για να επιτευχθούν αυτές οι προϋποθέσεις, τα δείγματα ενισχύθηκαν με αντίδραση PCR υψηλής ακρίβειας με το ένζυμο HiFi DNA πολυμεράση της KaraBiosystems, με χρήση του αντίστοιχου κίτ (Kara HiFi PCR Kit, KAPABIOSYSTEMS) όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, έγινε οπτικοποίηση του αποτελέσματος της αντίδρασης σε gel αгарόζης και ακολούθως gel extraction με χρήση του κίτ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της MACHEREY-NAGEL GmbH & Co με στόχο την απομόνωση του επιθυμητού τμήματος DNA του κάθε δείγματος. Οι συγκεντρώσεις και η καθαρότητα των δειγμάτων μετρήθηκαν με χρήση του μηχανήματος Quawell Q3000 UV Spectrophotometer. Καθώς το τμήμα του DNA προς αλληλούχηση ήταν μικρότερο των 100 ζευγών βάσεων, η συγκέντρωση του DNA κάθε δείγματος που στάλθηκε ήταν στα 5-10ng/μl. Επιπλέον των δειγμάτων, στάλθηκαν και οι επιθυμητοί primers ποσότητας 5μL σε συγκέντρωση 5pmol/μl, ανά αντίδραση.

Κεφάλαιο

3

Αποτελέσματα

3.1. Βιβλιογραφική αναζήτηση γενετικών βιοδεικτών

Τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής αναζήτησης για γενετικούς βιοδείκτες οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται με τον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης και την εξέλιξη της ασθένειας σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο *L. infantum* και τα οποία θα αξιοποιηθούν στην εν λόγω διπλωματική εργασία περιλαμβάνουν 8 μελέτες, οι οποίες καλύπτουν χρονικά ένα εύρος από το 2003 έως το 2020 και αφορούν συγκεκριμένα σε SNPs τα οποία φαίνεται να προσδίδουν ένα μοτίβο ανθεκτικότητας ή ευαισθησίας στη λείσμανίαση του σκύλου. Οι 3 μελέτες έγιναν με απευθείας αλληλούχηση των γονιδίων (direct sequencing of genes). Οι 4 ήταν μελέτες συσχέτισης ολικού γονιδιώματος (GWAS, Genome-Wide Association Studies) για 173,662 δείκτες SNPs (SNP markers) που έγιναν με τη μικροσυστοιχία της Illumina, CanineHD BeadChip, ενώ σε μια μελέτη έγινε γονοτύπωση SNP (SNP genotyping) με χρήση της πλατφόρμας Sequenom MassARRAY.

Στη συνέχεια θα αναφερθούν αναλυτικά οι παραπάνω μελέτες, δίνοντας βάρος κατά κύριο λόγο στα αποτελέσματα που θα αξιοποιηθούν για τη δημιουργία των υποψηφίων βιοδεικτών και όχι σε όλα τα αποτελέσματά τους.

1. 2003, Quinnell et al. "Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with *MHC class II* polymorphism"¹²⁹

Το 2003, ο Quinnell και οι συνεργάτες του εξέτασαν τη σχέση μεταξύ των αλληλομόρφων του γονιδίου *DLA* (Dog Leucocyte antigens) *class II* (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*) και της πορείας της λοίμωξης σε μια ομάδα 126 ημίαιμων σκύλων ενδημικών και μη ενδημικών περιοχών στη Βραζιλία, οι οποίοι εκτέθηκαν σε φυσική μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum*. Οι στόχοι της μελέτης ήταν να περιγραφεί η κατανομή των αλληλομόρφων του *DLA* (*-DRB1*, *-DQA1* και *-DQB1*) στον πληθυσμό των σκύλων της μελέτης, να εξεταστεί η επίδραση των μη γενετικών μεταβλητών (φύλο, ηλικία και καταγωγή του σκύλου) στην έκβαση της λοίμωξης, και να διερευνηθεί η συσχέτιση μεταξύ των αλληλομόρφων του *DLA class II* και της πορείας της λοίμωξης, η οποία αξιολογείται με βάση την κλινική εικόνα, την παρασιτολογική κατάσταση και την ειδική ανοσολογική απόκριση του κάθε ζώου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, μεταξύ άλλων, καταδεικνύουν μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του αλληλομόρφου *DLADRB1*01502* και της ευαισθησίας στη λείσμανίαση του σκύλου. Οι σκύλοι με αυτό το αλληλόμορφο είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αντιλείσμανιακών IgG (τα οποία υποδεικνύουν ευαισθησία στη λοίμωξη) και σημαντικά υψηλότερες πιθανότητες να είναι θετικοί στην ύπαρξη των παρασίτων με PCR. Δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με την κλινική εικόνα των ζώων.

2. 2008, Sanchez-Robert et al. "*Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis"¹³⁰

Το 2008, η Sanchez-Robert και οι συνεργάτες της ερευνούν τη συσχέτιση του γονιδίου *Slc11a1* με τη λείσμανίαση του σκύλου, προσπαθώντας ταυτόχρονα να χαρακτηρίσουν πλήρως τις παραλλαγές της αλληλουχίας του κάνοντας γονοτύπωση

του σε ένα εκτεταμένο δείγμα σκύλων. Το γονίδιο *Slc11a1* δρα ως ένας αντιμεταφορέας πρωτονίου/ δισθενούς κατιόντος, ο οποίος ελέγχει την αντιγραφή των ενδοκυττάρων παρασίτων αλλάζοντας το εσωτερικό περιβάλλον του φαγολυσώματος που περιέχει το μικρόβιο. Οι παραλλαγές αυτού του γονιδίου φάνηκε να συσχετίζονται σε προηγούμενες μελέτες με την ανοσοαπόκριση στη λείσμανίαση του σκύλου. Στη μελέτη αυτή, οι ερευνητές ελέγχουν συνολικά 24 πολυμορφισμούς του γονιδίου *Slc11a1* σε 164 σκύλους από 19 διαφορετικές φυλές. Στα αποτελέσματα της μελέτης φαίνεται, μεταξύ άλλων, να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση της λείσμανίασης του σκύλου με 3 πολυμορφισμούς του γονιδίου *Slc11a1*. Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι οι A4549G στο ιντρόνιο 6 (odds ratio (OR) = 6.78, P = 0.001), C4859T στο εξώνιο 8, που όμως αποτελεί μια συνώνυμη μετάλλαξη, και C8542T στο ιντρόνιο 13 (P = 0.018) και φαίνεται να συνδέονται με υψηλότερες πιθανότητες εκδήλωσης νόσου στη λείσμανίαση του σκύλου.

3. 2012, Quillez et al. "Genetic Control of Canine Leishmaniasis: Genome-Wide Association Study and Genomic Selection Analysis"¹³¹

Το 2012 ο Quillez και οι συνεργάτες του πραγματοποιούν μια μελέτη συσχέτισης ολικού γονιδιώματος (GWAS) και γονιδιωματικής επιλογής (genomic selection) σε 219 σκύλους φυλής Boxer με στόχο να αποδείξουν την επίδραση του γενετικού υπόβαθρου κάθε ατόμου στην εξέλιξη της νόσου κατά τη μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum*.

Συνολικά στη μελέτη συμμετείχαν 219 σκύλοι της φυλής Boxer, από ενδημικές περιοχές. Από αυτούς, οι 115 χαρακτηρίστηκαν ως healthy infected, με το συγκεκριμένο group να αποτελείται από υγιείς σκύλους άνω των 4 ετών, που όμως στο παρελθόν είχαν εμφανίσει σημάδια μόλυνσης από το παράσιτο και 104 ως affected, που ήταν σκύλοι που έφεραν κλινικές εκδηλώσεις της λείσμανίασης και είχαν διαγνωστεί για τη νόσο σε ηλικία μικρότερη των 4 ετών. Με βάση την προσέγγιση της συσχέτισης ολικού γονιδιώματος, οι πιο δυνατές συσχετίσεις ήταν αυτές στα χρωμόσωμα 1 (SNP: BICF2P1116416), χρωμόσωμα 4 (SNP: BICF2S2369174) και χρωμόσωμα 20 (SNP: BICF2P1345879), όμως καμία από αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντική μετά από διόρθωση σε επίπεδο ολικού γονιδιώματος. Μεταξύ αυτών, η περιοχή στο χρωμόσωμα 4: 61.2–76.9 Mb φάνηκε να χαρτογραφεί ένα γενετικό τόπο που είχε συσχετιστεί σε προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπους και μυοειδή με ευαισθησία του ξενιστή στη λείσμανίαση και η γονιδιωματική επιλογή εκτιμά πως οι μοριακοί δείκτες της περιοχής αυτής έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στο φαινότυπο.

4. 2015, Utsunomiya et al., "Genome-Wide Scan for Visceral Leishmaniasis in Mixed-Breed Dogs Identifies Candidate Genes Involved in T Helper Cells and Macrophage Signaling"¹³²

Στη μελέτη τους, οι Utsunomiya et al. χρησιμοποίησαν 149,648 δείκτες SNPs για να ελέγξουν το σύνολο του γονιδιώματος μιας ομάδας 48 ημίαιμων σκύλων που διαβιούσαν σε ενδημική περιοχή της Βραζιλίας, με στόχο να βρουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ των δεικτών αυτών με την ανοσολογική ανταπόκριση των ξενιστών στη μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum*. Στα αποτελέσματα, μεταξύ άλλων, βρέθηκαν δυο υποψήφιες γενετικές περιοχές, μια στο χρωμόσωμα 1 και μια στο χρωμόσωμα 2, που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 1 \times 10^{-5}$). Ο δείκτης στο χρωμόσωμα 2 (rs22840096) χαρτογραφήθηκε σε μια περιοχή υπερευαισθησίας της DNάσης (predicted DNase sensitive site) των CD14+ μονοκυττάρων, η οποία λειτουργεί ως επαγωγικό στοιχείο της μεταγραφής (cis-ρυθμιστικό στοιχείο, cis-regulatory element) των γονιδίων *IL2RA* και *IL15RA*, τα οποία κωδικοποιούν την έκφραση των υποδοχέων άλφα της ιντερλευκίνης 2 και 15 αντίστοιχα. Ο δείκτης στο χρωμόσωμα 1 (rs22039047) χαρτογραφήθηκε ανάμεσα σε δυο θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που φάνηκε να ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου *TLE1*

(transducin-like enhancer of split 1 gene), το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση Notch. Η σηματοδότηση Notch είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση των μακροφάγων και τη διαφοροποίηση των CD4+ T κυττάρων, η οποία συντελεί στην εκδήλωση ανοσολογικής απόκρισης Th1 ή Th2. Συνεπώς και οι δυο γενετικοί δείκτες που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μελέτη φαίνεται πως συντελούν στον ίδιο μηχανισμό ανθεκτικότητας στη λοίμωξη από το παράσιτο *L.infantum*, ο οποίος περιλαμβάνει την θανάτωση των παρασίτων που ευνοείται από την ανοσολογική απόκριση τύπου Th1.

5. 2016, Batista et al. "Genome-Wide Association Study of Cell-Mediated Response in Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*"¹³³

Σε μια μελέτη συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS), οι Batista et al. αξιοποίησαν 110.165 δείκτες SNPs για να εντοπίσουν χρωμοσωμικές περιοχές που σχετίζονται με τη δερματική δοκιμή (leishmanin skin test, LST), τη δοκιμασία πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων (lymphocyte proliferation assay, LPA) και το προφίλ των εκκρινόμενων κυτοκινών για την περαιτέρω κατανόηση του ρόλου που διαδραματίζει η κυτταροδιαμεσολαβούμενη ανοσία (CMI) στην έκβαση της φυσικής λοίμωξης από το παράσιτο *Leishmania infantum*. Ο πληθυσμός που μελετήθηκε αποτελούνταν από 2 ομάδες σκυλιών που διαβιούσαν σε ενδημικές περιοχές της Βραζιλίας. Η ομάδα των νοσούντων ζώων (diseased dog group) αποτελούνταν από 100 ζώα τα οποία παρουσίαζαν συμπτώματα λείσμανιάσης ή/και χαρακτηρίστηκαν θετικά σε ένα τουλάχιστον από τα τεστ διάγνωσης (PCR, LPA ή LST). Αντίθετα, η ομάδα ελέγχου (control group) αποτελούνταν από 17 ζώα που ήταν αρνητικά σε όλες τις διαγνωστικές δοκιμές (PCR, LST, LPA, anti-*L. infantum* IgG ELISA).

Στα αποτελέσματα της ανάλυσης ολικού γονιδιώματος, μεταξύ άλλων, ανιχνευθήκαν κάποιοι γενετικοί δείκτες που φαίνονται να εμπλέκονται στο προφίλ έκφρασης των κυτοκινών και συνεπώς να παίζουν ρόλο στη φύση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή απέναντι στο παράσιτο. Για τον TNF-α, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε 27 markers με κορυφαίο το SNP με κωδικό BICF2S22949424 (χρωμόσωμα 20), το οποίο γειτνιάζει με γονίδια τα οποία φαίνεται πως εμπλέκονται στη μεταγωγή μηνυμάτων μέσω κυτοκινών (*JAK3*, *IL-12RB1*, *IFI30*, *CCRL2*, *CCR2*, *CCR3*, *XCR1*, και *CXCR6*). Για την IL-10, 3 δείκτες αποδείχθηκαν σημαντικοί, όλοι στο χρωμόσωμα 17 με κορυφαίο το SNP BICF2G630213974, το οποίο εντοπίζεται κοντά στο γονίδιο *LTBP1*. Τέλος, για τον TGF-β ο πιο σημαντικός δείκτης ήταν το SNP BICF2G630236868 στο χρωμόσωμα 5, όπου η παρουσία του αλληλομόρφου B (A/B Illumina code, G αντί για A) συνδέεται με αυξημένη έκκριση του TGF-β σε παρουσία του αντιγόνου. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης συσχέτισης κατάφεραν να εντοπίσουν χρωμοσωμικές περιοχές του γονιδιώματος που σχετίζονται με την κυτταροδιαμεσολαβούμενη ανοσοαπόκριση των ξενιστών, η οποία δυνητικά επηρεάζει την κλινική πολυπλοκότητα της νόσου καθώς και τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου εντός του ξενιστή κατά τη λοίμωξη με *L. infantum*.

6. 2017, da Silva et al. "Canine β-defensin-1 (*CBD1*) gene as a possible marker for *Leishmania infantum* infection in dogs"¹³⁴

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η da Silva και οι συνεργάτες της αξιολογήσαν τη συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών (SNPs) του γονιδίου της β-defensin-1 (*CBD1*) του σκύλου και της μόλυνσης από το παράσιτο *L. infantum* σε 387 σκύλους ενδημικών περιοχών της Βραζιλίας και την Ιταλίας. Συνολικά εντοπίστηκαν 9 πολυμορφισμοί, από τους οποίους η παρουσία των 4 (SNPs 3, 4, 7 και 8) μόνο συσχετίστηκε με την εύρεση του DNA του παρασίτου σε σκύλους του πληθυσμού της Ιταλίας. Συγκεκριμένα, οι γονότυποι A/A και T/T στα SNPs 3 και 8, αντίστοιχα, φαίνεται να συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης λείσμανιάσης, ενώ αντίθετα οι γονότυποι A/C και A/G στα SNPs 4 και 7 αντίστοιχα συσχετίστηκαν με ανθεκτικότητα στη λοίμωξη από το παράσιτο. Συνεπώς,

οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα πως τα παραπάνω SNPs του γονιδίου *DEFB1* είναι πιθανό να αποτελούν γενετικούς δείκτες της ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας των σκύλων στη λοίμωξη από το παράσιτο *Leishmania infantum*.

7. 2019, Soutter et al., “An investigation of polymorphisms in innate and adaptive immune response genes in canine leishmaniosis”¹³⁵

Το 2019, η Soutter και οι συνεργάτες της διεξάγουν μια έρευνα με στόχο να εξετάσουν πολυμορφισμούς σε γονίδια που σχετίζονται με τη φυσική και την επίκτητη ανοσοαπόκριση και να εξετάσουν αν οι πολυμορφισμοί αυτοί σχετίζονται με ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στη λοίμωξη από το παράσιτο *L.infantum*. Η έρευνα χωρίστηκε σε 2 επιμέρους σκέλη, καθώς συμμετείχαν 2 διαφορετικοί πληθυσμοί σκύλων, στους οποίους έγινε διαφορετική ανάλυση. Το πρώτο σκέλος αφορούσε σε έναν πληθυσμό 163 σκύλων διαφόρων φυλών που αποτελούνταν από κατοικίδια ζώα τα οποία επισκέπτονταν κτηνιατρικές κλινικές σε ενδημικές περιοχές (Πάφος, Κύπρος και Σαραγόσα, Ισπανία), χωρισμένα σε 2 ομάδες (control και clinical cases). Το δεύτερο σκέλος αφορούσε σε ένα πληθυσμό 48 σκύλων φυλής Beagle, οι οποίοι κατοικούσαν σε εξωτερικό χώρο ενδημικής περιοχής. Και αυτός ο πληθυσμός χωρίστηκε σε 2 ομάδες, με την πρώτη ομάδα να αποτελείται από 27 σκύλους με φαινομενικά ανθεκτικό στη λοίμωξη φαινότυπο και τη δεύτερη ομάδα από 21 σκύλους που φάνηκε να είναι ευαίσθητοι στη λοίμωξη από την *L.infantum* (κλινική νόσος, θετικές ορολογικές και παρασιτολογικές εξετάσεις, συνεχώς θετική PCR σε δείγματα από τον μυελό των οστών των ζώων).

Στα αποτελέσματα του πρώτου σκέλους, μεταξύ άλλων βρέθηκε ένα SNP στο γονίδιο *CIITA*, το οποίο έδειξε σημαντικά υψηλότερη συχνότητα ελάσσονος αλληλόμορφου (MAF) στην ομάδα των clinical cases σε σύγκριση με την ομάδα των controls στο επίπεδο των μεμονωμένων SNP, όμως φάνηκε να μην είναι στατιστικά σημαντικό μετά τη διόρθωση για πολλαπλές δοκιμές. Στο δεύτερο σκέλος, 3 SNPs στο γονίδιο *TLR3*, 2 στο γονίδιο *PTPN22* και από 1 SNP στα γονίδια *TLR4* και *IL1A* συσχετίστηκαν με τον ευαίσθητο φαινότυπο σε επίπεδο μεμονωμένων SNP, αλλά δε φάνηκαν να είναι στατιστικά σημαντικά μετά τη διόρθωση για πολλαπλές δοκιμές.

8. 2020, Batista et. al., “Chromosomal segments may explain the antibody response cooperation for canine leishmaniasis pathogenesis”¹³⁶

Το 2020, ο Batista και οι συνεργάτες τους πραγματοποιούν μια μελέτη συσχέτισης ολικού γονιδιώματος με στόχο να διερευνήσουν τη σχέση μεταξύ των επιπέδων των διαφόρων κατηγοριών ανοσοσφαιρινών (IgA, IgE, IgG και IgM) έναντι της *L.infantum* με το παρασιτικό φορτίο, τις κλινικές εκδηλώσεις, ηπατικούς και νεφρικούς βιοχημικούς δείκτες καθώς και δείκτες οξειδωτικού στρες σε 165 σκύλους ενδημικών για τη λεισμανίαση περιοχών της Βραζιλίας. Ο πληθυσμός που μελετήθηκε χωρίστηκε στις ομάδες, uninfected(21), exposed(12), infected(56), sick(52) και severely sick(24). Οι σκύλοι της ομάδας uninfected ήταν αρνητικοί σε ορολογικές εξετάσεις και στη PCR για την ανίχνευση του DNA του παρασίτου, της ομάδας exposed αρνητικοί στη PCR αλλά θετικοί στις ορολογικές εξετάσεις (ELISA) ενώ της ομάδας infected ήταν θετικοί και στις δυο δοκιμές. Κανένας από τους παραπάνω σκύλους όμως δεν εμφάνισε κλινικά συμπτώματα της νόσου. Αντίθετα οι σκύλοι των ομάδων sick και severely sick εμφάνιζαν θετικές διαγνωστικές δοκιμές (PCR και ELISA) και κλινικά συμπτώματα λεισμανίασης, λιγότερο ή περισσότερο σοβαρά αντίστοιχα.

Στα αποτελέσματα της έρευνας, μεταξύ άλλων, βρέθηκε πως το επίπεδο των IgM ανοσοσφαιρινών είναι σημαντικά αυξημένο στα ζώα της ομάδας exposed σε σχέση με τα ζώα άλλων ομάδων και πως το επίπεδο των IgG ανοσοσφαιρινών είναι αυξημένο σε οροθετικά και νοσούντα ζώα σε αντίθεση με τα ζώα των ομάδων uninfected και

exposed. Ακόμη, βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης του παρασιτικού φορτίου των ζώων και της αύξησης των ανοσοσφαιρινών IgG και IgA. Επιπρόσθετα, οι οξειδωτικοί δείκτες (H₂O₂ και NO) φάνηκε πως ήταν αυξημένοι στα ζώα της ομάδας exposed, ενώ μειώνονταν σημαντικά κατά την εξέλιξη της νόσου, με τη μείωση του NO να συνδέεται σημαντικά και με το αυξημένο παρασιτικό φορτίο. Με βάση τα παραπάνω, η αύξηση των IgM ανοσοσφαιρινών, σχετίζεται με αύξηση των οξειδωτικών δεικτών, μείωση του παρασιτικού φορτίου και συνεπώς μη εξέλιξη της νόσου, ενώ αντίθετα οι ανοσοσφαιρίνες IgG και IgA σχετίζονται με μειωμένους οξειδωτικούς δείκτες, αυξημένο παρασιτικό φορτίο και εντονότερα κλινικά συμπτώματα.

Στα αποτελέσματα της ανάλυσης ολικού γονιδιώματος, βρέθηκαν 2 στατιστικά σημαντικοί δείκτες SNP που συσχετίζονται με τις IgM ανοσοσφαιρίνες, οι BICF2P397161(χρωμόσωμα 9) και BICF2P1333073 (χρωμόσωμα 23). Και οι δυο αυτοί δείκτες, γειτνιάζουν γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε μεταγωγικές οδούς που συνδέονται με την εξουδετέρωση ενδοκυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών και προτείνεται από τους ερευνητές πως συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα IgM σε ζώα που έχουν εκτεθεί στο παράσιτο *L.infantum*, προσφέροντας στα ζώα αυτά ανθεκτικότητα στη λοίμωξη. Για τις ανοσοσφαιρίνες IgG, η ανάλυση GWAS έδειξε 3 στατιστικά σημαντικούς δείκτες, τους BICF2P611903 (χρωμόσωμα 20), BICF2G630654815 (χρωμόσωμα 21) και BICF2G630804562 στο χρωμόσωμα 26. Τρεις στατιστικά σημαντικοί δείκτες βρέθηκαν να συσχετίζονται και με τις ανοσοσφαιρίνες IgA και συγκεκριμένα οι BICF2G630495425 (χρωμόσωμα 2), BICF2G630499066 (χρωμόσωμα 24) και TIGRP2P316921_rs8971639 (χρωμόσωμα 24). Και οι δυο αυτές κατηγορίες ανοσοσφαιρινών, φαίνεται να σχετίζονται με σοβαρές ηπατικές και νεφρικές βλάβες κατά τη λοίμωξη με *L.infantum* καθώς και με αυξημένο παρασιτικό φορτίο, συνεπώς οι αντίστοιχοι δείκτες τους θα μπορούσαν να αποτελούν δείκτες ευαισθησίας στη λοίμωξη από το παράσιτο.

