



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ. 693
Ημερομηνία 29-9-09

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ
LEISHMANIA ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ.



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΥΡΙΑΖΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

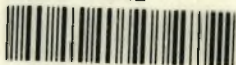
ΛΑΡΙΣΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7667/1
Ημερ. Εισ.: 05-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΚΥΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087173

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων: Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μέλος: Πετεινάκη Ευθυμία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μέλος: Μπιλλίνης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας & Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τη συνεργασία μας, τους: κο Κ. Μαθιόπουλο, κα Ε. Πετεινάκη