3.2. Αξιολόγηση των υποψήφιων SNPs

Τα SNPs τα οποία επιλέχθηκαν για να αξιολογηθούν και να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα ως υποψήφιοι γενετικοί βιοδείκτες φαίνονται στον Πίνακα 6. Στον ίδιο πίνακα φαίνονται και οι πληροφορίες που μας ενδιέφερε να ανακτήσουμε για αυτά τα SNPs και περιλαμβάνουν τα αλληλόμορφα που εμφανίζουν, τη μέγιστη συχνότητα αλληλομόρφου (MAF), το χρωμόσωμα που εντοπίζονται, τον τύπο του πολυμορφισμού καθώς και αν αυτός συνδέεται με ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στη λείσμανίαση με βάση τα αποτελέσματα της εκάστοτε μελέτης. Ταυτόχρονα, έγινε αναζήτηση της αλληλουχίας της γειτονικής περιοχής του κάθε πολυμορφισμού με στόχο τη σχεδίαση εκκινήτων (primers) για την ενίσχυση κάθε τμήματος πριν την ανάλυση HRM, αλλά και γιατί ήταν σημαντικό να εντοπίσουμε αν ανιχνεύεται και κάποιο άλλο SNP, γειτονικό σε αυτό που ψάχνουμε, γεγονός που θα περιέπλεκε το αποτέλεσμα του πειράματος.

Πίνακας 6: Πίνακας υποψηφίων SNPs για ανάλυση HRM

A/ A	Author	SNPs	Sample size	P value	Highest Population MAF	Method	Alleles/ Type of variant	Suscept ibility/ Resista nce
1	Quinnell et al. (2003)	DLADRB1 *01502	126	<0.01	-	sequence- based typing	-	S
2	Sanchez- Robert et al. (2008)	Slc11a1, A4549G in intron 6 rs852043261	164	0.001	0,16	direct sequencing	A/G intron variant	S

3	Sanchez-Robert et al. (2008)	Slc11a1, C8542T in intron 13 rs853018892		0.098	0,36		T/C intron variant	S
4	Quilez et al. (2012)	BICF2S2369174 rs24106521	219	$p_{\text{raw}}=1.1 \times 10^{-5}$ $p_{\text{genome}}=0,22$	0,50	GWAS, Illumina CanineHD BeadChip	A/G intron variant	S
5	Utsunomiya et al. (2015)	rs22840096	48	4.7×10^{-6}	0,50		A/G 3 prime UTR variant	R
6	Utsunomiya et al. (2015)	rs22039047		4.6×10^{-6}	0,33		A/G intergenic variant	R
7	Batista et al. (2016)	BICF2S22949424 rs22868375	117	8.25×10^{-9}	0,50		T/C intron variant	R
8	Batista et al. (2016)	BICF2G63021397 4 rs22602085	117	$1,04 \times 10^{-6}$	0,50		G/A intergenic variant	S
9	Batista et al. (2016)	BICF2G63023686 8 rs24210895	117	6.31×10^{-8}	0,50		C/T intergenic variant	S
10	da Silva et al. (2017)	CBD1 rs851268228	387	0.02	0,34	Sanger sequencing	A/G intron variant	S
11	F. Soutter et al. (2019)	TLR3 c.1104 T > C ή TLR3 c.1380 T > C rs22529878	211	0.0147	0,50	Sequenom MassARRAY genotyping	G/A synonymous variant	S
12	Batista et al. (anti-L. infantum IgM) (2020)	BICF2P1333073 rs23149486	165	3.96×10^{-6}	0,50	GWAS, Illumina CanineHD BeadChip	A/T intron variant	R
13	Batista et al. (anti-L. infantum IgG) (2020)	BICF2P611903 rs22932270		5.03×10^{-6}	0,50		C/G intron variant	S
14	Batista et al. (anti-L. infantum IgA) (2020)	TIGRP2P316921 rs8971639		7.2×10^{-6}	0,49		G/T intron variant	S

Από καθεμία από τις έρευνες που αναλύσαμε επιλέχθηκε ένα SNP, με εξαίρεση τη μελέτη των Batista et.al (2020) από την οποία επιλέχθηκαν 2, και κριτήριο επιλογής ήταν αρχικά η μέγιστη MAF που παρουσίαζαν και εν συνεχεία το αν ήταν δυνατός ο σχηματισμός εκκινητών (primers), οι οποίοι να δίνουν προϊόν μεγέθους ~100bp, καθώς αυτό είναι το μέγεθος που επιθυμούμε να έχουν τα προϊόντα σε μια ανάλυση HRM. Δεν επιλέξαμε καθόλου, εν τέλει, το SNP *DLADRB1*01502* των Quinnell et al. καθώς δε μπορέσαμε να βρούμε primers που να δίνουν προϊόν σε μέγεθος ~100bp, ενώ αξιόλογους primers δε μπορέσαμε να σχηματίσουμε ούτε για το SNP rs22602085 και απορρίφθηκε αντίστοιχα.

3.3. Σχεδιασμός εκκινητών (primers).

Οι εκκινητές που σχεδιάσαμε για την ενίσχυση των επιλεγμένων τόπων φαίνονται στον Πίνακα 7. Οι λυοφυλιοποιημένοι εκκινητές συντέθηκαν από την εταιρία Eurofins Genomics, αναμείχθηκαν με νερό και ρυθμίστηκαν σε συγκέντρωση 50pm/μl.

Πίνακας 7: Πίνακας των υποψήφιων SNPs και των εκκινητών οι οποίοι επιλέχθηκαν για το πείραμα.

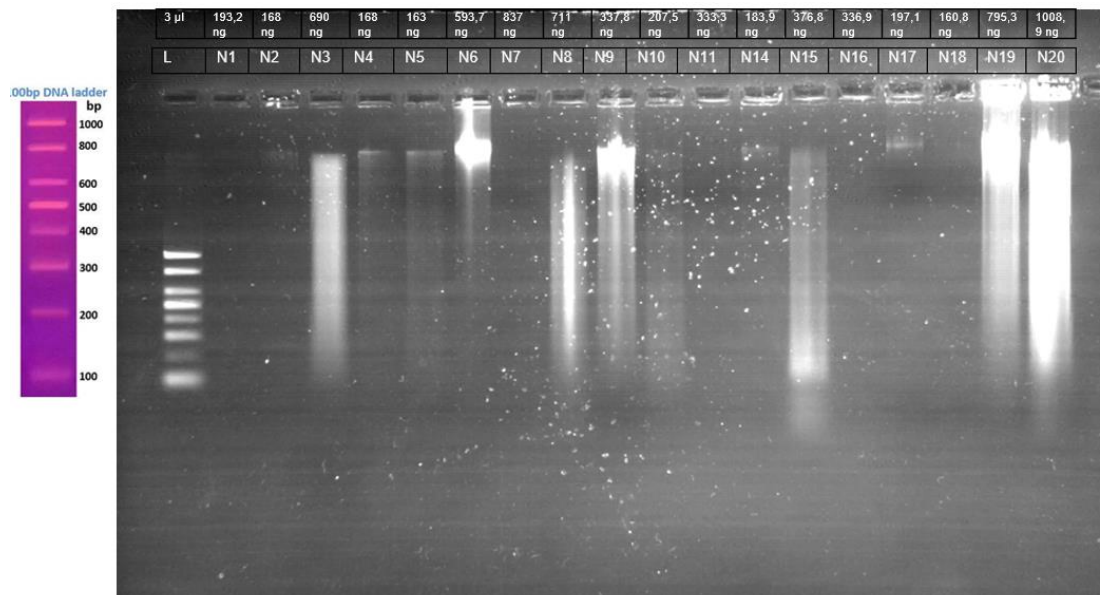
No	SNP	Chr	SNP	Highest population MAF	Forward Primer (5'→3')	Length	Tm	GC%	Reverse Primer (5'→3')	Length	Tm	GC%	Product length
L1	rs22840096	2	G/A	0.50	CGCCTGTGTCTAGTGCTTTG	20	59.21	55.00	TTCTTCTGCGCATCAGGGG	19	60.08	57.89	102
L3	rs851268228	16	C/T	0.34	GGGAGCATCAGCCAGGAG	18	59.49	66.67	CACCCCGGGCGTAGG	15	58.53	80.00	87
L4	rs8971639	24	G/T	0.49	AAGGGAGCTTCCTGCTCTTC	20	59.38	55.00	ATAAAGGGCCACCTCAGCTC	20	59.45	55.00	81
L6	rs24106521 (BICF2S2369174)	4	A/G	0.50	GTCCCTCCTGACCAAGAAACG	21	60.61	57.14	TTCTGATGTGGAAGGAAACAACTG	24	59.42	41.67	91
L7	rs24210895 (BICF2G630236868)	5	T/C	0.50	CCCAAAGCCAGGTACTACGG	20	60.11	60.00	TCCTAAAACCAAACCTGTACACCTG	23	58.80	43.48	79
L8	rs23149486 (BICF2P1333073)	23	A/T	0.50	CCTGTGGGAGGTGATGGATAG	21	59.30	57.14	AATAAATGCTCTGCTGGCACTG	22	59.57	45.45	87
L12	Rs853018892 (Slc11a1, C8542T in intron 13)	37	C/T	0.36	CTGCTCTTGCCAAATCCTGC	20	59.83	55.00	GACCTGGACACACCCCTTG	19	59.93	63.16	94
L14	rs22529878 (TLR3)	16	G/A	0.50	CCAGCCTTCAAAATGGATCAGC	22	60.16	50.00	AAAGACAGTGCCCCCTTTGA	20	59.44	50.00	96

3.4. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

3.4.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα σκύλου

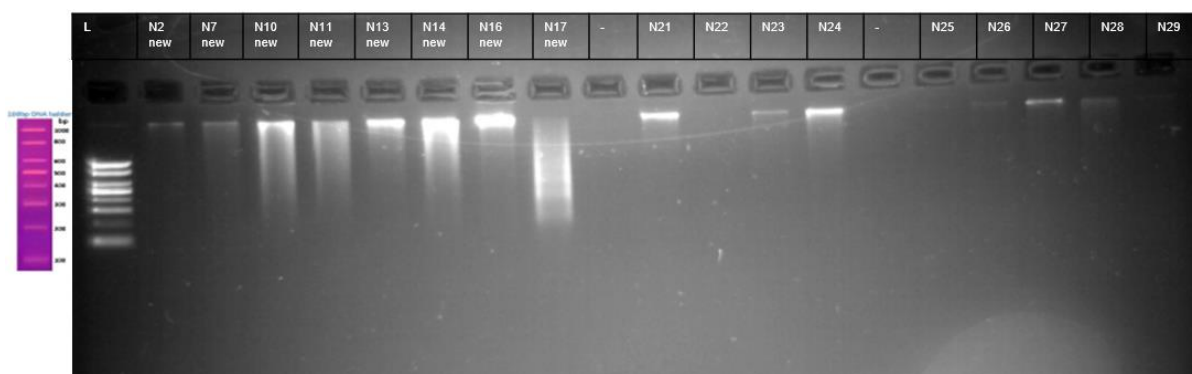
3.4.1.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα σκύλου με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης

Για να μετρήσουμε τις συγκεντρώσεις και την καθαρότητα των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν με τη μέθοδο φαινόλης- χλωροφόρμιου χρησιμοποιήσαμε το μηχάνημα Quawell Q3000 UV Spectrophotometer. Τα αποτελέσματα είναι αυτά που φαίνονται στον Πίνακα 8. Από το δείγμα N12 δεν απομονώθηκε DNA. Παράλληλα, έγινε έλεγχος της ποιότητας του DNA των δειγμάτων και σε gel αγαρόζης (Εικόνα 3.1.). Καθώς ο λόγος 260/280 δεν ήταν ικανοποιητικός για κάποια δείγματα, έγινε αρχικά προσπάθεια να επανακαθοριστούν τα δείγματα N6, N7, N8, N9, N19 και N20 με φαινόλη- χλωροφόρμιο- ισοαμυλική αλκοόλη ώστε ο λόγος να φτάσει πιο κοντά στο 1,8. Η προσπάθεια δεν ήταν επιτυχημένη, καθώς ο λόγος όχι μόνο δε βελτιώθηκε, αλλά μειώθηκε, ενώ μειώθηκε κατά πολύ και η ποσότητα του DNA. Σε κάποια από τα αρνητικά δείγματα, έγινε επανάληψη του πρωτοκόλλου απομόνωσης DNA ώστε να ληφθούν μεγαλύτερες ποσότητες και καλύτερης ποιότητας DNA. Στα δείγματα P4, P7, P9, P11, P12 έγινε επίσης ένα παραπάνω στάδιο επεξεργασίας με αιθανόλη ώστε να βελτιωθεί ο λόγος 260/280, με τα αποτελέσματα να είναι ενθαρρυντικά.



Εικόνα 3.1.: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA από τα αρνητικά δείγματα με πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφόρμιου- ισοαμυλικής αλκοόλης. Στην εικόνα φαίνονται και οι ποσότητες του DNA που φορτώθηκαν από κάθε δείγμα. Πυκνότητα gel αγαρόζης 1%, Ladder:100bp της EnzyQuest

Αυτό που μπορούμε να διακρίνουμε από την εικόνα των δειγμάτων στο gel αγαρόζης είναι πως η διαδικασία της απομόνωσης DNA δεν έδωσε τα ίδια αποτελέσματα σε όλα τα δείγματα. Σε κάποια δείγματα, το DNA φαίνεται να είναι κατακερματισμένο, σε κάποια άλλα φαίνεται να μην υπάρχει καθόλου DNA, ενώ η ποσοτικοποίηση που γίνεται με βάση το μηχάνημα Quawell Q3000 UV Spectrophotometer είναι πιθανό να μην είναι σωστή, όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.2., καθώς ενώ έχει φορτωθεί στο gel περίπου ίση ποσότητα DNA (~90 ng), η ένταση του σήματος δεν είναι ίδια για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 3.2.: Αποτελέσματα νέας απομόνωσης DNA από κάποια αρνητικά δείγματα με πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφόρμιου- ισοαμυλικής αλκοόλης. Ποσότητα DNA που φορτώθηκε στο gel από κάθε δείγμα ~90ng. Πυκνότητα gel αγαρόζης: 1,5%, Ladder:100bp, EnzyQuest

Πίνακας 8: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφόρμιου- ισοαμυλικής αλκοόλης

A/A	Sample	260/280	ng/μl	A/A	Sample	260/280	ng/μl
1	N1	1,43	30,5	26	N21	1,24	157,4
2	N2	1,56	18	27	N22	1,44	44,6
3	N2 new	1,41	755,9/770	28	N23	1,34	186,1
4	N3	1,71	255,5	29	N24	1,41	253,5
5	N4	1,51	37,9	30	N25	1,44	405,8
6	N5	1,52	34,6	31	N26	1,05 / 1,54	646,1 / 77,2
7	N6	1,45	35,4	32	N27	1,28	134,6

8	N7	1,46	20	33	N28	1,13 / 1,37	355,4 / 87
9	N7 new	1,36	898,1	34	N29	0,97 / 1,42	323,3/ 29,3
10	N8	1,64	80,5	35	P1	1,45	199,3
11	N9	1,52	43,3	36	P2	1,55	519,5
12	N10 new	1,65	222,6	37	P3	1,49	381,1
13	N11 new	1,40	210/190	38	P4	1,07/ 1,45	514,9 / 64,5
14	N13 new	1,35	364,3	39	P5	1,37	522,3
15	N14	1,64	20,4	40	P6	1,51	111,7
16	N14 new	1,52	660	41	P7	1,21 / 1,57	639,8 / 106,3
17	N15	1,68	111,3	42	P8	1,53	803,0
18	N16	1,31	102,2	43	P9	1,27 / 1,50	289,8 / 94,5
19	N16 new	1,53	128,8	44	P10	1,30	420,8
20	N17	1,64	18,7	45	P11	1,12 / 1,33	531,1 / 122,4
21	N17 new	1,72	767	46	P12	1,09 / 1,52	496,2 / 77,4
22	N18	1,30	31	47	P13	1,67	669,5
23	N18 new	1,44	161,4	48	P14	1,44	579,7
24	N19	1,65	149,2	49	P16	1,41	371,5
25	N20	1,65	205,2				

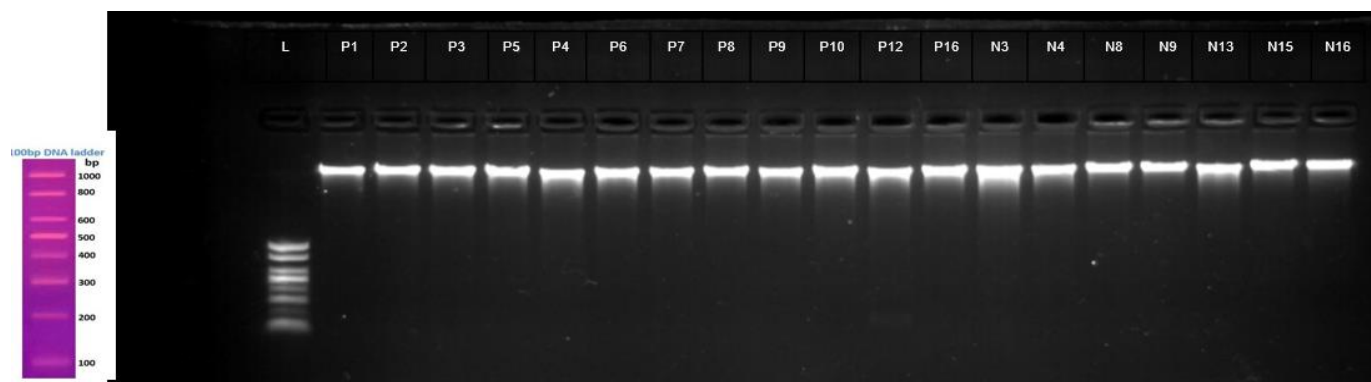
3.4.1.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα σκύλου με χρήση του PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen

Για να μετρήσουμε τις συγκεντρώσεις και την καθαρότητα των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν με τη χρήση του PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen χρησιμοποιήσαμε το μηχάνημα Quawell Q3000 UV Spectrophotometer. Τα αποτελέσματα είναι αυτά που φαίνονται στον Πίνακα 9. Παράλληλα, έγινε έλεγχος της ποιότητας του DNA των δειγμάτων και σε gel αгарόζης (Εικόνα 3.3.). Με τη χρήση του συγκεκριμένου κίτ είναι φανερό πως και οι λόγοι 260/280 βελτιώθηκαν και οι ποσότητες του DNA που απομονώθηκαν ήταν ικανοποιητικές. Ακόμη, με βάση την εικόνα που δίνουν στο gel αгарόζης, φαίνεται πως γίνεται σωστότερη ποσοτικοποίηση με το μηχάνημα Quawell Q3000 UV Spectrophotometer, μιας και η εικόνα που δίνει ο φθορισμός είναι ομοιόμορφη, με εξαίρεση τα δείγματα N10 και N22 που φαίνεται πως έχουν αρκετά πιο χαμηλό φθορισμό και στα οποία πιθανώς η μέτρηση να μην ήταν ακριβής. Τέλος, δε φαίνεται να υπάρχει “κατακερματισμένο” DNA.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με χρήση του PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™

α/α	Sample	260/280	ng/μl	α/α	Sample	260/280	ng/μl
1	N1	1,49	88,6	17	N22	1,16	153,1
2	N2	1,42	67,1	18	N24	1,51	41,2
3	N3	1,82	38,4	19	N25	1,54	101,5
4	N4	1,58	97,4	20	N26	1,52	77,5
5	N6	1,50	111,8	21	N27	1,42	80,3
6	N7	1,62	70,9	22	N28	1,55	36,4
7	N8	1,71	84,1	23	N29	1,49	52
8	N9	1,54	175,8	24	P1	1,62	58,6
9	N10	1,14	89,4	25	P2	1,72	72
10	N11	1,55	100	26	P3	1,78	66,4
11	N13	1,53	58,5	27	P4	1,60	60,4
12	N14	1,50	68,5	28	P5	1,64	51,8
13	N15	1,72	164	29	P6	1,69	50
14	N16	1,60	66	30	P7	1,67	73

15	N17	1,75	370,1	31	P8	1,78	161,8
16	N21	1,65	45,4	32	P9	1,57	62,5



Εικόνα 3.3.: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με χρήση του PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™. Ποσότητα DNA που φορτώθηκε στο gel από κάθε δείγμα ~90ng Πυκνότητα gel αгарόζης: 1%, Ladder:100bp, EnzyQuest

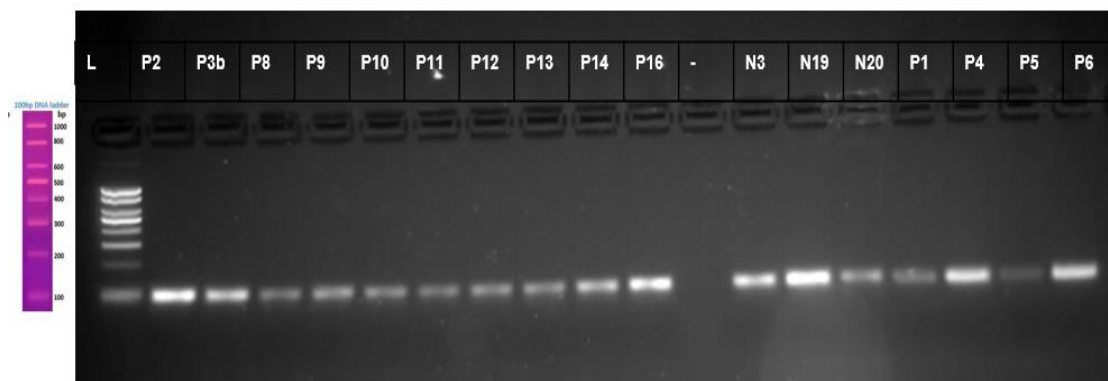
3.4.1.3. Απομόνωση DNA από γέλη αгарόζης (gel extraction)

Για να μετρήσουμε τις συγκεντρώσεις και την καθαρότητα των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν με τη χρήση του κίτ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της MACHEREY-NAGEL GmbH & Co χρησιμοποιήσαμε το μηχάνημα Quawell Q3000 UV Spectrophotometer. Τα αποτελέσματα είναι αυτά που φαίνονται στον Πίνακα 10. Παράλληλα, έγινε έλεγχος της ποιότητας του DNA των δειγμάτων και σε gel αгарόζης (Εικόνα 3.4.). Με βάση την εικόνα των δειγμάτων στο gel, μεταβλήθηκε κατ' εκτίμηση η συγκέντρωση κάποιων δειγμάτων καθώς παρόλο που η ποσότητα DNA που φορτώθηκε από κάθε δείγμα ήταν θεωρητικά η ίδια, ο φθορισμός τους στη πηκτική αгарόζης δεν ήταν παρόμοιος.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με gel extraction από δείγματα στα οποία είχε γίνει ενίσχυση με qPCR με τους primers L8. Με κόκκινο φαίνονται οι ποσότητες μετά τη διόρθωση που έγινε με βάση το gel αгарόζης.

	Sample	260/280	ng/μl
1	P1	1,23	29,2/ 73
2	P2	1,82	12,5/ 72
3	P3b	1,80	5,9/ 30
4	P4	1,40	9,5/ 47,5
5	P5	1,15	46,6/ 78
6	P6	2,07	6,6/ 38,8
7	P8	1,51	18/ 34
8	P9	1,62	13,2/ 33
9	P10	1,53	19,1/ 47,7
10	P11	1,47	10,1 / 25
11	P12	1,46	8,7/ 21,7
12	P13	1,51	18,1/ 45,3
13	P14	1,55	14,7/ 31
14	P16	1,68	19,2/ 79,9
15	N3	1,85	8,5/ 42,8

16	N19	1,83	10,5/ 78,8
17	N20	1,83	14,5/ 36,2



Εικόνα 3.4.: Εικόνα DNA σε gel αгарόζης μετά την απομόνωση με gel extraction. Ποσότητα DNA που φορτώθηκε στο gel από κάθε δείγμα ~60ng, Πυκνότητα gel αгарόζης: 2,5%, Ladder: 100bp, EnzyQuest

3.4.2. Αποτελέσματα ανάλυσης HRM

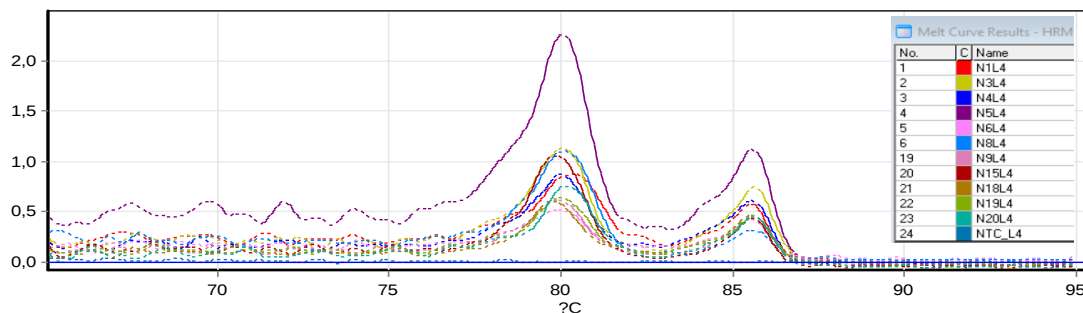
Στόχος του πειράματος ήταν να γίνει η ανάλυση HRM σε παρόμοιο αριθμό θετικών και αρνητικών δειγμάτων, για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών, το οποίο ουσιαστικά αντιστοιχεί σε ένα SNP, από αυτά που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία. Συνολικά ελέγχθηκαν 8 ζεύγη εκκινητών και έγιναν πολλαπλές αναλύσεις με ποικίλα αποτελέσματα, όπως θα περιγράψουν στη συνέχεια.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων, οι οποίες αποτυπώνουν το σήμα φθορισμού κάθε δείγματος έναντι του αριθμού κύκλου της αντίδρασης. Επιπλέον αξιοποιήθηκαν οι καμπύλες μεταβολής φθορισμού των δειγμάτων, στις οποίες εξετάστηκε η μεταβολή του φθορισμού σε σχέση με την θερμοκρασία της αντίδρασης και οι καμπύλες τήξης των δειγμάτων, οι οποίες φανερώνουν το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Στο Παράρτημα Β παρατίθενται αναλυτικά τα διαγράμματα ορισμένων δοκιμών με κάθε επιμέρους ζεύγος εκκινητών.

Επιπλέον, το λογισμικό της ανάλυσης HRM του μηχανήματος QIAGEN Rotor-Gene® Q real time PCR System, προσέφερε τη δυνατότητα σύγκρισης και ομαδοποίησης όλων των δειγμάτων μιας αντίδρασης μεταξύ τους, με βάση τη θερμοκρασία τήξης τους. Το αποτέλεσμα αυτής της ομαδοποίησης αποδόθηκε ως προς ένα πρότυπο δείγμα και με ένα ποσοστό εμπιστοσύνης επί τις εκατό (Confidence %) που ορίστηκε από τον χειριστή, ώστε να επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ομοιότητα των δειγμάτων. Όμοια δείγματα προέρχονται από άτομα με όμοιο γονότυπο ως προς το SNP που εξετάζεται, ενώ δείγματα που δεν εμφανίζουν ομοιότητες προέρχονται από άτομα με διαφορετικό γονότυπο. Η ομαδοποίηση που προέκυψε ανά ζεύγος εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 11.

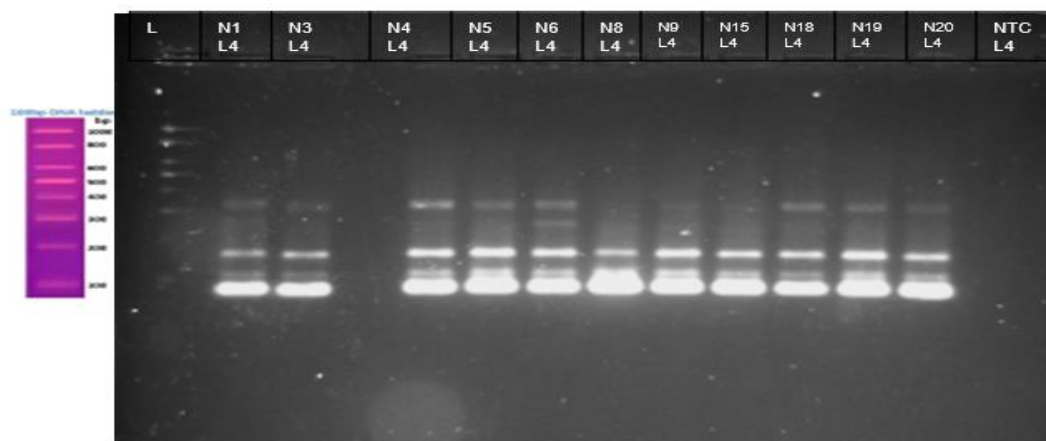
Παρουσία παραπροϊόντων αντίδρασης

Από το σύνολο των εκκινητών, τέσσερις (4) έδιναν πολλαπλά προϊόντα αντίδρασης, καθώς η εκάστοτε καμπύλη μεταβολής φθορισμού των δειγμάτων που ενισχύθηκαν με αυτά, εμφάνιζε πολλαπλές κορυφές (π.χ. Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5.: Καμπύλες μεταβολής φθορισμού για τα δείγματα N1, N3, N4, N5, N6, N8, N9, N15, N18, N19, N20 με τους primers L4. Φαίνεται πως υπάρχει παραπάνω από μια κορυφή σε καθεμία καμπύλη, γεγονός που δηλώνει πως οι primers δε δίνουν μοναδικό προϊόν αντίδρασης.

Οι εκκινητές αυτοί ήταν οι L3 (αντιστοιχεί στο SNP rs851268228), L4 (αντιστοιχεί στο SNP rs8971639), L8 (αντιστοιχεί στο SNP rs23149486) και L12 (αντιστοιχεί στο SNP rs853018892). Τα επιμέρους διαγράμματα μεταβολής φθορισμού συναρτήσκει θερμοκρασίας, όπου φαίνεται η ύπαρξη πολλαπλών κορυφών στις καμπύλες των δειγμάτων παραθέτονται στο Παράρτημα Β.

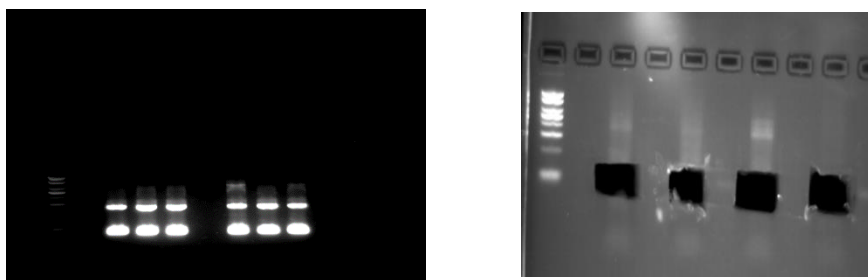


Εικόνα 3.6.: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης για τα δείγματα N1, N3, N4, N5, N6, N8, N9, N15, N18, N19, N20 με τους primers L4. Βλέπουμε πως δεν υπάρχει μοναδικό προϊόν αντίδρασης, καθώς έχουμε παραπάνω από μια ζώνες, διαφορετικών μεγεθών. Πυκνότητα gel αгарόζης: 2,5%, Ladder: 100bp, EnzyQuest

Για την καλύτερη οπτικοποίηση του αποτελέσματος, σε κάποιες από τις δοκιμές, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της ανάλυσης HRM, όπου και εμφανίστηκαν παραπάνω από μια ζώνες (π.χ. Εικόνα 3.6.) διαφορετικών μεγεθών, αντί για μια ζώνη κοντά στα 100 ζεύγη βάσεων, όπως αναμενόταν. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα των παραπροϊόντων, επιχειρήθηκε αλλαγή των συνθηκών της αντίδρασης για τους primers L4. Συγκεκριμένα το στάδιο του annealing/extension ρυθμίστηκε στους 65° C για 20 δευτερόλεπτα, όμως το αποτέλεσμα παρέμεινε το ίδιο (δίπλες κορυφές στη καμπύλη μεταβολής φθορισμού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία).

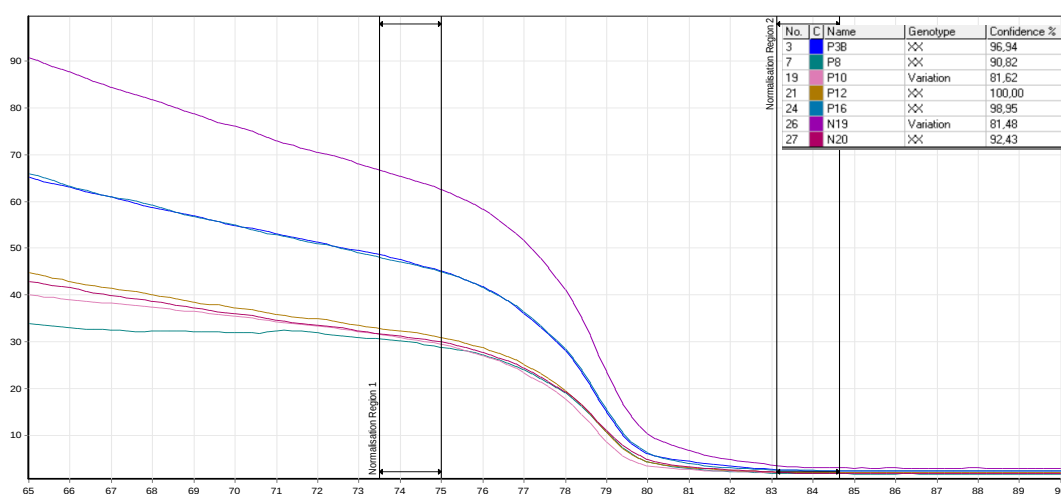
Ανάλυση δειγμάτων στα οποία εφαρμόστηκε η διαδικασία του gel extraction

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία gel extraction στα προϊόντα της αντίδρασης qPCR, με τους εκκινητές L8. Επιλέχθηκε το κομμάτι του gel το οποίο αντιστοιχούσε στο μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος (~100bp), καθώς υπήρχε σαφής διαφοροποίηση από τα υπόλοιπα προϊόντα της αντίδρασης (Εικόνα 3.7.).



Εικόνα 3.7.: Gel αγαρόζης προϊόντων ενίσχυσης δειγμάτων με το ζεύγος εκκινητών L8, στα οποία φαίνεται η παρουσία περισσοτέρων του ενός προϊόντων. Στη δεύτερη εικόνα φαίνεται το gel μετά την εκτομή των τεμαχίων που θα αξιοποιηθούν για το gel extraction..

Τα αποτελέσματα του extraction φαίνονται στον Πίνακα 9 και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε gel αγαρόζης στην Εικόνα 3.4. Καθώς δεν χρησιμοποιήθηκε ολικό γονιδιωματικό DNA, αλλά DNA μήκους μικρότερου από 100bp (re-PCR), για να πετύχει η ενίσχυση και να δοθεί ευκαιρία στη DNA πολυμεράση να πετύχει re-amplification απαιτήθηκε η χρήση template το οποίο περιείχε DNA σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Μετά από πολλαπλές δοκιμές, εκτιμήθηκε ως ιδανικότερη συγκέντρωση για τη συγκεκριμένη αντίδραση qPCR τα 50fg (1fg= 10^{-15} g). Λόγω αδυναμίας του μηχανήματος Quawell Q3000 να μετρήσει συγκεντρώσεις αυτής της τάξης, εκτελέστηκε μια αρχική αραίωση των δειγμάτων στα 50ng/μl και στη συνέχεια διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις ως τα 50fg/μl. Η παραπάνω διαδικασία είναι πιθανό να υποπέσει σε σφάλμα, καθώς εξαρτάται αρκετά από τους χειρισμούς του αναλυτή (όπως τυχόν λάθη στο πιπετάρισμα).



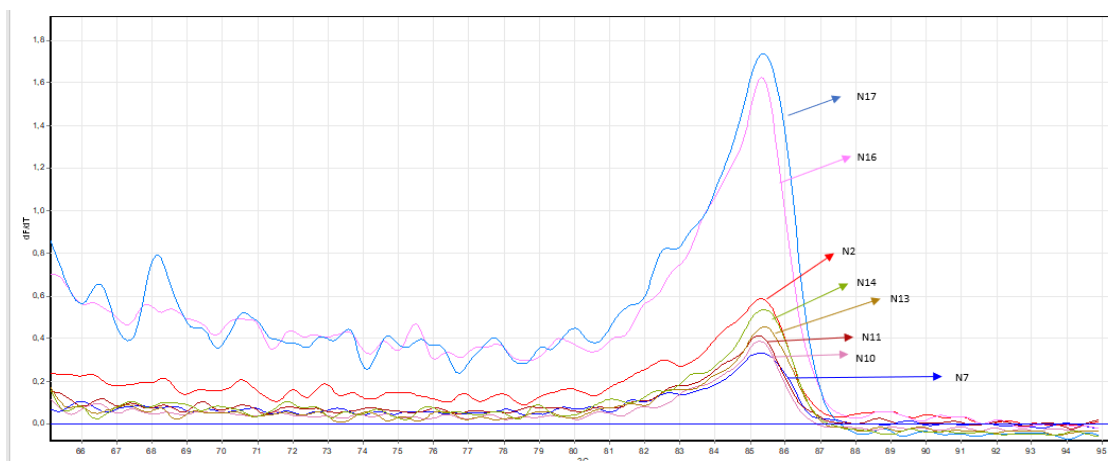
Εικόνα 3.8: Καμπύλες τήξης των δειγμάτων P3b, P8, P10, P12, P16, N19 και N20. Φαίνεται η διαφορά στον φθορισμό μεταξύ των δειγμάτων, η οποία πιθανώς να συνδέεται με διαφορετική αρχική συγκέντρωση DNA στο εκάστοτε δείγμα. Στον πίνακα φαίνεται η ομαδοποίηση με βάση το λογισμικό ως προς το δείγμα P12.

Στα αποτελέσματα, επιβεβαιώθηκαν οι μικρές αποκλίσεις στην αρχική ποσότητα του DNA των δειγμάτων όπως αυτή εμφανίζεται στο gel αγαρόζης της Εικόνας 3.4, λόγω της παρουσίας διακυμάνσεων στο Ct και το φθορισμό μεταξύ των δειγμάτων. Κατά την ανάλυση, διαχωρίστηκαν τα δείγματα σε ομάδες με βάση το φθορισμό τους στο διάγραμμα καμπυλών τήξης, ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ομαδοποίησή τους από το λογισμικό. Αν και διαπιστώθηκε κάποια ομαδοποίηση των δειγμάτων που εξετάστηκαν, μετά από τον υπόψη διαχωρισμό, δε κατέστη δυνατή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, καθώς η αξιοπιστία των δεδομένων δεν

μπορούσε να εκτιμηθεί με ακρίβεια λόγω της διαφοράς στο φθορισμό μεταξύ των δειγμάτων. Συμπερασματικά, φάνηκε πως το ζεύγος εκκινητών L8 δεν είναι το βέλτιστο δυνατό για τη μελέτη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, καθώς αφενός δε δίνει μοναδικό προϊόν αντίδρασης και συνεπώς είναι απαραίτητη η διαδικασία του gel extraction και αφετέρου διότι μετά το gel extraction διενεργούνται συνεχείς δεκαδικές αραιώσεις, οι οποίες απαιτούν πολλαπλούς χειρισμούς του αναλυτή, γεγονός που εκθέτει τη διαδικασία σε μεγαλύτερη πιθανότητα διενέργειας σφάλματος. Επομένως, αποφασίστηκε να μη διεξαχθούν επιπλέον πειράματα με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών.

Χαμηλή ένταση φθορισμού

Κατά την ανάλυση HRM με το ζεύγος εκκινητών L1 (αντιστοιχεί στο SNP rs22840096) παρατηρήθηκε σε όλες τις δοκιμές χαμηλή ένταση φθορισμού (<2 μονάδες). Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα η εικόνα των καμπυλών των επιμέρους δειγμάτων να μην είναι η επιθυμητή, καθώς εμφανιζόταν επιμέρους κορυφές γνωστές και ως «θόρυβος», που δεν επέτρεψαν τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9.: Καμπύλες Μεταβολής Φθορισμού για τα δείγματα N2new, N3, N7new, N8, N10new, N11new, N13new, N14new, N16new, N17new, N19 και N20 με τους primers L1. Ο φθορισμός είναι χαμηλός και φαίνεται να υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην ένταση του φθορισμού μεταξύ των δειγμάτων.

Επιπλέον, από τις καμπύλες μεταβολής φθορισμού (Εικόνα ΠΒ6) διαπιστώθηκε πρόβλημα στην ποσοτικοποίηση των δειγμάτων, διότι υπήρχαν διαφορές στο Ct μεταξύ των δειγμάτων συνεπώς η αρχική ποσότητα DNA που προστέθηκε στο διαλυμα της αντίδρασης πιθανώς δεν ήταν η ίδια για όλα. Κάποια από τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραματισμών, παρουσιάζονται στα διαγράμματα ΠΒ6 και ΠΒ7 του παραρτήματος Β. Καθώς ο χαμηλός φθορισμός που εμφάνιζε η ενίσχυση των δειγμάτων με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών δε μας επέτρεπε να εξαγάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την ομαδοποίηση των γονοτύπων ως προς το SNP που εξετάστηκε, αποφασίστηκε η διακοπή διενέργειας περαιτέρω δοκιμών και η δοκιμή ενός νέου ζεύγους εκκινητών.

Παρουσία προϊόντος στο negative control (Επιμόλυνση)

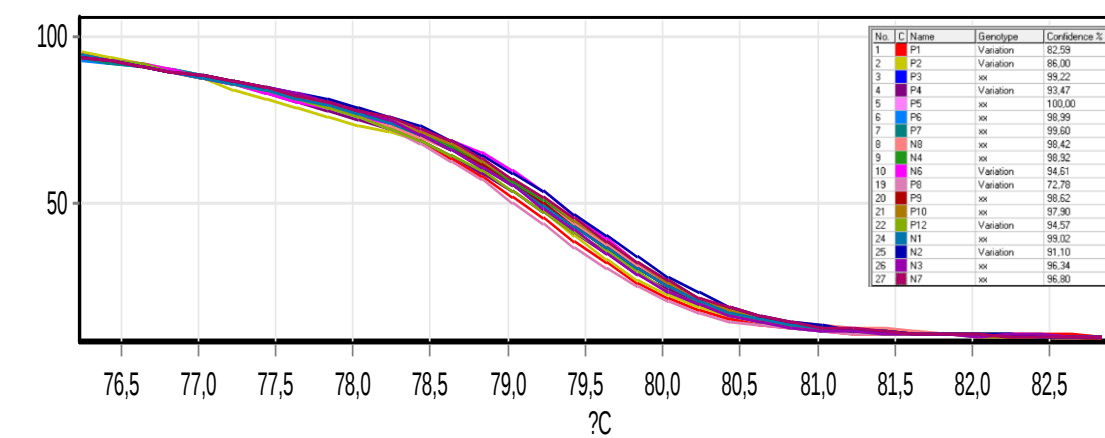
Κατά την ενίσχυση των δειγμάτων DNA που είχαν απομονωθεί με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης από τα αίματα των οροαρνητικών σκύλων με το ζεύγος εκκινητών L6 (αντιστοιχεί στο SNP rs24106521), διαπιστώθηκε αρχικά αρκετά καλή ενίσχυση (σχετικά υψηλός ο φθορισμός των δειγμάτων στις καμπύλες μεταβολής φθορισμού), μοναδική κορυφή στην καμπύλη μεταβολής φθορισμού κάθε

δείγματος (άρα και μοναδικό προϊόν αντίδρασης) και σχετικά καλή ομαδοποίηση στην καμπύλη της HRM. Όμως, τελικά, το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών δεν ήταν δυνατό να αξιοποιηθεί περαιτέρω διότι εμφάνιζε συνεχώς εικόνα επιμόλυνσης στο negative control. Τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος, όπου δεν εμφανίστηκε επιμόλυνση, φαίνονται στην Εικόνα ΠΒ7 του Παραρτήματος Β. Μετά την εμφάνιση της πρώτης επιμόλυνσης έγιναν πολλαπλές προσπάθειες να επαναληφθούν τα πειράματα με διαφορετικές συνθήκες ώστε να εξαλειφθεί. Επιχειρήθηκε η χρήση νέων, «καθαρών» συστατικών της αντίδρασης, νέας αραίωσης primers από το stock και νέου νερού. Επιπρόσθετα, υλοποιήθηκε η αντίδραση της HRM και με το Ssofast® EvaGreen® Mix και συμβατική PCR με την KaraTaq πολυμεράση και το PCR Kit της KAPABIOSYSTEMS και νέα dNTPs. Σε κάθε περίπτωση είχαμε επανεμφάνιση της επιμόλυνσης στο negative control, ακόμα και κατόπιν παραγγελίας νέων primers από την εταιρεία, οι οποίοι αραιώθηκαν υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Τέλος, έγινε χρήση filter tips, αλλαγή του πάγκου του εργαστηρίου, ακόμα και του αναλυτή που διενήργησε την αντίδραση για τον αποκλεισμό της πιθανότητας διαχειριστικών λαθών, όμως και πάλι στα αποτελέσματα της αντίδρασης εμφανιζόταν προϊόν και στο negative control. Συνεπώς, η προσπάθεια εγκαταλείφθηκε και δοκιμάστηκε ένα νέο σετ εκκινητών.

Αξιολογήσιμα Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα τα οποία μπόρεσαν να αξιολογηθούν τελικά αφορούσαν στους εκκινητές L7 (αντιστοιχεί στο SNP rs853018895) και L14 (αντιστοιχεί στο SNP rs22529878). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο σε δείγματα των οποίων το DNA είχε απομονωθεί με τη μέθοδο φαινόλη- χλωροφόρμιο- ισοαμυλική αλκοόλη, όσο και στα δείγματα των οποίων το DNA είχε απομονωθεί με το εμπορικό kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™

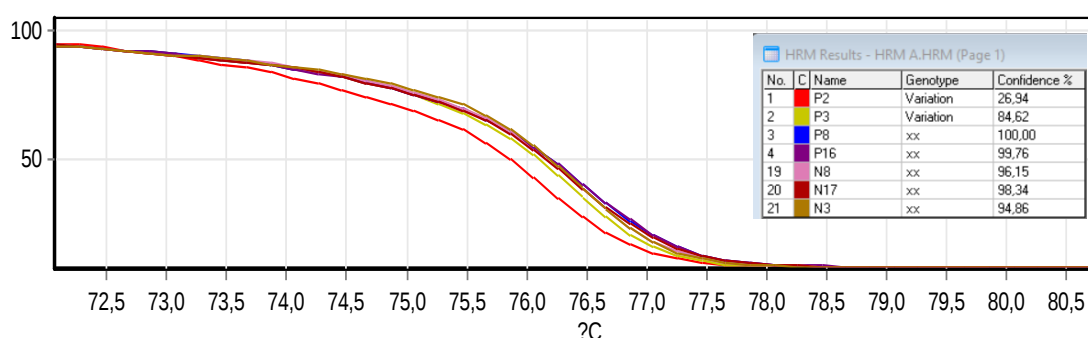
Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με το ζεύγος εκκινητών L7 εμφανίστηκαν αρχικά κάποια προβλήματα. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν οχτώ πειράματα. Σε ορισμένα διαπιστώθηκε επιμόλυνση στο negative control και συνεπώς τα αποτελέσματα τους δε λήφθηκαν υπόψη κατά την τελική ομαδοποίηση. Η προέλευση της επιμόλυνσης που εμφανίστηκε, εντοπίστηκε στο αρχικό stock των εκκινητών, συνεπώς χρειάστηκε να γίνει εκ νέου παραγγελία από την εταιρεία. Ακόμη, έγινε αντιληπτό πως οι συγκεκριμένοι εκκινητές δημιουργούσαν διμερή. Συγκεκριμένα, σε έναν πειραματισμό, εμφανίστηκε εικόνα επιμόλυνσης στο negative control στα



Εικόνα 3.10.: Διάγραμμα Κανονικοποιημένου Φθορισμού σε συνάρτηση με τη Θερμοκρασία για τα δείγματα P1-P10, P12, P16, N1-N4 και N6-N8 με τους primers L7. Αναπαρίσται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 95% στο 10%.

διαγράμματα της ανάλυσης HRM. Όταν το προϊόν αυτό «έτρεξε» σε gel αгарόζης, διαπιστώθηκε πως είναι διμερή εκκινητών (προϊόν πολύ μικρότερο από 100bp, διαφορετικό από τα προϊόντα των υπόλοιπων δειγμάτων). Από τα πειράματα τα αποτελέσματα των οποίων αξιολογήθηκαν επαρκώς, φάνηκε με βάση το λογισμικό και με ποσοστό εμπιστοσύνης 95% (Εικόνα 3.10.), να υπάρχει ομαδοποίηση σε κάποια από τα δείγματα του control group (*Leishmania negative animals*) με κάποια από τα δείγματα του test group (*Leishmania positive animals*). Συνεπώς, φαίνεται πως δεν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση του γονοτύπου για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό μεταξύ των θετικών και αρνητικών ζώων στα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν.

Για το ζεύγος εκκινητών L14 πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 πειράματα ανάλυσης HRM με τα αποτελέσματα να είναι ενθαρρυντικά, καθώς το προϊόν της αντίδρασης ήταν μοναδικό, δεν εμφανίστηκαν διμερή εκκινητών σε καμία αντίδραση, ούτε φάνηκε να υπάρχουν επιμολύνσεις. Επιπλέον, τα αρνητικά δείγματα που ενισχύθηκαν στα επιμέρους πειράματα φαίνεται να ομαδοποιήθηκαν όλα μεταξύ τους. Το ίδιο συνέβη και με αρκετά από τα θετικά δείγματα. Αποφασίστηκε επανάληψη του πειράματος στα δείγματα των οποίων το DNA είχε απομονωθεί με χρήση του PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™, καθώς ήταν ανώτερης ποιότητας, παρουσιάζοντας βελτιωμένους λόγους 260/280 και επιθυμητή εικόνα στο gel (απουσία κατακερματισμένου DNA). Επιπλέον, στο νέο πείραμα επιλέχθηκαν τόσο θετικά όσο και αρνητικά δείγματα, ώστε να φανεί αν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση μεταξύ τους, ως προς την παρουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού. Κατά τη διεξαγωγή του, τα θετικά και αρνητικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς στα προηγούμενα πειράματα (P8 και N3) ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους (Εικόνα 3.11.). Το αποτέλεσμα αυτό μας προβληματίζει καθώς φαίνεται πως κάποια από τα δείγματα του control group (*Leishmania negative animals*) ομαδοποιούνται με κάποια από τα δείγματα του test group (*Leishmania positive animals*) και συνεπώς, ίσως, δεν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση του γονοτύπου για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό μεταξύ των θετικών και αρνητικών ζώων στα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν.



Εικόνα 3.11: Διάγραμμα Κανονικοποιημένου Φθορισμού σε συνάρτηση με τη Θερμοκρασία για τα δείγματα P2, P3, P8, P16, N3, N8 και N17 με τους primers L14. Φαίνεται πως η καμπύλη του δείγματος P2 (κόκκινο χρώμα) διαφέρει κατά πολύ από τις υπόλοιπες, ενώ και η καμπύλη του δείγματος P3 (κίτρινο χρώμα) διαφοροποιείται ελαφρώς συγκριτικά με τις υπόλοιπες που φαίνεται πως ομαδοποιούνται.

Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα στο οποίο καταλήξαμε, αποφασίστηκε η επιλογή και αποστολή πέντε δειγμάτων του συγκεκριμένου πειράματος για αλληλούχηση κατά Sanger με τους primers L14.

Πίνακας 11: Πίνακας Αποτελεσμάτων Πειραμάτων HRM Ανάλυσης ανά Ζεύγος Εκκινητών

Εκκινητές	Αριθμός πειραμάτων	Δείγματα	Threshold	Ομαδοποίηση	Προβλήματα / Αποτελέσματα
L1	4	Φαινόλη-χλωροφόρμιο: N1-N11, N13-N20	>94%	Ως προς το N3 τα N2, N4, N5, N7, N8, N10, N11, N15, N16, N17, N18, N19, N20	Χαμηλός φθορισμός
L3	1	Φαινόλη-χλωροφόρμιο: N3,N17,N19	--	--	Παρουσία παραπροϊόντων αντίδρασης
L4	2	Φαινόλη-χλωροφόρμιο: N1, N3, N4, N5, N6, N8, N9,N15,N18N19,N20	--	--	Παρουσία παραπροϊόντων αντίδρασης
L6	10 (1 επιτυχές)	Φαινόλη-χλωροφόρμιο: N3,N16,N19, N20	95%	Ως προς το N3 τα N19 και N20	Στα επόμενα πειράματα εμφανίστηκε προϊόν στο negative control (πιθανώς επιμόλυνση)
L7	8	Φαινόλη-χλωροφόρμιο: N1- N7, N9, N14- N20	95%	Ως προς το N3 τα N4, N6, N9, N15 και N19	--
		Mini-Kit: P1- P10, P12, P16, N1-N4, N6-N8	95% 90%	Ως προς το P5 με 95% τα P3, P5, P6, P7, P9, P10, N1, N3, N4, N7 και N8, ενώ με 90% τα N2, N6, P4 και P12	Ομαδοποίηση κάποιων δειγμάτων του control group(negative) με του test group(positive)
L8	7	Φαινόλη-χλωροφόρμιο: N3, N19, N20, P1-P14,P16	--	--	Παρουσία παραπροϊόντων αντίδρασης
		Gel extracted samples: P1, P2, P3b, P4, P5, P6, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P16, N3, N19 και N20	90% (2 γκρουπ λόγω διαφορών στο φθορισμό)	Ως προς P5 τα P2, P4, P5, P9, P13, P14 και N3 Ως προς το P12 τα P3b, P8, P10, P12, P16 και N20	Ανάγκη συνέχων δεκαδικών αραιώσεων (επιθυμητή μικρή συγκέντρωση)
L12	1	N3, N19, N20	--	--	Παρουσία παραπροϊόντων αντίδρασης
L14	4	Φαινόλη-χλωροφόρμιο: N3, N4, N5, N9, N19 και N20, P1-P14, P16	95%	Ως προς N3 τα N4, N5, N9, N19,N20 Ως προς P8 τα P3, P7, P9, P10, P11, P12, P14 και P16	Ομαδοποίηση αρνητικών και θετικών μεταξύ τους στα επιμέρους πειράματα
		Mini Kit: P2, P3, P8, P16, N3, N8 και N17	94%	Ως προς το P8 τα P16, N17, N8 και N3	Ομαδοποίηση δειγμάτων αναφοράς προηγούμενων πειραμάτων (N3 και P8) μεταξύ τους →

					Ομαδοποίηση δειγμάτων control group με test group
--	--	--	--	--	---

3.5. Αποτελέσματα αλληλούχησης κατά Sanger

Συνολικά 5 δείγματα DNA στάλθηκαν σε εξωτερικό συνεργάτη για αλληλούχηση κατά Sanger (CeMIA SA, Cellular and molecular immunological applications), και συγκεκριμένα τα δείγματα P2,P3, P8, P16 και N3, το DNA των οποίων είχε απομονωθεί με χρήση του PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™. Επιλέξαμε να στείλουμε τα συγκεκριμένα δείγματα με βάση τα αποτελέσματα του τελευταίου πειράματος της ανάλυσης HRM για τους εξής λόγους: τα δείγματα P2 και P3 δεν ομαδοποιήθηκαν με τα υπόλοιπα δείγματα στο τελευταίο πείραμα, το δείγμα P16 ομαδοποιήθηκε με το P8 σε δυο συνεχόμενα πειράματα, ενώ τα δείγματα P8 και N3 χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς σε καθένα από τα επιμέρους πειράματα (θετικά/ αρνητικά), εντούτοις σε κοινή αντίδραση φάνηκε να ομαδοποιούνται και μεταξύ τους (Εικόνα 3.11.). Στα παραπάνω δείγματα έγινε αρχικά ενίσχυση με PCR υψηλής ακρίβειας με χρήση των εκκινήτων L14. Στη συνέχεια, το προϊόν της αντίδρασης «φορτώθηκε» σε gel αгарόζης, ώστε να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Ακολούθησε gel extraction με χρήση του κίτ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της MACHEREY-NAGEL GmbH & Co, ώστε να απομονωθεί εκ νέου το επιθυμητό τμήμα DNA κάθε δείγματος. Τα χαρακτηριστικά του DNA που απομονώθηκε με την παραπάνω διαδικασία φαίνονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με gel extraction από δείγματα στα οποία είχε γίνει ενίσχυση με PCR υψηλής ακρίβειας με τους primers L14.

Δείγμα	260/280	ng/μl
P2	1,86	10,8
P3	1,90	12,7
P8	1,77	13,5
P16	1,83	7,8
N3	1,65	16,7

Ζητήθηκε και έγινε αλληλούχηση κατά Sanger και με τον forward primer και με τον reverse primer, έτσι ώστε να μπορούμε να επαληθεύσουμε την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Το μέγεθος του δείγματος DNA στο οποίο θα γίνει αλληλούχηση είναι 96bp και θεωρείται αρκετά μικρό για την αλληλούχηση κατά Sanger, καθώς το ιδανικό εύρος μεγεθών των δειγμάτων είναι μεταξύ 100-999 bp.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger ελήφθησαν με τη μορφή χρωματογραφήματος. Συγκεκριμένα, αποτελούνταν από 10 χρωματογραφήματα, 2 για κάθε δείγμα, καθένα από τα οποία αντιστοιχούσαν στον forward και reverse primer. Η ανάγνωση των χρωματογραφήματων και η στοίχιση τους έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Geneious. Η σύγκριση έγινε τόσο μεταξύ των δειγμάτων όσο και μεταξύ των δειγμάτων και της πρότυπης αλληλουχίας του χρωμοσώματος 16 του σκύλου (*Canis lupus familiaris*, NC051820.1 16: 46,833,480-46,833,582).

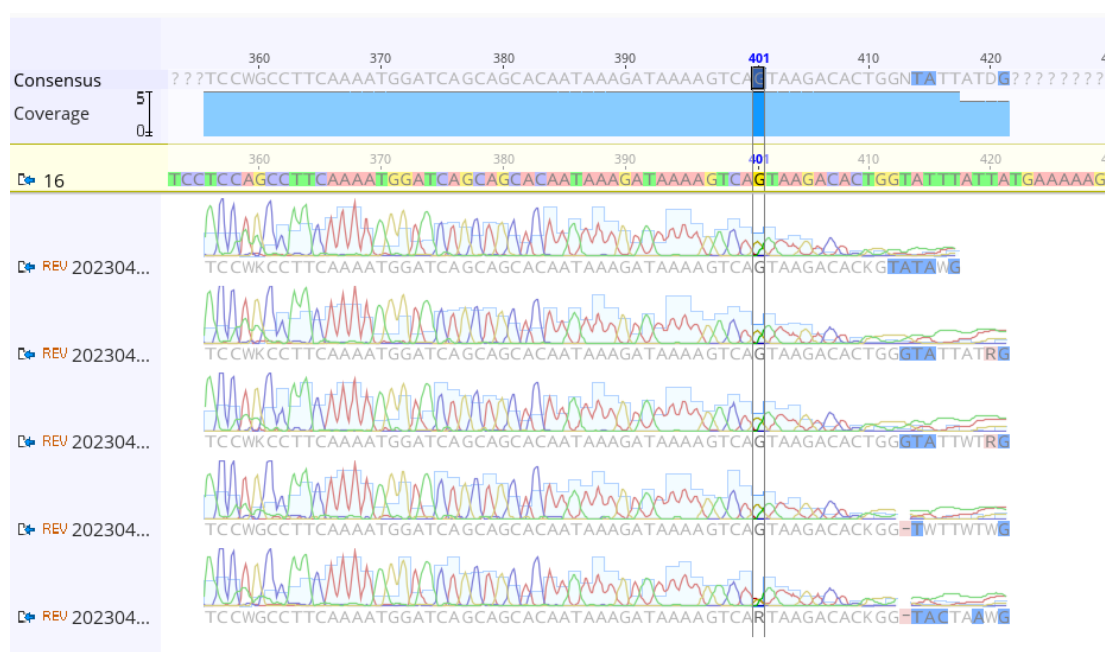
Ο forward primer φάνηκε να μη διαβάζει καλά την αλληλουχία καθώς υπήρχαν μεγάλα κενά στην αρχή της, αφού η ένταση του σήματος που έδινε η αντίδραση ήταν πολύ χαμηλή. Μια πιθανή εξήγηση για το αποτέλεσμα αυτό είναι ο εκκινητής μας να είναι κακής ποιότητας, και συγκεκριμένα να μη προσδένεται σωστά στην αλληλουχία στόχο. Επιπλέον, υπήρχαν σε κάποια σημεία άνισα κατανεμημένες κορυφές, κορυφές που αλληλεπικαλύπτονταν και παρουσία τεχνουργημάτων (artifacts) κάτω από τις κορυφές, γεγονότα που πιθανόν να συνδέονται με κακής ποιότητας DNA-πρότυπο, κακής ποιότητας εκκινητές ή παρουσία επιμολύνσεων στο δείγμα. Ακόμη, είναι πιθανό το μικρό μέγεθος της αλληλουχίας (μικρότερη των 100 βάσεων) να μην επιτρέπει τον προσδιορισμό της με μεγάλη ακρίβεια κατά την αλληλούχηση, καθώς το μήκος της αλληλουχίας που θεωρείται ιδανικό για την αλληλούχηση κατά Sanger είναι μεταξύ 100-999 βάσεων. Συγκριτικά με την πρότυπη αλληλουχία του χρωμοσώματος 16 του σκύλου φαίνεται να μην υπάρχει διαφοροποίηση στον πολυμορφισμό που μας αφορά σε κανένα από τα δείγματα, αφού εντοπίζεται σε όλα νουκλεοτίδιο με τη βάση G. Ωστόσο, η αλληλούχηση δε φαίνεται να είναι καλή κατά τα πρώτα στάδια (χαμηλή ένταση του σήματος φθορισμού, Εικόνα 3.12.), όπου και εντοπίζεται ο πολυμορφισμός ενώ και το πρόγραμμα Geneious που αξιοποιήθηκε για την απεικόνιση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων δίνει πολύ χαμηλό ποσοστό εμπιστοσύνης για την αλληλούχηση στη συγκεκριμένη θέση. Συνεπώς δε γνωρίζουμε αν το αποτέλεσμα της σύγκρισης είναι αξιόπιστο. Συμπερασματικά, αν και φαίνεται να μην υπάρχει διαφορά μεταξύ των συγκεκριμένων ατόμων ως προς τον πολυμορφισμό rs22529878 (χρωμόσωμα 16, θέση 46833531,G/A), τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger με το συγκεκριμένο primer δε μπορούν να αξιολογηθούν επαρκώς ώστε να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα.



Εικόνα 3.12.: Αποτελέσματα αλληλούχησης κατά Sanger με τη μορφή χρωματογραφήματος και στοίχιση τους στο πρόγραμμα Geneious. Βλέπουμε πως στη θέση του πολυμορφισμού (θέση 401, εντός των πλαισίων) εντοπίζεται σε όλα τα δείγματα το νουκλεοτίδιο με τη βάση G. Τα δείγματα είναι με τη σειρά τα 1. P2, 2.P3, 3.P8, 4.P16, 5.N3, 6.Canis lupus familiaris, NC051820.1 16: 46,833,480-46,833,582, και η αλληλούχηση έχει γίνει με τον primer L14 forward.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης με τον reverse primer ήταν καλύτερα σε σχέση με τον forward, όμως και πάλι υπήρχαν προβλήματα. Η ένταση του σήματος φθορισμού κατά τα αρχικά στάδια της αντίδρασης ήταν και πάλι χαμηλή, ενώ υπήρχαν σε κάποια σημεία άνισα κατανεμημένες κορυφές, κορυφές που αλληλεπικαλύπτονταν και παρουσία τεχνουργημάτων κάτω από τις κορυφές. Η χαρτογράφηση των αλληλουχιών

στο χρωμόσωμα 16 έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Geneious και φάνηκε (Εικόνα 3.13.) πως πλην ενός δείγματος, όλα τα υπόλοιπα είχαν στη θέση που αναμέναμε να εμφανιστεί ο πολυμορφισμός νουκλεοτίδιο με τη βάση G. Το δείγμα P2 ήταν το μόνο που διέφερε, καθώς στη συγκεκριμένη θέση η αλληλούχηση είχε αντιστοιχήσει το γράμμα R, το οποίο μπορεί να είναι είτε αδενίνη(A) είτε γουανίνη (G). Ωστόσο, όταν έγινε σύγκριση των δυο αποτελεσμάτων της αλληλούχησης του δείγματος P2(με τον forward και με τον reverse primer), φάνηκε πως ο forward στη συγκεκριμένη θέση εντόπιζε νουκλεοτίδιο με τη βάση G. Συνεπώς, πιθανότατα το δείγμα δε διαβάστηκε σωστά στη συγκεκριμένη θέση με τον reverse primer και για αυτό φάνηκε να υπάρχει αυτή η διαφοροποίηση συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Όμως, καθώς η ένταση του σήματος φθορισμού στη συγκεκριμένη περιοχή που εντοπίζεται ο πολυμορφισμός είναι αρκετά χαμηλή και το πρόγραμμα δίνει πολύ χαμηλό ποσοστό εμπιστοσύνης για την αλληλούχηση στη συγκεκριμένη θέση, δε μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.



Εικόνα 3.13.: Αποτελέσματα αλληλούχησης κατά Sanger με τη μορφή χρωματογραφήματος και στοίχιση τους στο πρόγραμμα Geneious. Βλέπουμε πως στη θέση του πολυμορφισμού (θέση 401, εντός των πλαισίων) εντοπίζεται σε όλα τα δείγματα το νουκλεοτίδιο με τη βάση G, πλην του τελευταίου δείγματος (P2) στο οποίο φαίνεται να υπάρχει το γράμμα R, που αντιστοιχεί είτε σε αδενίνη(A) είτε σε γουανίνη(G). Τα δείγματα είναι με τη σειρά τα 1. *Canis lupus familiaris*, NC051820.1 16: 46,833,480-46,833,582, 2.N3, 3.P8, 4. P16 5. P3, 6.P2 και η αλληλούχηση έχει γίνει με τον primer L14 reverse.

Συνεπώς, αν και φαίνεται να μην υπάρχει διαφορά μεταξύ των δειγμάτων στην παρουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger με το συγκεκριμένο primer δε μπορούν επίσης να αξιολογηθούν επαρκώς ώστε να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα.

Συμπεράσματα - Συζήτηση

Η λείσμανίαση του σκύλου αποτελεί ένα πολυσυστηματικό νόσημα, με ευρεία διασπορά και χρόνια εξέλιξη, που εκδηλώνεται με ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων και κλινικών συμπτωμάτων, τα οποία είναι συχνά δύσκολα αντιμετωπίσιμα^{71,81}. Αυτός ο κλινικός πολυμορφισμός που εμφανίζεται μεταξύ των ασθενών με λείσμανίαση έχει αποδοθεί σε ένα σύνολο παραγόντων που περιλαμβάνουν τη μολυσματική ικανότητα του παράσιτου, το μέγεθος του παρασιτικού φορτίου, το γενετικό υπόβαθρο και την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή²⁰. Επιπροσθέτως, η νόσος έχει βαρύ οικονομικό αντίκτυπο διότι απαιτεί υψηλό κόστος θεραπείας καθώς και ανάγκη για αγωγή συντήρησης σε συνδυασμό με απαίτηση για συνεχή παρακολούθηση από κτηνίατρο με ειδικές διαγνωστικές εξετάσεις εφ' όρου ζωής⁷⁸. Η λεκάνη της Μεσογείου είναι μια περιοχή ενδημική για τη λείσμανίαση του σκύλου³⁸, με τη νόσο να αποτελεί ένα σημαντικό κτηνιατρικό πρόβλημα και να εγείρει ανησυχίες και για τη δημοσία υγεία, καθώς το παράσιτο *L.infantum* μπορεί να προσβάλει και τους ανθρώπους. Επιπλέον, εν μέσω της κλιματικής αλλαγής και των δημογραφικών μεταβολών των τελευταίων δεκαετιών, είναι πιθανό να διευρυνθεί η περιοχή δράσης των φορέων, με άμεσο αποτέλεσμα τόσο την εξάπλωση όσο και την αύξηση του επιπολασμού της λείσμανίασης³⁸. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, γίνεται εύκολα αντιληπτή η ανάγκη οργανωμένων προσπάθειών για την επιτήρηση της νόσου και την πρόληψη της διασποράς της. Στο πλαίσιο αυτό αναμφίβολα θα συνεισφέρουν και δεδομένα, αναφορικά με το ρόλο του γενετικού υποβάθρου των σκύλων «ασθενών» στην πορεία της νόσου, ένα πεδίο έρευνας στο οποίο κινήθηκε και η παρούσα εργασία. Καθώς λοιπόν τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα είναι σχετικά περιορισμένα, μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να εξερευνήσουν διεξοδικά κάποιες πτυχές που χρίζουν περαιτέρω ανάλυσης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν αρχικά η αναζήτηση στη βιβλιογραφία γενετικών βιοδεικτών που πιθανά να σχετίζονται με τον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης και της συνεπακόλουθης εξέλιξης της ασθένειας σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο *L. Infantum*. Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η διερεύνηση μέσω της ανάλυσης HRM της παρουσίας των συγκεκριμένων γενετικών βιοδεικτών σε σκύλους εργασίας των φυλών Μαλινουά (Malinois) και Γερμανικούς Ποιμενικούς (German Shepherd), με στόχο να αποδειχτεί η πιθανή συσχέτιση τους με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ή ευαισθησία των σκύλων αυτών στη μόλυνση από το παράσιτο.

4.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η βιβλιογραφική ανασκόπηση έγινε με αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων και η επιλογή των μελετών έγινε σε τρία στάδια. Το σημαντικότερο κριτήριο που τέθηκε για την επιλογή τους ήταν οι μελέτες να παρουσιάζουν συσχέτιση μεταξύ γενετικών παραγόντων του σκύλου, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών πολυμορφισμών, και την ανθεκτικότητα/ ευαισθησία στη λείσμανίαση ή την ανοσολογική απόκριση στη

λοίμωξη από το παράσιτο *L. infantum* ή το παρασιτικό φορτίο της *L. infantum* ή την κλινική εικόνα των σκύλων που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο. Οι μελέτες που τελικά επιλέχθηκαν ήταν οκτώ, το χρονικό εύρος το οποίο κάλυπταν ήταν από το 2003 έως το 2020 και αφορούσαν συγκεκριμένα σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs). Από τις παραπάνω μελέτες επιλέχθηκαν συνολικά 8 SNPs και σχεδιάστηκαν οι αντίστοιχοι εκκινητές με στόχο να διερευνηθεί μέσω της ανάλυσης HRM η χρησιμοποίησή τους ως γενετικοί βιοδείκτες που πιθανόν να σχετίζονται με τον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης και της συνεπακόλουθης εξέλιξης της ασθένειας σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο *L. infantum*. Από αυτά τα SNPs, τα πέντε σχετίζονται με ευαισθησία και τα τρία με ανθεκτικότητα των σκύλων αυτών στη μόλυνση από το παράσιτο.

4.2. Μέγεθος δείγματος και ομαδοποίηση

Το δείγμα των σκύλων που συμμετείχε στη μελέτη αποτελούνταν από 36 σκύλους εργασίας των φυλών Μαλινουά και Γερμανικού Ποιμενικού. Από αυτούς οι 16 ήταν θετικοί στα αποτελέσματα των ορολογικών δοκιμών για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *L. infantum* (Test Group) και οι 20 αρνητικοί (Control Group). Το μέγεθος του δείγματος που αξιολογήθηκε θα ήταν σκόπιμο να αυξηθεί, για να αυξηθεί και η ισχύς (power) της στατιστικής ανάλυσης. Επιπλέον η ομαδοποίηση του δείγματος αποκλειστικά με βάση τα αποτελέσματα ορολογικών δοκιμών ενέχει ορισμένους κινδύνους μη σωστής ταξινόμησης. Η απουσία αντισωμάτων έναντι της *L. infantum* στον ορό του αίματος του σκύλου δεν ταυτίζεται με την απουσία ή την παρουσία του παρασίτου στον οργανισμό. Η απουσία των αντισωμάτων μπορεί να δηλώνει είτε πως ο σκύλος δεν έχει έρθει σε επαφή με το παράσιτο κάποια στιγμή της ζωής του (και ως κατοικεί σε εξωτερικό χώρο), είτε πως έχει έρθει σε επαφή αλλά έχει καταφέρει το ανοσοποιητικό του να καταπολεμήσει εγκαίρως το παράσιτο πριν την παραγωγή αντι-*L. infantum* αντισωμάτων.

4.3. Μέθοδοι Απομόνωσης DNA

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα ολικού αίματος έγινε με 2 τρόπους, με πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης και με χρήση του εμπορικού kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η απομόνωση του DNA με χρήση του εμπορικού kit, έδωσε DNA καλύτερης ποιότητας σε σύγκριση με αυτό που απομονώθηκε με το πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφόρμιου- ισοαμυλικής αλκοόλης. Με τη χρήση του kit φαίνεται πως και η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε είναι ικανοποιητική και η ποιότητα είναι βελτιωμένη, καθώς και ο λόγος 260/280 είναι πλησιέστερα στο 1,8 και η εικόνα των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση ίδιων ποσοτήτων (είχε προηγηθεί μέτρηση με το μηχάνημα Quawell Q300) σε gel αγαρόζης είναι ομοιόμορφη (Εικόνα 3.3) σε αντίθεση με το έτερο πρωτόκολλο (Εικόνες 3.1 και 3.2). Πολύ σημαντική είναι επίσης η απουσία κατακερματισμένου DNA στα δείγματα που η απομόνωση έγινε με το εμπορικό kit, σε σύγκριση με τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης, όπου η εικόνα αυτή εμφανίζονταν συχνά (Εικόνες 3.1-3.2). Τα παραπάνω δεδομένα, συνεπώς, μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως η απομόνωση DNA με χρήση του εμπορικού kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™ έχει ως αποτέλεσμα DNA καλύτερης ποιότητας, που επιτρέπει την ορθότερη ποσοτικοποίησή του με τη χρήση του μηχανήματος Quawell Q300, γεγονός που αποτελεί προϋπόθεση για την επιτυχή έκβαση της ανάλυσης HRM.

4.4. Ανάλυση Καμπυλών Τήξης Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRM)

Στόχος του πειράματος ήταν να γίνει η ανάλυση καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM) σε παρόμοιο αριθμό θετικών και αρνητικών δειγμάτων, για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών, το οποίο ουσιαστικά αντιστοιχεί σε ένα SNP, από αυτά που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία. Ιδανικά, θα θέλαμε τα δείγματα να ομαδοποιηθούν ως προς την παρουσία ή την απουσία του πολυμορφισμού με βάση το φαινότυπό τους. Η ανάλυση των δειγμάτων είχε ποικίλα αποτελέσματα. Συνολικά αξιολογήθηκαν οκτώ ζεύγη εκκινητών, οι οποίοι ενίσχυαν την περιοχή του γονιδιώματος στην οποία εντοπίζονταν τα SNPs που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία. Με εξαίρεση δυο ζεύγη εκκινητών, οι περισσότεροι παρουσίασαν τεχνικά ζητήματα που δεν επέτρεψαν την εξαγωγή σαφών αποτελεσμάτων σχετικά με την παρουσία ή απουσία του εκάστοτε πολυμορφισμού στα δείγματα τα οποία αξιολογήθηκαν.

Τα ζεύγη εκκινητών L3, L4, L8 και L12, τα οποία αντιστοιχούν στα SNPs rs851268228, rs8971639, rs23149486 και rs853018892, δεν έδιναν μοναδικό προϊόν αντίδρασης, αλλά εμφάνιζαν παραπροϊόντα, όπως φαίνεται από το εκάστοτε διάγραμμα μεταβολής φθορισμού συναρτήσει θερμοκρασίας στα οποία παρατηρούνται παραπάνω της μιας κορυφές. Το γεγονός αυτό πιθανώς να είναι επακόλουθο μη ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών που σχεδιάστηκαν.

Για να αντιμετωπιστεί σε ένα βαθμό το παραπάνω ζήτημα, έγινε προσπάθεια απομόνωσης DNA από gel αгарόζης (gel extraction), μόνο της ζώνης του προϊόντος που μας ενδιέφερε για το σετ εκκινητών L8 και επανάληψη της ανάλυσης HRM. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το πρόβλημα που προέκυψε ήταν πως δεν υπήρχε αντικειμενικός τρόπος μέτρησης της αρχικής συγκέντρωσης του DNA των συγκεκριμένων δειγμάτων. Τα δείγματα προέρχονταν από συνεχόμενες δεκαδικές αραιώσεις από τα 50 ng/μl στα 50 fg/μl (όπου 1fg= 10⁻¹⁵ g) και τόσο μικρές ποσότητες είναι μη μετρήσιμες με το μηχάνημα Quawell Q3000. Συνεπώς, αν και υπήρξε κάποια ομαδοποίηση των δειγμάτων που εξετάστηκαν μετά από τον διαχωρισμό τους με βάση την ένταση του φθορισμού που εμφάνισαν κατά την αντίδραση, δε μπορούμε να συμπεράνουμε αν τα αποτελέσματα αυτά είναι αξιόπιστα και αν μπορούν να αξιολογηθούν επαρκώς.

Για το ζεύγος εκκινητών L6, που αντιστοιχεί στο SNP rs24106521, ενώ αρχικά οι ενδείξεις της ανάλυσης HRM ήταν θετικές, καθώς υπήρχε αρκετά καλή ενίσχυση των δειγμάτων, μοναδική κορυφή στην καμπύλη μεταβολής φθορισμού κάθε δείγματος (άρα και μοναδικό προϊόν αντίδρασης) και σχετικά καλή ομαδοποίηση στην καμπύλη της HRM, τελικά δεν ήταν δυνατό να αξιοποιηθεί περαιτέρω διότι εμφανίζονταν συνεχώς εικόνα επιμόλυνσης στο negative control, την οποία δεν καταφέραμε να αντιμετωπίσουμε ακόμη και με τη χρήση νέων καθαρών υλικών.

Το ζεύγος εκκινητών L1, που αντιστοιχεί στο SNP rs22840096, είχε επίσης θετικές ενδείξεις, όμως η ενίσχυση των δειγμάτων με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών εμφάνιζε αρκετά χαμηλό φθορισμό, ο οποίος δε μας επέτρεπε να εξαγάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την ομαδοποίηση των γονοτύπων ως προς αυτό. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται σε κακή πρόσδεση των εκκινητών στο DNA-εκμαγείο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόδοση της αντίδρασης.

Το ζεύγος εκκινητών L7, που αντιστοιχεί στο SNP rs24210895, αξιοποιήθηκε για πολλαπλά πειράματα στα δείγματα των οποίων το DNA είχε απομονωθεί και με τα δυο διαφορετικά πρωτόκολλα. Αρχικά, φάνηκε πως οι συγκεκριμένοι εκκινητές

δημιουργούσαν διμερή, καθώς σε ένα πείραμα που εμφανίστηκε εικόνα επιμόλυνσης στο negative control στα διαγράμματα της ανάλυσης HRM, όταν το προϊόν αυτό ηλεκτροφορήθηκε σε gel αгарόζης, η εικόνα που δόθηκε ήταν αυτή που αντιστοιχεί σε διμερή εκκινητών (προϊόν πολύ μικρότερο από 100bp, διαφορετικό από τα προϊόντα των υπόλοιπων δειγμάτων). Στο σύνολο των πειραμάτων φάνηκε πως κάποια από τα δείγματα του control group (*Leishmania negative animals*) ομαδοποιούνται με κάποια από τα δείγματα του test group (*Leishmania positive animals*). Συνεπώς, φαίνεται πως δεν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση του γονοτύπου για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό μεταξύ των θετικών και αρνητικών ζώων στα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν. Όμως, το δείγμα το οποίο εξετάστηκε είναι μικρό, και δε μπορούμε να εξάγουμε αντικειμενικά συμπεράσματα. Τέλος, οι διαφορές που εντοπίζονται στη σχεδίαση των πειραμάτων της ομάδας μας και της ομάδας των Batista et al.¹³³ είναι επίσης πιθανό να αποτελούν αιτίες που ενώ το SNP rs24210895 φάνηκε να αποτελεί βιοδείκτη στη προγενέστερη μελέτη καθώς υπάρχουν σημαντικές μεταβολές στην παρουσία ή απουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ανάμεσα στα ζώα των δυο διαφορετικών ομάδων, στα δικά μας πειράματα δε φάνηκε να υπάρχει σαφής διαφοροποίηση του γονοτύπου μεταξύ των θετικών και αρνητικών ζώων. Η ομάδα των Batista et al.¹³³ μελέτησε το συγκεκριμένο SNP σε σκύλους διαφορετικών φυλών που κατοικούν σε ενδημικές περιοχές της Βραζιλίας (Λατινική Αμερική) και τους οποίους χώρισε σε 2 ομάδες, την ομάδα των νοσούντων ζώων (παρουσίαζαν συμπτώματα λείσμανιάσης ή/και χαρακτηρίστηκαν θετικά σε ένα τουλάχιστον από τα τεστ διάγνωσης) και την ομάδα ελέγχου που ήταν ζώα αρνητικά σε όλες τις διαγνωστικές δοκιμές (PCR, anti-*L. infantum* IgG ELISA). Αντίθετα, τα δείγματα της δικής μας μελέτης ήταν συγκεκριμένα από σκύλους εργασίας των φυλών Malinois και German Shepherd της ευρύτερης περιοχής της Θεσσαλίας και της Φθιώτιδας (ενδημικές για τη λείσμανιάση περιοχές, όμως σε διαφορετική ήππειρο), ενώ η ομαδοποίηση έγινε μόνο με βάση την κλινική εικόνα και τα αποτελέσματα ορολογικών εξετάσεων δυο διαδοχικών ετών. Συνεπώς, καθώς το γενετικό υπόβαθρο και οι συνθήκες διαβίωσης αποτελούν σημαντικούς προδιαθετικούς παράγοντες για τη λείσμανιάση, αλλά και οι επιμέρους εργαστηριακές τεχνικές εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα κατά τη διάγνωση της νόσου, είναι πιθανό οι διαφορές που εντοπίζονται στο σχεδιασμό των δυο πειραμάτων να είναι το αίτιο για την απόκλιση που εμφανίζεται στα αποτελέσματά τους.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης HRM για το ζεύγος εκκινητών L14 ήταν αρκετά ενθαρρυντικά αρχικά, καθώς ομαδοποίησαν μεταξύ τους αντίστοιχα αρκετά θετικά και αρνητικά δείγματα με ποσοστό εμπιστοσύνης 95%. Το τελικό πείραμα περιείχε αρνητικά και θετικά δείγματα και μάλιστα συμπεριλάμβανε τα δείγματα αναφοράς των προηγούμενων πειραμάτων, δηλαδή τα δείγματα με βάση τα οποία ομαδοποιήθηκαν τα υπόλοιπα. Στο συγκεκριμένο πείραμα, τα δείγματα αναφοράς ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους με ποσοστό εμπιστοσύνης >95%. Το αποτέλεσμα αυτό μας προβλημάτισε καθώς φαίνεται πως κάποια από τα δείγματα του control group (*Leishmania negative animals*) ομαδοποιούνται με κάποια από τα δείγματα του test group (*Leishmania positive animals*) και συνεπώς ίσως δεν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση του γονοτύπου για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό μεταξύ των θετικών και αρνητικών ζώων στα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν. Για να επιβεβαιώσουμε το συγκεκριμένο συμπέρασμα, αποφασίστηκε να σταλούν κάποια δείγματα για αλληλούχηση κατά Sanger, αφού ενισχυθούν με PCR μεγάλης ακρίβειας με τους primers L14. Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως όλα τα δείγματα ήταν όμοια μεταξύ τους όσον αφορά την παρουσία του πολυμορφισμού rs22529878. Καθώς δεν ομαδοποιούνταν στην HRM όλα τα δείγματα που στείλαμε, προκύπτει μία ασυμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων.

Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην παρουσία διαφορετικού πολυμορφισμού από αυτόν που μελετάμε, στα δείγματα που διαφοροποιούνται κατά την ανάλυση HRM, είτε στην κακή ποιότητα της αλληλούχησης κατά Sanger, η οποία περιεγράφηκε προηγουμένως. Συνεπώς το χαμηλό ποσοστό εμπιστοσύνης, όπως αυτό δίνεται από το πρόγραμμα Geneious, στο σημείο του υπό μελέτη πολυμορφισμού, κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Sanger, δε μας επιτρέπει να συμπεράνουμε με ασφάλεια εάν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση του γονοτύπου για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό μεταξύ των θετικών και αρνητικών ζώων στα εξεταζόμενα δείγματα. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός μελετήθηκε αρχικά από την ομάδα των Soutter et. al.¹³⁵, οι οποίοι εξέτασαν SNPs σε γονίδια που συνδέονται με την ανοσολογική απόκριση των σκύλων στη μόλυνση από το παράσιτο *L. infantum*. Οι ομοιότητες μεταξύ της μελέτης τους και του πειράματός μας είναι αρκετές, όμως εντοπίζονται κάποιες διαφοροποιήσεις στο σχεδιασμό. Αν και οι ομάδες που χωρίστηκαν τα ζώα ήταν μικρές και στα δύο πειράματα, οι Soutter et. al.¹³⁵ μελέτησαν σκύλους φυλής Beagle, ενώ εμείς Malinois και German Shepherd. Επιπλέον, για την κατάταξη των ζώων στις δύο διαφορετικές ομάδες, εκτός από την κλινική εικόνα, τις βιοχημικές και τις ορολογικές εξετάσεις, η ομάδα των Soutter et. al. αξιοποίησε και το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR για την ανίχνευση του DNA του παρασίτου. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ακριβέστερη ομαδοποίηση και προκύπτουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα, η ομάδα των Soutter et al.¹³⁵ βρήκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο μεμονωμένου SNP μεταξύ του SNP rs22529878 και της ευαισθησίας των σκύλων στη λείσμανίαση, όμως όταν τα αποτελέσματα διορθώθηκαν για πολλαπλές δοκιμές, η συσχέτιση δε φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική. Στους δικούς μας πειραματισμούς, αντιθέτως, φαίνεται να μην ανιχνεύονται διαφορές μεταξύ των θετικών και αρνητικών ζώων, όμως όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η παρουσία προβλημάτων στον πειραματισμό και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Επομένως, από το σύνολο των δοκίμων, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η ανάλυση HRM είναι μια αξιόπιστη, οικονομική και γρήγορη μέθοδος μελέτης γενετικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση του ξενιστή και την εξέλιξη της ασθένειας στη λείσμανίαση του σκύλου, καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη αξιολόγηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα με μεγάλη ακρίβεια και χωρίς να είναι απαραίτητη η προμήθεια πολυδάπανων αντιδραστηρίων ή επιπλέον εργαστηριακού εξοπλισμού. Όμως, για να είναι επιτυχής η ανάλυση και τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν να μπορούν να ερμηνευθούν με ασφάλεια φάνηκε πως πρέπει να ισχύουν ορισμένες προϋποθέσεις. Αρχικά, ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών αυξάνει την ακρίβεια και την ευαισθησία της αντίδρασης, καθώς αποφεύγεται η παρουσία παραπροϊόντων (πχ διμερή) και ο χαμηλός φθορισμός των δειγμάτων λόγω μη ειδικής σύνδεσης των εκκινητών. Επιπρόσθετα, η σωστή ποσοτικοποίηση των δειγμάτων DNA είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι η διαφορά που εντοπίζεται στις αρχικές συγκεντρώσεις του DNA των διαφορετικών δειγμάτων φαίνεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης HRM. Τέλος, το μέγεθος του δείγματος που αξιολογείται είναι μείζονος σημασίας καθώς η αύξηση του δείγματος αυξάνει τη στατιστική ισχύ της ανάλυσης, ενώ παράλληλα ισχυροποιείται το ενδεχόμενο παρουσίας περισσοτέρων γονοτύπων.

4.5. Μελλοντικές προοπτικές

Λαμβάνοντας υπόψη την τρέχουσα βιβλιογραφία, τα δεδομένα και τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας, αλλά και τα κλινικά δεδομένα των τελευταίων ετών αναφορικά με τη λείσμανίαση, προκύπτει αναμφίβολα ένα ευρύ πεδίο μελλοντικής έρευνας με

ποικίλες κατευθύνσεις και προοπτικές. Σε συνέχεια της παρούσας εργασίας προτείνεται να γίνει αρχικά πιο εκτεταμένη δειγματοληψία, με συμμετοχή περισσότερων ατόμων τόσο στην ομάδα των νοσούντων όσο και των υγείων σκύλων, ώστε το μέγεθος του δείγματος να επιτρέπει τη κατάλληλη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και να αυξηθεί η αξιοπιστία τους. Επιπλέον θα μπορούσε να καλυφθεί ευρύτερη γεωγραφική περιοχή, καθώς έτσι θα μειωθεί η επίδραση των εκάστοτε γεωγραφικών επιρροών (κλίμα, ανάγλυφο του εδάφους, κατοικημένη ζώνη ή μη, αυξημένη παρουσία σκνίπας ή μη, χρήση εντομοκτόνων στην ευρύτερη περιοχή κ.α.), οι οποίες μόνο αμελητέες δεν μπορούν να θεωρηθούν. Δεν πρέπει να υποβαθμίζεται, σε περίπτωση που μελετηθούν κατοικίδια ζώα, και η επίδραση κοινωνικών και οικονομικών παραγόντων που διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή (πχ τα σκυλιά της πόλης ζουν κυρίως εντός των σπιτιών σε αντίθεση με αυτά της εξοχής, διαφορετικές φυλές ανά περιοχή, διαφορετικά επίπεδα κτηνιατρικής φροντίδας και χρήσης εντομοαπωθητικών κ.α.). Στην παρούσα εργασία βέβαια οι συγκεκριμένοι παράγοντες ήταν σταθεροί για το σύνολο των δειγμάτων. Κατά την ομαδοποίηση των δειγμάτων, θα μπορούσε επιπλέον των ορολογικών διαγνωστικών μεθόδων (IFAT, ELISA) να προστεθεί και η ανίχνευση του DNA του παρασίτου με PCR. Η επιπλέον αυτή πληροφορία θα βοηθούσε στην ορθότερη ομαδοποίηση των σκύλων που θα συμμετέχουν στην έρευνα, με διαφορετικά κριτήρια. Για παράδειγμα, σκύλοι με αρνητικό τίτλο αντισωμάτων έναντι της *L.infantum* και αρνητική εξέταση PCR, είναι πιθανό να μην έχουν έρθει καθόλου σε επαφή με το παράσιτο και για αυτό να μην έχουν αναπτύξει αντισώματα, χωρίς αυτό να σημαίνει πως ο οργανισμός τους έχει την ικανότητα να αντιμετωπίσει το παράσιτο όταν έρθει σε επαφή με αυτό. Αντίθετα, ένας σκύλος ο οποίος έχει αρνητικό τίτλο αντισωμάτων αλλά θετικό αποτέλεσμα αντίδρασης PCR, έχει έρθει σε επαφή με το παράσιτο και εφόσον παρακολουθείται τακτικά και δεν εμφανίζει συμπτώματα της νόσου ή θετικό τίτλο σε επαναληπτικές εξετάσεις, είναι ασφαλές να υποθέσουμε πως το ανοσοποιητικό του σύστημα έχει καταφέρει να καταστείλει την ανάπτυξη του παρασίτου πριν αυτό προλάβει να προκαλέσει νόσο. Συνεπώς, είναι πιθανό το γενετικό του υπόβαθρο να του προσφέρει ένα μοτίβο ανθεκτικότητας στη λείσμανίαση. Είναι λοιπόν προφανές πως η συμπερίληψη των παραπάνω σκύλων στην ίδια ομάδα (οροαρνητικοί σκύλοι), δε θα επέτρεπε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων καθώς εσφαλμένα θα θεωρούσαμε πως ο σκύλος που δεν έχει έρθει ποτέ σε επαφή με το παράσιτο ώστε να νοσήσει, παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη λοίμωξη από αυτό. Συνεπώς οι σκύλοι που είναι αρνητικοί και στις δυο διαγνωστικές εξετάσεις ή θα πρέπει να διαχωριστούν σε μια επιπλέον ομάδα, ή να εξαιρεθούν εντελώς από το πείραμα καθώς το αποτέλεσμα της μόλυνσης από το παράσιτο είναι αβέβαιο.

Καθώς η έρευνα γύρω από τη λείσμανίαση του σκύλου γίνεται όλο και πιο εκτεταμένη, είναι πιθανό να έχουν προστεθεί νέα δεδομένα που αφορούν στο ρόλο του γενετικού υποβάθρου του ξενιστή στον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης και της συνεπακόλουθης εξέλιξης της ασθένειας σε σκύλους που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο *L. infantum*. Τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να αξιολογηθούν και να συμπεριληφθούν σε πιθανή επανάληψη των πειραμάτων. Στο τεχνικό κομμάτι του πειράματος, κρίνεται απαραίτητος ο εκ νέου σχεδιασμός των εκκινήτων για όλα τα SNPs που αξιολογήθηκαν, με χρήση αυστηρότερων κριτηρίων κατά το σχεδιασμό τους, ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα τους. Με τον τρόπο αυτό θα αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης qPCR ενώ θα αποφευχθεί η εμφάνιση παραπροϊόντων και διμερών εκκινήτων. Όσο αφορά στο SNP rs22529878 και τους primers L14, οι οποίοι έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην HRM, όμως όχι ιδιαιτέρως καλά αποτελέσματα στην αλληλούχηση κατά Sanger, προτείνεται είτε να αντικατασταθούν με νέους εκκινήτες

που να δίνουν προϊόν αντίδρασης λίγο μεγαλύτερο των 100 ζευγών βάσεων, είτε αφού χρησιμοποιηθούν για ενίσχυση των δειγμάτων DNA με PCR, το προϊόν της αντίδρασης να κλωνοποιηθεί σε φορέα. Ακολούθως, το DNA του φορέα θα ενισχυθεί με γνωστούς (universal) primers για τον φορέα, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλαπλά πειράματα και έχουν αυξημένη ειδικότητα και απόδοση, με στόχο να απομονωθεί αλληλουχία μεγαλύτερου μήκους, η οποία όμως περιλαμβάνει εντός της την αρχική αλληλουχία - στόχο που περιέχει τον προς μελέτη πολυμορφισμό. Εν συνεχεία, το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης θα σταλθεί για αλληλούχηση κατά Sanger και πιθανότατα το αποτέλεσμα θα είναι πολύ καλύτερο, καθώς και η αλληλουχία στόχος θα είναι μεγαλύτερη των 100bp και οι primers έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα σε επιτυχή πειράματα.

Βιβλιογραφία

1. Χαραλαμπίδης Σ.Θ. 2001. Κτηνιατρική Παρασιτολογία. Πρωτόζωα, Έλμινθες, Αρθρόποδα. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
2. Banuls AL, Hide M, Prugnotte F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology* 2007; 64: 1–109.
3. Killick-Kendrick R. The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: Killick-Kendrick R, ed. *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, Intervet International BV, 2002: 57–68.
4. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1269–81.
5. Ashford RW, Snowden KF. The leishmaniasis. In: Macpherson CNL, Meslin FX, Wandeler AI, eds. *Dogs, Zoonoses and Public Health*. Oxon and New York, CABI Publishing, 2000: 132–40.
6. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Veterinary Parasitology* 2007; 149: 139–46.
7. Noli C. Canine leishmaniasis. *Waltham Focus* 1999; 9: 16–24.
8. Tolezano JE, Uliana SRB, Taniguchi HH et al. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2007; 149: 280–4.
9. Delgado O, Castes M, White AC et al. *Leishmania colombiensis* in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1993; 48: 145–7.
10. Baneth G. Leishmaniasis. In: Greene GE, ed. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd edn. Philadelphia, W.B. Saunders, 2005: 685–95.
11. Dereure J, Pratlong F, Dedet JP. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean basin. In: Killick-Kendrick R ed. *Canine Leishmaniasis: an Update*. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain, Hoechst Roussel Vet., 1999: 18–25.
12. Enserink M. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 2000; 290: 1881–3.
13. Gaskin AA, Schantz P, Jackson J et al. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16: 34–44.
14. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 2000; 16: 188–9.
15. C.Nicolle and C.Comte, “Origine canine du Kala-azar,” *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, vol. 1, pp. 299–301, 1908.
16. R. R. Ribeiro, S. M. Silva, G. d. Fulgencio, M. S. Michalick, and F. J. Frezard, “Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis,” *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, vol. 22, no. 3, pp. 373–378, 2013.
17. M. Maroli, M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel, and L. Gradoni, “Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern,” *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 27, no. 2, pp. 123–147, 2013.
18. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M. Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick Red. *Canine Leishmaniasis: an Update*. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain, Hoechst Roussel Vet, 1999: 26–31.
19. Rutledge LC, Gupta RK. Moth Flies and Sand Flies (Psychodidae). In: Mullen G, Durden L, ed. *Medical and Veterinary Entomology*, New York, Academic Press, 2002: 147–61.
20. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol*. 2009 Oct;20(5-6):471-89. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x. PMID: 20178485.
21. Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Killick- Kendrick Red. *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, Intervet International BV, 2002: 7–14.
22. Bettini S, Gramiccia M, Gradoni L et al. Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1986; 80: 458–9.
23. Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene CE, ed. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2nd edn. Philadelphia, W.B. Saunders, 1998: 450–8.
24. Berrahal F, Mary C, Roze M et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1996; 55: 273–7.

25. De Luna R, Vuotto ML, Ielpo MT et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999; 70: 95–103.
26. Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C et al. A crosssectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology* 2002; 109: 19–27.
27. G. F. Paz, M. F. B. Ribeiro, D. F. de Magalhaes et al., “Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area,” *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 97, no. 2, pp. 131–133, 2010.
28. V. V. G. de Oliveira, L. C. Alves, and V. A. da Silva, “Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals,” *Ciencia Rural*, vol. 45, no. 9, pp. 1622–1628, 2015.
29. V. Svobodova, M. Svoboda, L. Friedlaenderova, P. Drahotsky, E. Bohacova, and G. Baneth, “Canine leishmaniosis in three consecutive generations of dogs in Czech Republic,” *Veterinary Parasitology*, vol. 237, pp. 122–124, 2017.
30. S. D. Owens, D. A. Oakley, K. Marryott et al., “Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs,” *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 219, no. 8, pp. 1076–1083, 2001.
31. E. De Freitas, M. N. Melo, A. P. Da Costa-Val, and M. S. M. Michalick, “Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors,” *Veterinary Parasitology*, vol. 137, no. 1-2, pp. 159– 167, 2006.
32. M. D. Tabar, X. Roura, O. Francinoy, L. Altety, and R. R. De Gopegui, “Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank,” *Journal of Small Animal Practice*, vol. 49, no. 7, pp. 325–328, 2008.
33. D. F. Ma, A. J. Concannon, and J. Hayes, “Fatal Leishmaniasis in renal-transplant patient,” *The Lancet*, vol. 314, no. 8137, pp. 311– 312, 1979.
34. S. Antinori, A. Cascio, C. Parravicini, R. Bianchi, and M. Corbellino, “Leishmaniasis among organ transplant recipients,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 8, no. 3, pp. 191–199, 2008.
35. F. Morillas-Marquez, J. Martin-Sanchez, C. Acedo-Sanchez, J. A. Pineda, J. Macias, and J. Sanjuan-Garcia, “*Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): Transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing,” *Experimental Parasitology* emphasizes, vol. 100, no. 1, pp. 71–74, 2002.
36. V. Karkamo, A. Kaistinen, A. Nareaho et al., “The first report ” of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries,” *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 56, p. 84, 2014.
37. T. J. Naucke, S. Amelung, and S. Lorentz, “First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany,” *Parasites & Vectors*, vol. 9, no. 1, article no. 256, 2016.
38. Morales-Yuste M, Martín-Sánchez J, Corpas-Lopez V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary Sciences*. 2022; 9(8):387. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>
39. Gálvez, R.; Montoya, A.; Cruz, I.; Fernández, C.; Martín, O.; Checa, R.; Chicharro, C.; Migueláñez, S.; Marino, V.; Miró, G. Latest Trends in *Leishmania infantum* Infection in Dogs in Spain, Part I: Mapped Seroprevalence and Sand Fly Distributions. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 204.
40. Montoya-Alonso, J.A.; Morchón, R.; Costa-Rodríguez, N.; Matos, J.I.; Falcón-Cordón, Y.; Carretón, E. Current Distribution of Selected Vector-Borne Diseases in Dogs in Spain. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 564429.
41. Morillas-Márquez, F.; Díaz-Sáez, V.; Morillas-Mancilla, M.J.; Corpas-López, V.; Merino-Espinosa, G.; Gijón-Robles, P.; Martín-Sánchez, J. Phlebotomine Sandflies (Diptera, Phlebotomidae) of Lanzarote Island (Canary Islands, Spain): Ecological Survey and Evaluation of the Risk of *Leishmania* Transmission. *Acta Trop.* **2017**, *168*, 16–20.
42. Marty, P.; Izri, A.; Ozon, C.; Haas, P.; Rosenthal, E.; Del Giudice, P.; Godenir, J.; Coulibaly, E.; Gari-Toussaint, M.; Delaunay, P.; et al. A Century of Leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2007**, *101*, 563–574.
43. Cortes, S.; Vaz, Y.; Neves, R.; Maia, C.; Cardoso, L.; Campino, L. Risk Factors for Canine Leishmaniasis in an Endemic Mediterranean Region. *Vet. Parasitol.* **2012**, *189*, 189–196.
44. Gramiccia, M.; Scalone, A.; Di Muccio, T.; Orsini, S.; Fiorentino, E.; Gradoni, L. The Burden of Visceral Leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: A Retrospective Analysis of the Multi-Annual Epidemic That Occurred from 1989 to 2009. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, 20535.
45. Lachaud, L.; Dedet, J.P.; Marty, P.; Faraut, F.; Buffet, P.; Gangneux, J.P.; Ravel, C.; Bastien, P. Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France Surveillance of Leishmaniasis in France, 1999 to 2012. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, 20534.
46. Kotnik, T.; Moreno, J.; Šoba, B.; Krt, B.; Skvarc, M.; Rataj, A.V.; Bajc, M.G.; Verbic, U.R. Canine Leishmaniasis Prevalence in the Slovenian Dog Population. *J. Vet. Res.* **2021**, *65*, 161–167.

47. Mihalca, A.D.; Cazan, C.D.; Sulesco, T.; Dumitrache, M.O. A Historical Review on Vector Distribution and Epidemiology of Human and Animal Leishmanioses in Eastern Europe. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *123*, 185–191.
48. McKenna, M.; Attipa, C.; Tasker, S.; Augusto, M. Leishmaniosis in a Dog with No Travel History Outside of the UK. *Vet. Rec.* **2019**, *184*, 441.
49. Gad Baneth, Alexander F. Koutinas, Laia Solano-Gallego, Patrick Bourdeau, Lluís Ferrer, Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one, *Trends in Parasitology*, Volume 24, Issue 7, 2008, Pages 324-330, ISSN 1471-4922, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>.
50. Alexandre Barbosa Reis, Olindo Assis Martins-Filho, Andréa Teixeira-Carvalho, Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Cláudia Martins Carneiro, Wilson Mayrink, Washington Luiz Tafuri, Rodrigo Corrêa-Oliveira, Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Volume 128, Issues 1–3, 2009, Pages 87-95, ISSN 0165-2427, <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>.
51. Ferrer L. The pathology of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick R, ed. *Canine leishmaniasis: Moving Towards a Solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla, Spain, Intervet International BV, 2002: 21–4.
52. Ferrer L. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD, ed. *Current Veterinary Therapy XI-Small Animal Practice*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1992: 266–70.
53. Saint-Andre Marchal I, Marchal T, Moore PF et al. Infection of canine Langerhans cells and interdigitating dendritic cells by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. *Revue de Medecine Veterinaire* 1997; *148*: 29–36.
54. Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Santos SO et al. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; *111*: 251–61.
55. Diniz SA, Melo MS, Borges AM et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology* 2005; *42*: 650–8.
56. Natami A, Sahibi H, Lasri S et al. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Veterinary Research* 2000; *31*: 355–63.
57. Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN et al. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Clinical Pathology* 2005; *34*: 243–7.
58. Rodes D, Acena MC, Gascon M. Etude cytologique et biochimique du fer medullaire chez les chiens atteints de leishmaniose et sa relation avec des parameters sanguines et seriques. *Revue de Medecine Veterinaire* 1999; *150*: 965–74.
59. Foglia Manzillo V, Restucci B, Pagano A et al. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Veterinary Record* 2006; *158*: 690–4.
60. Ruiz de Gopegui R, Pen˜ alba B, Espada Y. Causes of lymphadenopathy in the dog and cat. *The Veterinary Record* 2004; *155*: 23–4.
61. Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN et al. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *Journal of Comparative Pathology* 2005; *132*: 145–52.
62. de Souza AI, Juliano RS, Gomes TS et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary Parasitology* 2005; *129*: 51–4.
63. Adamama-Moraitou KK, Rallis TS, Koutinas AF et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; *76*: 53–7.
64. Pinna Parpaglia ML, Vercelli A, Cocco R et al. Nodular lesions of the tongue in canine leishmaniosis. *Journal of Veterinary Medicine, Series A* 2007; *54*: 414–7.
65. Lamothe J, Poujade A. Ulcerative glossitis in a dog with leishmaniasis. *The Veterinary Record* 2002; *151*: 182–3.
66. Poli A, Abramo F, Mancianti F et al. Renal involvement in canine leishmaniasis: a light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron* 1991; *57*: 444–52.
67. Agut A, Corzo N, Murciano J et al. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Record* 2003; *153*: 648–52.
68. Garcia-Alonso M, Blanco A, Reina D et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunology* 1996; *18*: 617–23.
69. Pen˜ a MT, Naranjo C, Klauss G et al. Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *Journal of Comparative Pathology* 2008; *138*: 32–9.
70. Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G et al. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *The Veterinary Record* 2000; *146*: 698–703.
71. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis (CVL) in Greece: a retrospective study of 158 spontaneous cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1999; *35*: 376–83.

72. Dos-Santos WL, Jesus EE, Paranhos-Silva M et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008; 123:251–9.
73. Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 2008; 84: 269–77.
74. Manna L, Reale S, Vitale F et al. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal* 2008; 177: 279–82.
75. A. F. Koutinas and C. K. Koutinas, "Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi," *Veterinary Pathology*, vol. 51, no. 2, pp. 527–538, 2014.
76. X. Roura, A. Fondati, G. Lubas et al., "Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report," *Te Veterinary Journal*, vol. 198, no. 1, pp. 43–47, 2013.
77. L. Solano-Gallego, G. Miro, A. F. Koutinas et al., "LeishVet ´ guidelines for the practical management of canine leishmaniasis," *Parasites & Vectors*, vol. 4, article 86, 2011
78. L. Solano-Gallego, A. Koutinas, G. Miro et al., "Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis," *Veterinary Parasitology*, vol. 165, no. 1-2, pp. 1–18, 2009.
79. Alexander B, Maroli M: Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 2003, 17(1):1-18.
80. Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zini E, Zatelli A: Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010, 236(11):1200-1206.
81. Leishvet guidelines 2022, LeishVet, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, 5th Edition, March 2022, Special ALIVE Edition Málaga, Spain,
82. de Vasconcelos TCB, Furtado MC, Belo VS, Morgado FN, Figueiredo FB. Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: A systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infect Genet Evol.* 2019 Oct; 74:103293. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.005. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28987807.
83. Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., and Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88. doi: 10.1016/S0065-308X(04)57001lweal
84. Giunchetti, R. C., Silveira, P., Resende, L. A., Leite, J. C., de Oliveira Melo-Júnior, O. A., Rodrigues Alves, M. L., et al. (2019). Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Vet. Parasitol.* 271, 87–97. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.05.006
85. Leal, G. G. D. A., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. O., Carneiro, C. M., Giunchetti, R. C., Teixeira-Carvalho, A., et al. (2014). Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 205, 472–482. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.08.022
86. Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G. and Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* 24, 371–377.
87. Martin-Martin, I., Jimenez, M., Gonzalez, E., Eguiluz, C. and Molina, R. (2015). Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. *Veterinary Research* 46, 138
88. Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Siqueira, A. M., MachadoCoelho, G. L., da Costa, C. A., Mayrink, W., Vieira, E. P., Costa, J. S., Genaro, O. and Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 111, 161–173.
89. Zivcinkjak, T., Martinkovic, F., Marinculic, A., Mrljak, V., Kucer, N., Matijatko, V., Mihaljevic, Z. and Baric-Rafaj, R. (2005). A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Veterinary Parasitology* 131, 35–43.
90. Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L. and Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science* 85, 35–38.
91. Galvez, R., Miro, G., Descalzo, M. A., Nieto, J., Dado, D., Martin, O., Cubero, E. and Molina, R. (2010). Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Veterinary Parasitology* 169, 327–334
92. Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J. and Ferrer, L. (2000). The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* 90, 37–45.
93. Angela J. Toepp, Christine A. Petersen, The balancing act: Immunology of leishmaniosis, *Research in Veterinary Science*, Volume 130, 2020, Pages 19-25, ISSN 0034-5288, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.004>.
94. Emanuela Handman, Denise V.R Bullen, Interaction of *Leishmania* with the host macrophage, *Trends in Parasitology*, Volume 18, Issue 8, 2002, Pages 332-334, ISSN 1471-4922, [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02352-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02352-8).

95. Rittig, M.G., Bogdan, C., 2000. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol. Today* 16, 292–297.
96. Kaye, P., Scott, P., 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 604–615.
97. Terrazas, C., Oghumu, S., Varikuti, S., Martinez-Saucedo, D., Beverley, S.M., Satoskar, A.R., 2015. Uncovering Leishmania-macrophage interplay using imaging flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 423, 93–98.
98. Almeida, B.F., Narciso, L.G., Bosco, A.M., Pereira, P.P., Braga, E.T., Avanco, S.V., Marcondes, M., Ciarlina, P.C., 2013. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 196, 6–12.
99. Carlsen, E.D., Liang, Y., Shelite, T.R., Walker, D.H., Melby, P.C., Soong, L., 2015. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 182, 109–118.
100. Wardini, A.B., Pinto-da-Silva, L.H., Nadaes, N.R., Nascimento, M.T., Roatt, B.M., Reis, A.B., Viana, K.F., Giunchetti, R.C., Saraiva, E.M., 2019. Neutrophil properties in healthy and Leishmania infantum-naturally infected dogs. *Sci. Rep.* 9, 6247.
101. Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W., Laskay, T., 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite Leishmania major. *J. Immunol.* 169, 89.
102. de Menezes, J.P., Saraiva, E.M., da Rocha-Azevedo, B., 2016. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit. Vectors* 9, 264.
103. Regli, I.B., Passelli, K., Hurrell, B.P., Tacchini-Cottier, F., 2017. Survival mechanisms used by some Leishmania species to escape neutrophil killing. *Front. Immunol.* 8, 1558.
104. Goncalves-de-Albuquerque, S.D.C., Pessoa, E.S.R., Trajano-Silva, L.A.M., de Goes, T.C., de Moraes, R.C.S., Da, C.O.C.N., de Lorena, V.M.B., de Paiva-Cavalcanti, M., 2017. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. *Front. Immunol.* 8, 1437.
105. Nicolato Rde, C., de Abreu, R.T., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D., Reis, L.E., Carvalho, M., Carneiro, C.M., Giunchetti, R.C., Bouillet, L.E., Lemos, D.S., Coura-Vital, W., Reis, A.B., 2013. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally Leishmania infantum-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One* 8, e82947.
106. Gonzalez-Lombana, C., Gimblet, C., Bacellar, O., Oliveira, W.W., Passos, S., Carvalho, L.P., Goldschmidt, M., Carvalho, E.M., Scott, P., 2013. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following Leishmania major infection. *PLoS Pathog.* 9, e1003243.
107. Scorza, B.M., Carvalho, E.M., Wilson, M.E., 2017. Cutaneous manifestations of human and murine Leishmaniasis. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
108. Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T., Courret, N., 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends Microbiol.* 6, 392–401.
109. Victor K., Dujardin J.C. 2002. How to succeed in parasitic life without sex? Asking Leishmania. *Trends Parasitol* 18: 81-85.
110. Olivier M., Gregory D.J., Forget G. 2005. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18: 293-305.
111. Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Shor, S., Okano, F., Jaffe, C.L., 2005. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in Leishmania infantum-infected dogs. *Int. J. Parasitol.* 35, 63–73.
112. Alexandre-Pires, G., de Brito, M.T., Alguero, C., Martins, C., Rodrigues, O.R., da Fonseca, I.P., Santos-Gomes, G., 2010. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 275–283.
113. Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Guerra, L.L., Carvalho, M.G., Mayrink, W., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2006. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. *Clin. Exp. Immunol.* 146, 303–311.
114. Carrillo, E., Moreno, J., 2009. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 67–70.
115. Chamizo, C., Moreno, J., Alvar, J., 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 67–75.
116. Gibson-Corley, K.N., Hostetter, J.M., Hostetter, S.J., Mullin, K., Ramer-Tait, A.E., Boggiatto, P.M., Petersen, C.A., 2008. Disseminated Leishmania infantum infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. *Can. Vet. J.* 49, 1005–1008.
117. Solca, M.S., Andrade, B.B., Abbehusen, M.M., Teixeira, C.R., Khouri, R., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Bozza, P.T., Fraga, D.B., Borges, V.M., Veras, P.S., Brodskyn, C.I., 2016. Circulating biomarkers of immune activation, oxidative stress and inflammation characterize severe canine visceral Leishmaniasis. *Sci. Rep.* 6, 32619.

118. Boggiatto, P.M., Ramer-Tait, A.E., Metz, K., Kramer, E.E., Gibson-Corley, K., Mullin, K., Hostetter, J.M., Gallup, J.M., Jones, D.E., Petersen, C.A., 2010. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 267–273.
119. Liu, D., Uzonon, J.E., 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 83.
120. Esch, K.J., Juelsgaard, R., Martinez, P.A., Jones, D.E., Petersen, C.A., 2013. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J. Immunol.* 191, 5542–5550.
121. Nysten, S., Sacks, D., 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 28, 378–384.
122. Solano-Gallego, L., Montserrat-Sangra, S., Ordeix, L., Martinez-Orellana, P., 2016. *Leishmania infantum*-specific production of IFN-gamma and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 9, 317.
123. Wherry, E.J., 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499.
124. National Human Genome Research Institute, <https://www.genome.gov/>
125. A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis, Applied Biosystems™
126. Type-it® HRM™ PCR Handbook 07/2009
127. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 2013 Mar;133(3):1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1. PMID: 23399825; PMCID: PMC4102308.
128. PCR Technologies: A Technical Guide, Editor: Tania Nolan, Ph.D., Sigma-Aldrich®
129. Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics.* 2003 Apr;55(1):23-8. doi: 10.1007/s00251-003-0545-1. Epub 2003 Mar 20. PMID: 12715244
130. Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A, Francino O. Slc11a1 (formerly Nrp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res.* 2008 May-Jun;39(3):36. doi: 10.1051/vetres:2008013. Epub 2008 Feb 29. PMID: 18307968; PMCID: PMC2678959.
131. Quilez J, Martínez V, Woolliams JA, Sanchez A, Pong-Wong R, Kennedy LJ, Quinnell RJ, Ollier WE, Roura X, Ferrer L, Altet L, Francino O. Genetic control of canine leishmaniasis: genome-wide association study and genomic selection analysis. *PLoS One.* 2012;7(4):e35349. doi: 10.1371/journal.pone.0035349. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22558142; PMCID: PMC3338836.
132. Utsunomiya YT, Ribeiro ES, Quintal AP, Sangalli JR, Gazola VR, Paula HB, Trinconi CM, Lima VM, Perri SH, Taylor JF, Schnabel RD, Sonstegard TS, Garcia JF, Nunes CM. Genome-Wide Scan for Visceral Leishmaniasis in Mixed-Breed Dogs Identifies Candidate Genes Involved in T Helper Cells and Macrophage Signaling. *PLoS One.* 2015 Sep 8;10(9):e0136749. doi: 10.1371/journal.pone.0136749. PMID: 26348501; PMCID: PMC4562658.
133. Batista LFS, Utsunomiya YT, Silva TBF, Dias RA, Tomokane TY, Pacheco AD, da Matta VLR, Silveira FT, Marcondes M, Nunes CM, Laurenti MD. 2016. Genome-wide association study of cell-mediated response in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 84:3629–3637. doi:10.1128/IAI.00486-16.
134. da Silva, L.G., Costa-Júnior, C.R.L., Figueiredo-Júnior, C.A.S. et al. Canine β -defensin-1 (CBD1) gene as a possible marker for *Leishmania infantum* infection in dogs. *Parasites Vectors* 10, 199 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2130-8>
135. Soutter F, Solano-Gallego L, Attipa C, Gradoni L, Fiorentino E, Foglia Manzillo V, Oliva G, Tasker S, Helps C, Catchpole B. An investigation of polymorphisms in innate and adaptive immune response genes in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2019 May;269:34-41. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.04.011. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31079826.
136. Batista LFS, Torrecilha RBP, Silva RB, Utsunomiya YT, Silva TBF, Tomokane TY, Pacheco AD, Bosco AM, Paulan SC, Rossi CN, Costa GNO, Marcondes M, Ciarlini PC, Nunes CM, Matta VLR, Laurenti MD. Chromosomal segments may explain the antibody response cooperation for canine leishmaniasis pathogenesis. *Veterinary Parasitology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109276>.
137. Miró G., Cardoso L., Pennisi, M.G., Oliva G., Baneth G., 2008. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 24, 371–377.
138. Valladares, J.E., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Portús, M., Cristòfol, C., Franquelo C., Arboix, M., 1998. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 75, 33–40.
139. Yasur-Landau, D., Jaffe, C.L., David, L., Baneth, G., 2016. Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* from dogs with disease relapse. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10,e0004341.
140. Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016 Aug 30;227:98-114. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.07.011. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27523945.
141. Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, Dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int.* 2018 Mar 29; 2018:3296893. doi: 10.1155/2018/3296893. PMID: 29789784; PMCID: PMC5896350.

- 142.F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, Dec. 1977.
- 143.DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems Chemistry Guide, Third Edition, ThermoFisher Scientific
- 144.Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου [Εργαστηριακός Οδηγός], Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., & Δούκισσας, Λ. (2015)., Κάλλιπος Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
<https://hdl.handle.net/11419/641>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Πίνακας ΠΑ3: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαγνωστικών μεθόδων για την ανίχνευση της λοίμωξης από *L. infantum* σε σκύλους⁷⁷

Διαγνωστική τεχνική	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ορολογικές δοκιμές	▪ Προσδιορισμός του επιπέδου των αντισωμάτων. ▪ Απαραίτητο για τη διάγνωση και την πρόγνωση της νόσου	▪ Δεν ανιχνεύει την πραγματική παρουσία του παρασίτου ▪ Διασταυρούμενες αντιδράσεις του ορού με άλλα παράσιτα της οικογένειας Trypanosomatidae
→ Ποιοτικές - Δοκιμασίες ταχείας διάγνωσης (rapid test) που βασίζονται στην ανοσοχρωματο-γραφική δοκιμή	Ταχεία ανίχνευση στο χώρο της κλινικής εξέτασης	▪ Παρέχει μόνο θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα ▪ Μεταβλητή ευαισθησία και απόδοση με κίνδυνο ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων ▪ Το θετικό αποτέλεσμα πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω με ποσοτικές μεθόδους
→ Ποσοτικές ELISA (ενζυμική ανοσοαπορρόφηση IFAT (έμμεσος ανοσοφθορισμός αντισωμάτων)	▪ Καθορίζει το επίπεδο των αντισωμάτων ▪ Τα υψηλά επίπεδα αντισωμάτων παρουσία συμβατών κλινικών σημείων ή/και κλινικοπαθολογικών ανωμαλιών επιβεβαιώνουν την κλινική νόσο.	▪ Η απόδοση και η ακρίβεια της κατώτατης τιμής θα εξαρτηθούν από το εργαστήριο ▪ Διαφορές μεταξύ εργαστηρίων και κακή τυποποίηση των τεχνικών. ▪ Τα χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία
Κυτταρολογική/ ιστολογική αξιολόγηση	▪ Επιτρέπει την άμεση ανίχνευση του ίδιου του παρασίτου καθώς και των παθολογικών ευρημάτων που είναι ύποπτα λοίμωξης ▪ Επιτρέπει τον αποκλεισμό άλλων διαφορικών διαγνώσεων ▪ Ταχεία και μη επεμβατική μέθοδος (κυτταρολογία)	▪ Απαιτεί τεχνογνωσία ▪ Χαμηλή ευαισθησία στην ανίχνευση αμαστιγωτών μορφών της <i>Leishmania</i> σε ιστούς και σωματικά υγρά ▪ Απαιτεί τη διενέργεια άλλων διαγνωστικών εξετάσεων όπως ανοσοϊστοχημεία ή/και PCR όταν τα παράσιτα δεν οπτικοποιούνται ▪ Δεν αποκαλύπτει την ανοσολογική κατάσταση του σκύλου
PCR	▪ Επιτρέπει την ανίχνευση του DNA της <i>Leishmania</i> ▪ Υψηλή ευαισθησία (kDNA) και ειδικότητα ▪ Ποσοτικοποίηση παρασιτικού φορτίου (real time-PCR)	▪ Πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω επιμολύνσεων ▪ Διαφορετική τυποποίηση και τεχνικές από διαφορετικά διαγνωστικά εργαστήρια ▪ Δεν αποκαλύπτει την ανοσολογική κατάσταση του σκύλου ▪ Δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ως μοναδική διαγνωστική τεχνική για την

		επιβεβαίωση της νόσου γιατί ένα θετικό αποτέλεσμα επιβεβαιώνει τη λοίμωξη από <i>Leishmania</i> αλλά όχι τη νόσο
Παρασιτολογικές εξετάσεις/ Καλλιέργεια του παρασίτου	- Επιτρέπει την απομόνωση των παρασίτων <i>Leishmania</i> - Διευκολύνει την ισοενζυματική ταυτοποίηση του παρασίτου	- Χρονοβόρα και επίπονη διαγνωστική τεχνική - Μπορεί να χρειαστεί ένας μήνας για να δοθεί αποτέλεσμα - Πραγματοποιείται κυρίως σε ερευνητικά εργαστήρια

Πίνακας ΠΑ2: Κλινικά στάδια της λείσμανιάσης του σκύλου με βάση την ορολογική κατάσταση, τα κλινικά συμπτώματα, τα εργαστηριακά ευρήματα και τον τύπο θεραπείας και πρόγνωσης για κάθε κλινικό στάδιο με βάση τη LeishVet⁸¹.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ	ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ*	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	ΠΡΟΓΝΩΣΗ
ΣΤΑΔΙΟ I Ήπια νόσος	Αρνητικά έως χαμηλά θετικά επίπεδα αντισωμάτων	Σκύλοι με ήπια κλινικά συμπτώματα όπως μονήρη λεμφαδενομεγαλία ή βλατιώδη δερματίτιδα	Συνήθως δεν παρατηρούνται κλινικοπαθολογικές ανωμαλίες. Φυσιολογικό νεφρικό προφίλ: κρεατινίνη < 1,4 mg/dl; μη πρωτεϊνουρικό: UPC < 0.2	Καμία επιστημονική ενέργεια **/ Παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου (βλ. πίνακα 3)	Καλή
ΣΤΑΔΙΟ II Μέτρια νόσος	Χαμηλά έως υψηλά θετικά επίπεδα αντισωμάτων	Σκύλοι, οι οποίοι εκτός από τα συμπτώματα που παρατίθενται στο Στάδιο I, ενδέχεται να παρουσιάζουν άλλα κλινικά συμπτώματα όπως: διάχυτες ή συμμετρικές δερματικές βλάβες όπως αποφολιδωτική δερματίτιδα/ονυχόρυψη, εξελκώσεις (ρινική άλως, πέλωμα, οστώδεις προεξοχές, βλεννογονοδερματικά όρια), γενικευμένη λεμφαδενομεγαλία, απώλεια όρεξης και απώλεια βάρους	Κλινικοπαθολογικά ευρήματα όπως ήπια μη αναγεννητική αναμία, υπεργαμμασφαιριναιμία, υπολευκωματιναιμία, σύνδρομο αυξημένου ιξώδους του ορού. Υποστάδιο α) Φυσιολογικό νεφρικό προφίλ: κρεατινίνη < 1,4 mg/dl, μη πρωτεϊνουρικό: UPC < 0.5 β) Κρεατινίνη < 1,4 mg/dl: UPC = 0.5-1	Αλλοπουρινόλη + αντιμονιακή μεγλουμίνη ή μιλτεφοσίνη	Καλή έως επιφυλακτική
ΣΤΑΔΙΟ III Βαριά νόσος	Μεσαία έως υψηλά θετικά επίπεδα αντισωμάτων	Σκύλοι, οι οποίοι εκτός από τα σημεία που παρατίθενται στα Στάδια I και II, ενδέχεται να παρουσιάζουν συμπτώματα που προέρχονται από ανοσοσυμπλεγματικές βλάβες (π.χ. ραγοειδίτιδα και σπειραματονεφρίτιδα)	Κλινικοπαθολογικά ευρήματα που παρατίθενται στο Στάδιο II Χρόνια νεφρική νόσος (XNN) σταδίου I κατά IRIS με UPC = 1-5 ή σταδίου II (κρεατινίνη 1,4-2 mg/dl) ***	Αλλοπουρινόλη + αντιμονιακή μεγλουμίνη ή μιλτεφοσίνη Να ακολουθούνται οι κατευθυντήριες γραμμές της IRIS για XNN****	Επιφυλακτική έως δυσμενής
ΣΤΑΔΙΟ IV Πολύ βαριά νόσος	Μεσαία έως υψηλά θετικά επίπεδα αντισωμάτων	Σκύλοι με τα κλινικά συμπτώματα που παρατίθενται για το Στάδιο III. Πνευμονική θρομβοεμβολή, ή νεφρωσικό σύνδρομο και νεφρική νόσος τελικού σταδίου	Κλινικοπαθολογικά ευρήματα που παρατίθενται στο Στάδιο II, XNN σταδίου III κατά IRIS (κρεατινίνη 2,1-5 mg/dl) και σταδίου IV (κρεατινίνη > 5 mg/dl)*** ή νεφρωσικό σύνδρομο: σημαντική πρωτεϊνουρία UPC > 5	Ειδική θεραπεία πρέπει να καθορίζεται σε εξατομικευμένη βάση Να ακολουθούνται οι κατευθυντήριες γραμμές της IRIS για XNN****	Δυσμενής

*Σκύλοι με αρνητικά έως μέτρια θετικά επίπεδα αντισωμάτων θα πρέπει να επιβεβαιώνονται ως προσβεβλημένοι με άλλες διαγνωστικές τεχνικές όπως κυτταρολογικές, ιστολογικές/ανοσοϊστοχημικές και PCR.

**Σκύλοι στο Στάδιο I (ήπια νόσος) είναι πιθανό να απαιτούν λιγότερο παρατεταμένη θεραπεία με ένα ή δύο συνδυασμένα φάρμακα (αλλοπουρινόλη, δομπεριδόνη, αντιμονιακή μεγλουμίνη ή μιλτεφοσίνη) ή εναλλακτικά παρακολούθηση χωρίς θεραπεία.

***<http://iris-kidney.com/guidelines/staging.html>

****<http://iris-kidney.com/guidelines/recommendations.html>

Τονίζεται πως τα αντιλειτουργικά φάρμακα εμφανίζουν ορισμένα μειονεκτήματα¹⁴⁰, όπως το γεγονός πως πολλά από αυτά απαιτούν παρεντερική χορήγηση και συνεπώς μπορούν να χορηγηθούν μόνο από κλινικό κτηνίατρο, η αδυναμία πλήρους εξουδετέρωσης του παρασιτικού φορτίου, οι ανεπιθύμητες παρενέργειες τους^{137,138} καθώς και η ανθεκτικότητα στη θεραπεία των παρασίτων που έχει βρεθεί πως

αναπτύσσεται σε σκύλους που έχουν υποστεί αγωγή με λανθασμένη δοσολογία ή που είχαν διακόψει πρόωρα τη χορήγηση¹⁴¹. Παρά τα πολλά μειονεκτήματά της, η φαρμακευτική θεραπεία είναι η πιο αποτελεσματική θεραπεία ασθενών σκύλων και έχει πολλαπλά οφέλη όσον αφορά τη μείωση του επιπολασμού και της επίπτωσης της νόσου, καθώς και στον έλεγχο του κύκλου ζωής των παθογόνων⁷⁷.

Μελλοντικά, και καθώς η γνώση για τις σχέσεις ξενιστή-παρασίτου στους σκύλους αυξάνεται συνεχώς, σηματοδοτείται η ύπαρξη εγγενών παραγόντων του ξενιστή, όπως οι ανοσολογικές διαφορές στην απόκριση στη λοίμωξη, οι οποίοι φαίνεται πως θα επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας¹⁴¹. Με τη γνώση αυτή, οι ερευνητικές ομάδες αναζητούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στη λεϊσμανίαση του σκύλου μέσω της δημιουργίας νέων σκευασμάτων, του συνδυασμού των υπαρχόντων φαρμάκων ή συνδυάζοντας τις υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις με ανοσοδιεγερτικά και ανοσορρυθμιστικά φάρμακα (ανοσοθεραπεία), με στόχο τη βελτίωση της πρόγνωσης και της ποιότητας ζωής του ασθενούς¹⁴¹.

Πίνακας ΠΑ3: Στοιχεία των ατόμων της ομάδας των οροαρνητικών για την L.infantum σκύλων

A/A	ΚΩΔ.	ΟΝΟΜΑ	ΦΥΛΟ	ΦΥΛΗ	ΗΛΙΚΙΑ
LEISHMANIA NEGATIVE					
1	N1	REGGIE	♀	MALINOIS	9
2	N2	RUBIN	♀	MALINOIS	9
3	N3	HOFMAN	♂	GSD	9
4	N4	EBEN	♀	GSD	9
5	N5	ΑΓΑΠΗ	♀	BS	9
6	N6	BACK	♂	MALINOIS	2
7	N7	LOCO	♂	GSD	5
8	N8	YEN	♀	MALINOIS	6
9	N9	EVO	♂	MALINOIS	13
10	N10	BERRY	♂	MALINOIS	14
11	N11	MIRKO	♂	GSD	9
12	N12	FILI	♀	MALINOIS	4
13	N13	JINA	♀	MALINOIS	8
14	N14	OLI	♂	GSD	1
15	N15	ZAR	♂	GSD	1
16	N16	ROMI (F)	♂	GSD	2,5
17	N17	BLACKY	♂	MALINOIS	7

18	N18	ELSA	♀	GSD	8
19	N19	NTASTY	♂	GSD	4
20	N20	2477B	♂	GSD	5

Πίνακας ΠΑ4: Στοιχεία των ατόμων της ομάδας των οροθετικών για την *L.infantum* σκύλων

A/A	ΟΝΟΜΑ	ΦΥΛΟ	ΦΥΛΗ	ΗΛΙΚΙΑ	ΤΙΤΛΟΣ
LEISHMANIA POSITIVE					
1	NERO	♂	MALINOIS	12	1/1600
2	QUEEN	♀	GSD	9	-
3	CINKA	♀	MALINOIS	3	1/1600
4	UNIC	♀	MALINOIS	12	1/200
5	ZITA	♀	GSD	4	1/1600-1/800
6	CONAN	♂	MALINOIS	5	1/400-1/800
7	GLEN	♂	GSD / DSH	13	1/400-1/200
8	DENI	♂	MALINOIS	13	-
9	ANGUS	♂	MALINOIS	9	1/400-1/200
10	DIAS	♂	BS	5	-
11	MIRA	♀	GSD	8	-
12	FONIX	♂	GSD	9	-
13	ULAN	♀	GSD	12	1/200
14	HPA	♀	MALINOIS	2,5	1/400
15	ΑΡΓΟΣ (Μ)	♂	GSD	7	/3200
16	DIAS	♂	GSD	8	1/800-1/1600

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων, όπως είναι το DNA, κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Το πήκτωμα τοποθετείται μέσα σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης οριζόντιας διάταξης, η οποία φέρει στα άκρα της δύο ηλεκτρόδια από πλάτινα, στα οποία και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τα μόρια κινούνται ανάλογα με το φορτίο τους και το μέγεθός τους. Το DNA έχει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων και γι' αυτό τα μόρια

DNA που ηλεκτροφορούνται κινούνται προς την άνοδο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του αριθμού των βάσεων τους. Αυτό σημαίνει πως η κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αгарόζης εξαρτάται από το μέγεθός τους, με τα μικρότερα να κινούνται ταχύτερα και τα μεγαλύτερα μόρια να κινούνται βραδύτερα. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA χρησιμοποιείται και διαφορετική πυκνότητα αгарόζης. Τα μεγαλύτερα μόρια DNA απαιτούν μικρότερες συγκεντρώσεις αгарόζης, ενώ τα μικρά διαχωρίζονται επιτυχώς στα πυκνά πηκτώματα στα οποία μπορούν και κινούνται εύκολα.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)¹²⁷⁻¹²⁸

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια απλή και ευρέως χρησιμοποιούμενη ενζυμική δοκιμασία, η οποία επιτρέπει την απομόνωση και ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών ενός προτύπου(template) DNA ή cDNA από μια σύνθετη δεξαμενή DNA. Είναι μια πολύ ευαίσθητη δοκιμασία, καθώς απαιτούνται ελάχιστες ποσότητες (ίχνη) DNA για να δημιουργηθούν αρκετά αντίγραφα, συνεπώς είναι μια τεχνική επιρρεπής στις επιμολύνσεις. Κάθε ανάλυση PCR απαιτεί την παρουσία του προτύπου DNA (εκμαγείο, DNA template), των εκκινητών (primers), νουκλεοτιδίων (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) και μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση είναι το ένζυμο κλειδί που συνδέει μεμονωμένα νουκλεοτίδια μεταξύ τους για να σχηματίσουν το προϊόν PCR. Τα νουκλεοτίδια περιλαμβάνουν τις τέσσερις βάσεις – αδενίνη, θυμίνη, κυτοσίνη και γουανίνη (A, T, C, G) – που βρίσκονται στο DNA. Αυτά λειτουργούν ως δομικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται από την DNA πολυμεράση για τη δημιουργία του προϊόντος της PCR. Οι εκκινητές στην αντίδραση προσδιορίζουν το ακριβές προϊόν DNA που πρόκειται να ενισχυθεί και είναι μικρά τμήματα DNA (ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες) με καθορισμένη αλληλουχία, συμπληρωματική προς το DNA στόχο που πρόκειται να ανιχνευθεί και να ενισχυθεί. Οι εκκινητές χρησιμεύουν ως σημείο επέκτασης, πάνω στα οποία θα «χτίσει» η DNA πολυμεράση. Τα προαναφερθέντα συστατικά αναμιγνύονται σε δοκιμαστικό σωλήνα και στη συνέχεια τοποθετούνται σε μηχανήμα που επιτρέπει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης του DNA σε τρία βασικά βήματα. Το μηχανήμα είναι ουσιαστικά ένας θερμικός κυκλοποιητής, ο οποίος ανεβάζει και μειώνει τη θερμοκρασία του σε διακριτά, ακριβή και προ-προγραμματισμένα βήματα. Το διάλυμα της αντίδρασης θερμαίνεται πρώτα πάνω από το σημείο τήξης των δύο συμπληρωματικών κλώνων DNA του DNA στόχου, κάτι που επιτρέπει στους κλώνους να διαχωριστούν, μια διαδικασία που ονομάζεται αποδιάταξη (denaturation). Η θερμοκρασία στη συνέχεια μειώνεται για να επιτραπεί στους primers να συνδεθούν με το επιθυμητό τμήμα του DNA-στόχου, μια διαδικασία γνωστή ως υβριδοποίηση (annealing). Η υβριδοποίηση μεταξύ των εκκινητών και του DNA στόχου λαμβάνει χώρα μόνο εάν είναι συμπληρωματικά σε αλληλουχία (π.χ. A με T, G με C). Η θερμοκρασία αυξάνεται ξανά, οπότε η DNA πολυμεράση μπορεί να επεκτείνει τους εκκινητές (Extension) προσθέτοντας νουκλεοτίδια στον αναπτυσσόμενο κλώνο DNA. Με κάθε επανάληψη αυτών των τριών βημάτων, ο αριθμός των μορίων DNA διπλασιάζεται.

Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος της ανίχνευσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός της ενισχυμένης αλληλουχίας εκτελούνται στο τέλος της αντίδρασης και περιλαμβάνουν περαιτέρω ανάλυση όπως ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης και ανάλυση της εικόνας που προκύπτει.

Αλληλούχηση κατά Sanger

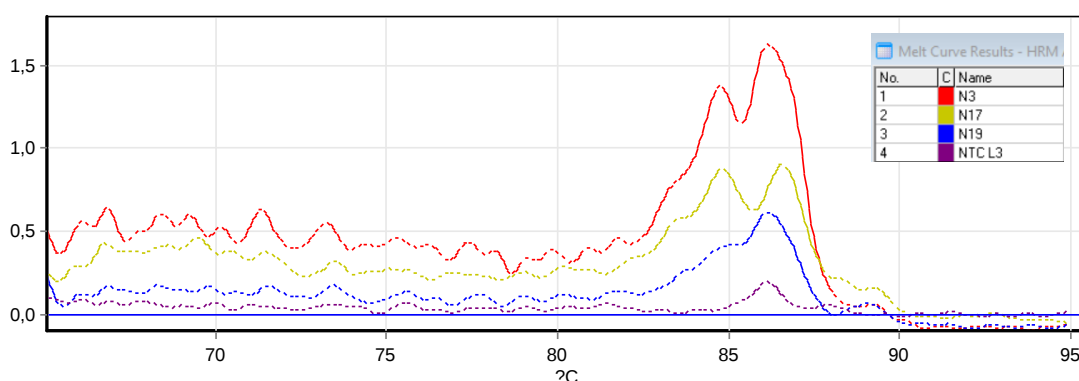
Η αλληλούχηση του DNA με τη μέθοδο Sanger είναι μια ενζυμική μέθοδος αλληλούχησης με «τερματισμό επιμήκυνσης της αλυσίδας» με τη βοήθεια τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων (Dideoxynucleotides, ddNTPs). Για την ανάπτυξη της μεθόδου αυτής, οι Sanger et al.¹⁴² βασίστηκαν πάνω στις βασικές αρχές της αντιγραφής του DNA και συγκεκριμένα στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να ενσωματώνει 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια. Τα 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια αποτελούν ανάλογα νουκλεοτιδικών βάσεων που δεν διαθέτουν την 3'-υδροξυλική ομάδα, που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών και φέρουν στη θέση της ένα υδρογόνο. Τα ddNTPs ενσωματώνονται φυσιολογικά κατά τη σύνθεση της νέας αλυσίδας DNA μέσω των 5' τριφωσφορικών ομάδων τους, αλλά εμποδίζουν την ενσωμάτωση του επόμενου δεοξυνουκλεοτιδίου, επειδή δεν διαθέτουν την 3'-υδροξυλική ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού¹⁴³.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας με τη μέθοδο Sanger απαιτεί την ύπαρξη ενός εκμαγείου DNA, ενός εκκινήτη, μιας DNA πολυμεράσης, δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) και ενός ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης¹⁴³. Τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια, το καθένα σημασμένο με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, προστίθενται όλα μαζί στην PCR και ενσωματώνονται τυχαία σε διαφορετικά σημεία της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας, ενώ με την ενσωμάτωσή τους εμποδίζουν την περαιτέρω επέκταση της αλυσίδας DNA. Έτσι, δημιουργούνται κομμάτια DNA που διαφέρουν κατά μία βάση και το καθένα «έχει διαφορετικό χρώμα», ανάλογα με τη χρωστική του ddNTP, που έχει ενσωματωθεί στην τελική βάση. Όλα τα προϊόντα κάθε δείγματος ηλεκτροφορούνται σε ένα τριχοειδές διαμέτρου μικρότερης των 0,5 mm και μήκους περίπου 48 cm¹⁴³. Τα επισημασμένα με φθορίζουσα χρωστική μόρια DNA αναγνωρίζονται αυτόματα σε πραγματικό χρόνο κατά την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή, καθώς κάθε διαδοχικό τμήμα, το οποίο είναι κατά μία βάση μεγαλύτερο από το προηγούμενο, διέρχεται από το σύστημα ανίχνευσης της συσκευής αλληλούχησης¹⁴⁴. Το σύστημα ανίχνευσης λειτουργεί με λέιζερ, το οποίο διεγείρει τη χρωστική που είναι προσδεδεμένη σε κάθε ddNTP στο άκρο κάθε τμήματος DNA. Η κάθε χρωστική εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος¹⁴³⁻¹⁴⁴. Ειδικοί αισθητήρες καταγράφουν τα σήματα και με χρήση κατάλληλου αλγόριθμου αποδίδεται η βάση που βρίσκεται στο 3' άκρο του τμήματος DNA. Η αλληλουχία του DNA αναπαρίσταται σε ένα χρωματογράφημα, όπου απεικονίζεται η ένταση καθενός από τα φθορίζοντα σήματα ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης¹⁴³⁻¹⁴⁴. Κάθε βάση αναπαρίσταται ως μια καμπύλη διαφορετικού χρώματος (το νουκλεοτιδίου A επισημαίνεται και φθορίζει σε χρώμα πράσινο, το G σε μαύρο, το C σε μπλε και το T σε κόκκινο).

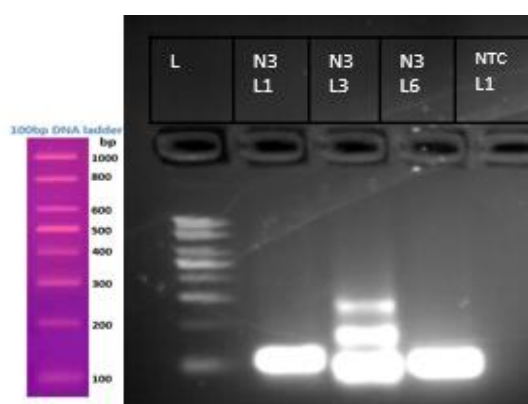
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ HRM

Ζεύγος Εκκινήτων L3

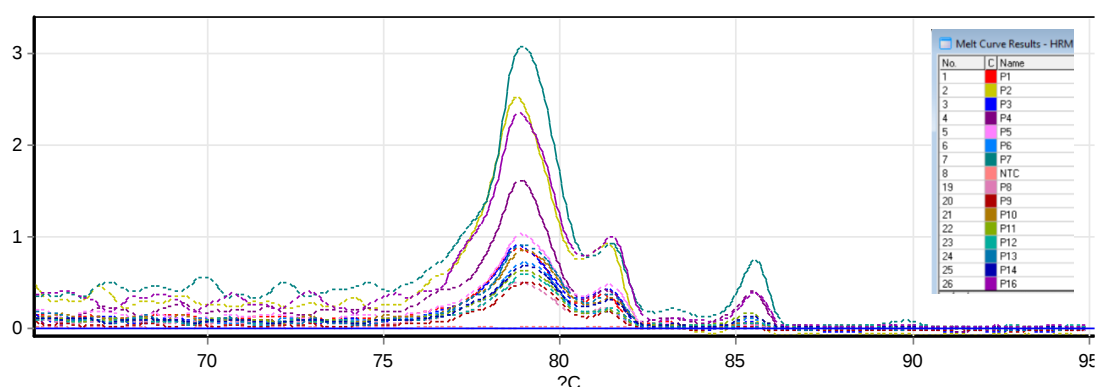


Εικόνα ΠΒ1: Καμπύλες Μεταβολής Φθορισμού για τα δείγματα N3, N17, N19 με τους primers L3. Φαίνεται πως υπάρχει παραπάνω από μια κορυφή σε καθεμία καμπύλη μεταβολής φθορισμού, γεγονός που δηλώνει πως οι primers δε δίνουν μοναδικό προϊόν αντίδρασης.



Εικόνα ΠΒ215: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Βλέπουμε πως το ίδιο δείγμα, δίνει διαφορετική εικόνα μετά την ενίσχυση με διαφορετικούς primers. Συγκεκριμένα, με το σετ L3, δεν έχουμε μοναδικό προϊόν κοντά στις 100bp, όπως θα περιμέναμε, αλλά εντοπίζονται και μεγαλύτερα προϊόντα (200-300bp). Πυκνότητα gel αгарόζης: 2,5%, Ladder: 100bp, EnzyQuest

Ζεύγος Εκκινήτων L8

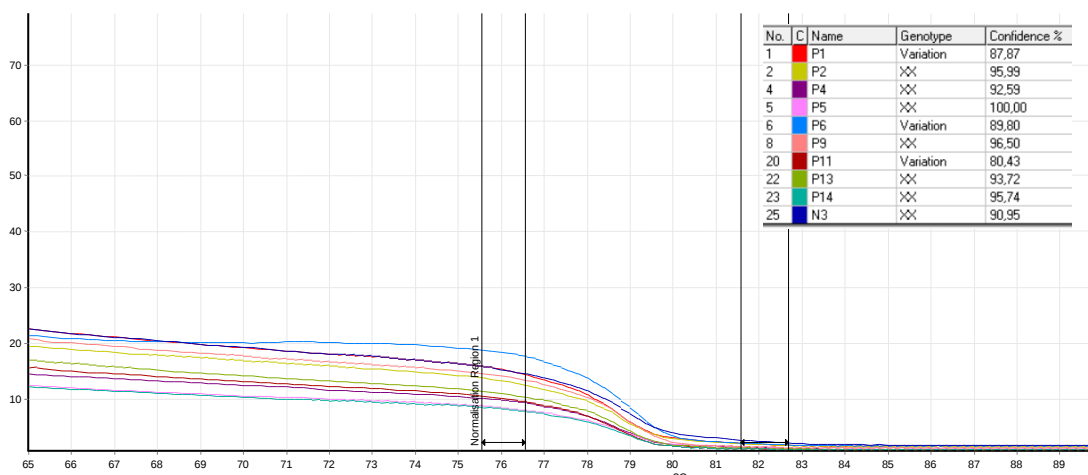


Εικόνα ΠΒ3: Καμπύλες μεταβολής φθορισμού για τους primers L8 στα δείγματα P1 -P14 και P16. Φαίνονται οι πολλαπλές κορυφές των καμπυλών, οι οποίες υποδεικνύουν πως δεν υπάρχει μοναδικό προϊόν της αντίδρασης.

Το πείραμα επαναλήφθηκε σε δείγματα που είχε γίνει gel extraction. Τα δείγματα τα οποία ενισχύθηκαν με το ζεύγος εκκινήτων L8 ήταν τα P1, P2, P3b, P4, P5, P6, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P16, N3, N19 και N20. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν πως δεν είχε γίνει σωστή ποσοτικοποίηση των δειγμάτων DNA, καθώς τα δείγματα

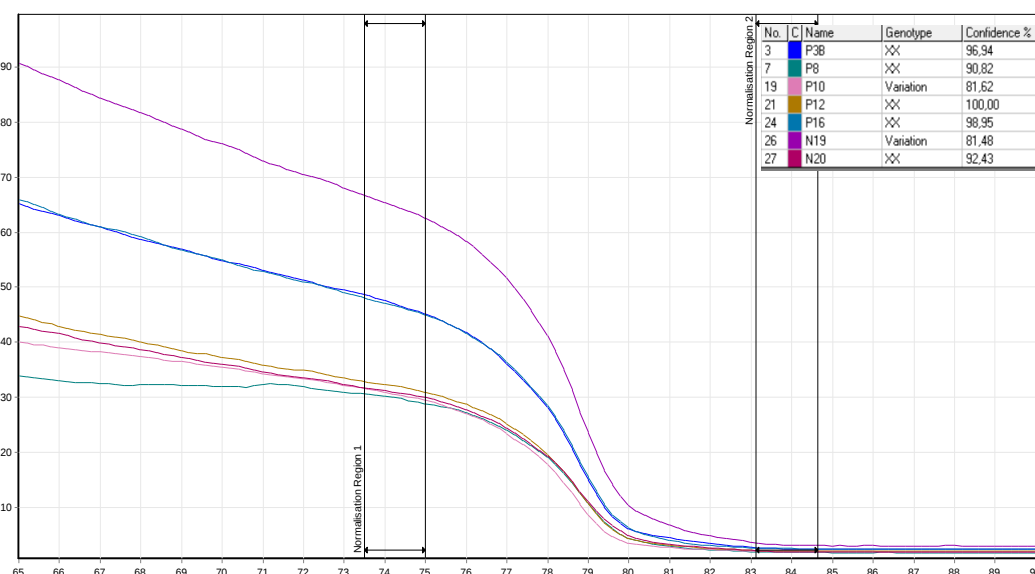
παρουσιάζανε πολύ έντονες διαφορές μεταξύ τους, με άλλα δείγματα να έχουν πιο υψηλό φθορισμό και τη πλειοψηφία να έχει πολύ χαμηλό φθορισμό. Για το λόγο αυτό, επιλέξαμε να χωρίσουμε σε ομάδες τα δείγματα ανάλογα με το φθορισμό τους στο διάγραμμα καμπυλών τήξης, ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ομαδοποίησή τους από το λογισμικό.

Τα δείγματα P1,P2, P4, P5, P6, P9, P11, P13, P14 και N3, εξετάστηκαν μαζί. Η ομαδοποίηση φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



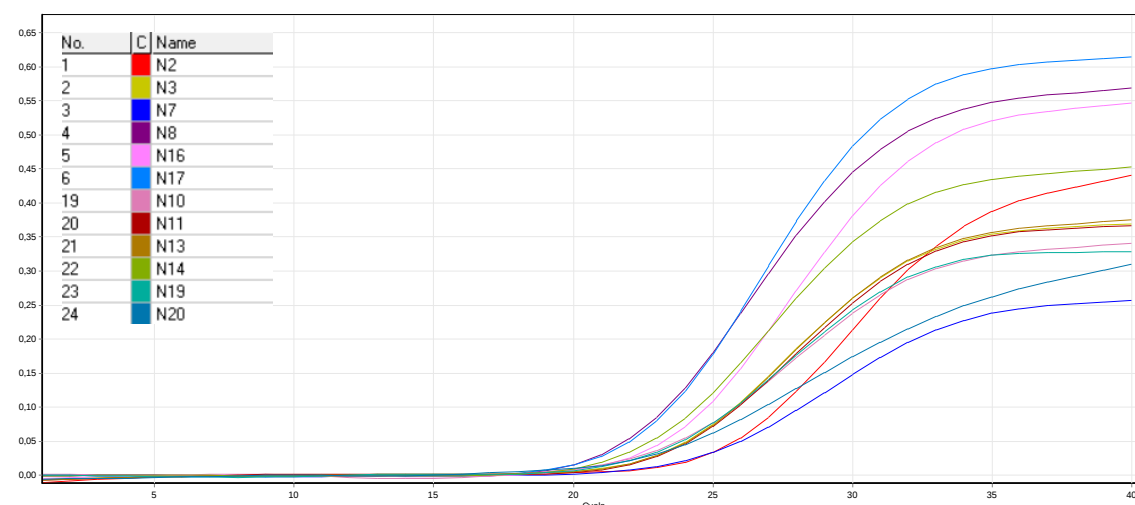
Εικόνα ΠΒ4: Καμπύλες Τήξης για τα δείγματα P1,P2, P4, P5, P6, P9, P11, P13, P14 και N3. Στο σχήμα φαίνεται το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Όπως φαίνεται ο φθορισμός για τα συγκεκριμένα δείγματα είναι πολύ χαμηλός. Στον πίνακα φαίνεται η ομαδοποίηση με βάση το λογισμικό ως προς το δείγμα P5.

Τα δείγματα P3b, P8, P10, P12, P16 και N20 εξετάστηκαν μεταξύ τους, καθώς παρουσίαζαν πιο υψηλό φθορισμό, αν και πάλι υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η ομαδοποίηση φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

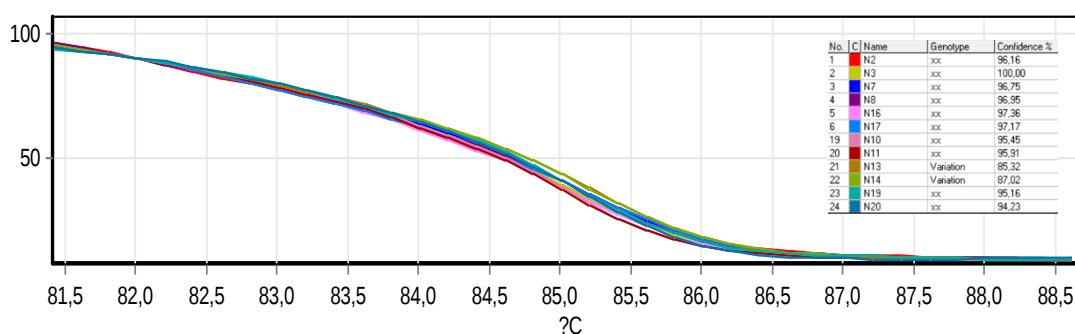


Εικόνα ΠΒ5: Καμπύλες τήξης των δειγμάτων P3b, P8, P10, P12, P16, N19 και N20. Φαίνεται η διαφορά στον φθορισμό μεταξύ των δειγμάτων, η οποία πιθανώς να συνδέεται με διαφορετική αρχική συγκέντρωση DNA στο εκάστοτε δείγμα. Στον πίνακα φαίνεται η ομαδοποίηση με βάση το λογισμικό ως προς το δείγμα P12.

Ζεύγος Εκκινήτων L1



Εικόνα ΠΒ6: Καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων N2new, N3, N7new, N8, N10new, N11new, N13new, N14new, N16new, N17new, N19 και N20 με τους primers L1. Φαίνεται πως το Ct δεν είναι ίδιο για όλα τα δείγματα.

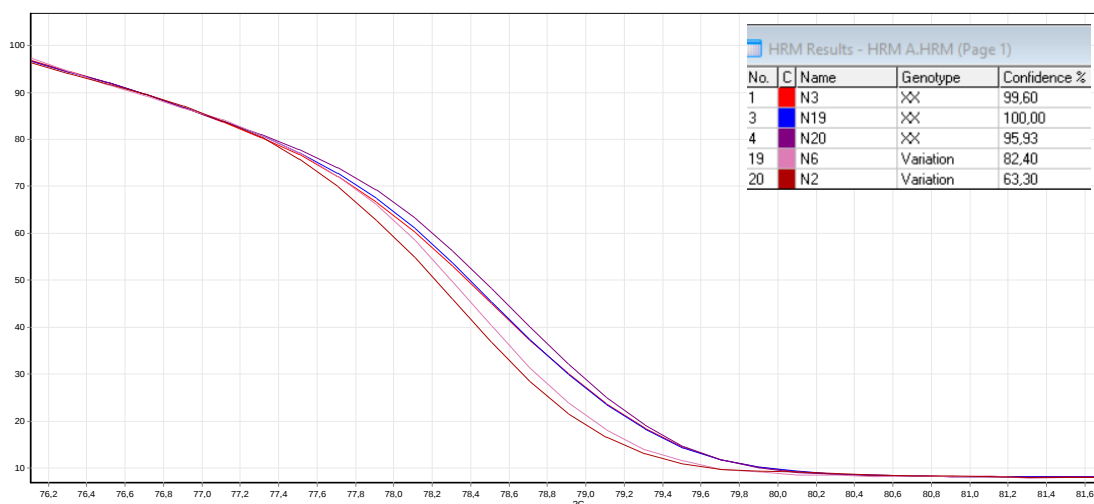


Εικόνα ΠΒ7: Διάγραμμα Κανονικοποιημένου Φθορισμού σε συνάρτηση με τη Θερμοκρασία για τα δείγματα N2new, N3, N7new, N8, N10new, N11new, N13new, N14new, N16new, N17new, N19 και N20. Αναπαρίστανται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 95% στο 10%.

Ζεύγος Εκκινήτων L6

Τα αποτελέσματα της πρώτης ανάλυσης HRM στην οποία δεν εντοπίστηκε επιμόλυνση (δείγματα N2, N3, N6, N16, N19, N20) φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. Στο δείγμα N16 δεν υπήρχε ενίσχυση κατά την αντίδραση, υποδηλώνοντας πως πιθανόν να μην υπήρχε καθόλου DNA στο δείγμα εξ αρχής αν και η μέτρηση με το μηχάνημα Quawell Q3000 φάνηκε να ανιχνεύει DNA, γεγονός που επαληθεύτηκε και από άλλες δοκιμές, όπως και από το gel της Εικόνας 3.2. Για το λόγο αυτό, το δείγμα N16 έχει αφαιρεθεί από τα υπόλοιπα διαγράμματα, όπως και το negative control, ώστε να φαίνεται ορθότερα η ομαδοποίηση των δειγμάτων στην καμπύλη τήξης.

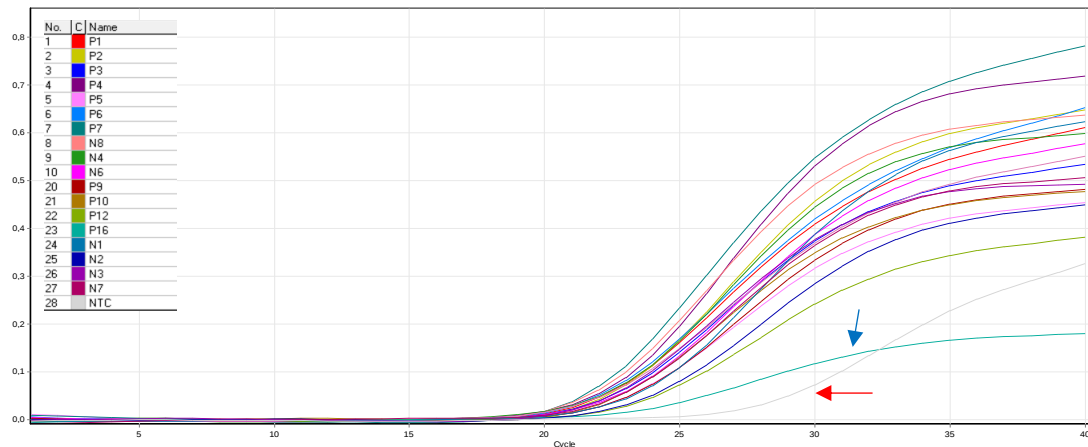
Από το διάγραμμα κανονικοποιημένου φθορισμού συναρτήσεως θερμοκρασίας (Εικόνα ΠΒ8) φαίνεται πως τα δείγματα N3, N19 και N20 ομαδοποιούνται μαζί, καθώς οι καμπύλες του N3 και N19 σχεδόν εφάπτονται η μια της άλλης, ενώ η καμπύλη του N3 εμφανίζει παρόμοια με αυτές συμπεριφορά. Αντίθετα, οι καμπύλες των δειγμάτων N6 και N2 φαίνεται πως είναι διαφορετικές.



Εικόνα ΠΒ8: Διάγραμμα Κανονικοποιημένου Φθορισμού σε συνάρτηση με τη Θερμοκρασία για τα δείγματα N2,N3, N6, N19, N20. Αναπαρίσταιται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 95% στο 10%.

Ζεύγος Εκκινητών L7

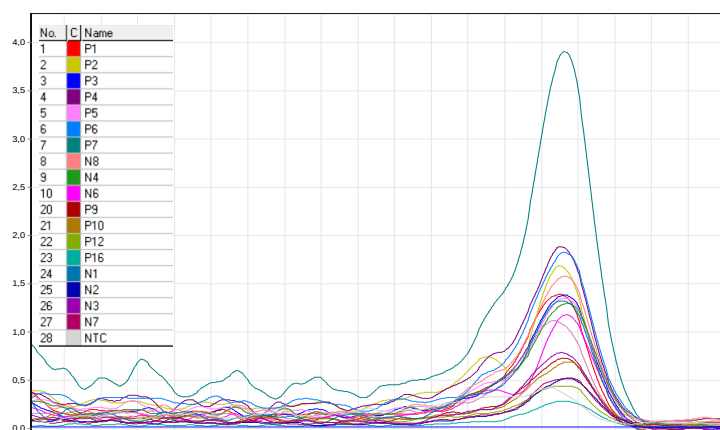
Στα δείγματα των οποίων το DNA απομονώθηκε με το PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen™, έγινε ενίσχυση με τους primers L7 για τα δείγματα P1-P10, P12, P16, N1-N4 και N6-N8. Από τις καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων (Εικόνα ΠΒ9) βλέπουμε πως το δείγμα P16 και το negative control εμφανίζουν καθυστερημένα (>5 κύκλους μετά) και μικρή ενίσχυση και συνεπώς δεν τα λαμβάνουμε υπόψιν μας κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.



Εικόνα ΠΒ9: Καμπύλες ενίσχυσης για τα δείγματα P1-P10, P12, P16, N1-N4 και N6-N8 με τους primers L7. Βλέπουμε πως ενώ η πλειοψηφία των δειγμάτων ξεκινά να ενισχύεται στον ίδιο κύκλο, το negative control (κόκκινο βέλος) και το δείγμα P16 (μπλε βέλος) καθυστερούν. DNA/sample: 30 ng/μl

Στο διάγραμμα μεταβολής φθορισμού συναρτήσει χρόνου (εικόνα ΠΒ10), βλέπουμε πως υπάρχουν διαφορές στο φθορισμό μεταξύ των δειγμάτων. Ακόμη φαίνεται πως το δείγμα P2 εμφανίζει διπλή κορυφή (άρα δε δίνει μοναδικό προϊόν) και πως η κορυφή που δίνεται από το negative control είναι μετατοπισμένη ελαφρώς, κάτι το οποίο μας οδηγεί να συμπεράνουμε πως ίσως πρόκειται για διμερή εκκινητών, καθώς το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών έχει ξαναδώσει διμερή και σε παλαιότερη αντίδραση. Συγκεκριμένα, σε πείραμα που εμφανίστηκε εικόνα επιμόλυνσης στο negative control στα διαγράμματα της ανάλυσης HRM, όταν το προϊόν αυτό «έτρεξε» σε gel αγαρόζης,

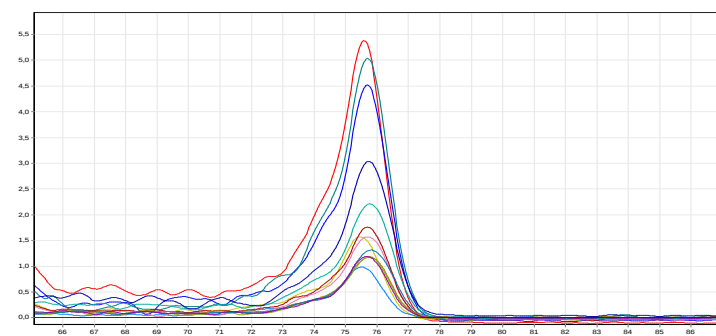
φάνηκε πως είναι διμερή εκκινητών (προϊόν πολύ μικρότερο από 100bp, διαφορετικό από τα προϊόντα των υπόλοιπων δειγμάτων).



Εικόνα ΠΒ10: Καμπύλες μεταβολής φθορισμού για τα δείγματα P1-P10, P12, P16, N1-N4 και N6-N8 με τους primers L7, DNA/sample ~30 ng/μl

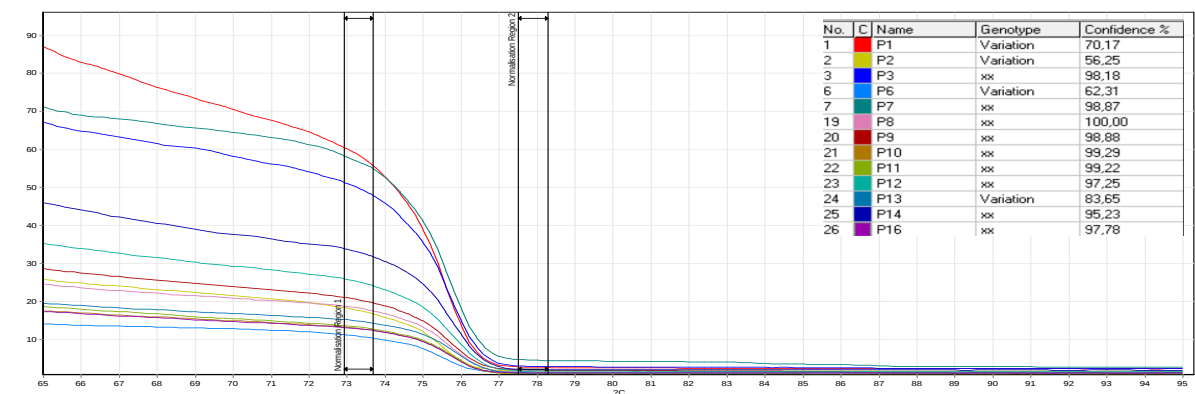
Ζεύγος Εκκινητών L14

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση HRM σε όλα τα θετικά δείγματα (P1-P14, P16). Στα αποτελέσματα του πειράματος, με βάση τις καμπύλες ενίσχυσης, φάνηκε πως το δείγμα P14 όπως και το negative control, καθυστέρησαν πολύ να ξεκινήσουν να ενισχύονται, με αποτέλεσμα να εξαιρεθούν από την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, εξαιρέθηκε και το δείγμα P5, καθώς η καμπύλη ενίσχυσης του ήταν πολύ περίεργη και εμφάνιζε πολύ χαμηλό φθορισμό σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

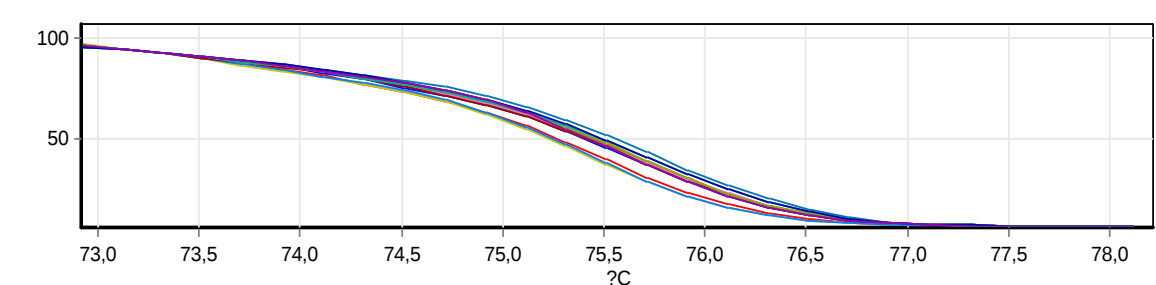


Εικόνα ΠΒ11: Καμπύλες μεταβολής φθορισμού των δειγμάτων P1-P14 και P16 με τους primers L14.

Αν και έχουμε διαφορές στο φθορισμό μεταξύ των δειγμάτων, έχει επιτευχθεί ομαδοποίηση όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα ΠΒ12: Καμπύλες τήξης των δειγμάτων P1-P14 και P16. Φαίνεται η διαφορά στον φθορισμό μεταξύ των δειγμάτων, η οποία πιθανώς να συνδέεται με διαφορετική αρχική συγκέντρωση DNA στο εκάστοτε δείγμα. Στον πίνακα φαίνεται η ομαδοποίηση με βάση το λογισμικό ως προς το δείγμα P8.



Εικόνα ΠΒ13: Διάγραμμα Κανονικοποιημένου Φθορισμού σε συνάρτηση με τη Θερμοκρασία για τα δείγματα P1-P14 και P16 με τους primers L14. Φαίνεται πως οι καμπύλες των δειγμάτων P1, P2, P6 είναι διαφορετικές από τις υπόλοιπες, αλλά μοιάζουν μεταξύ τους.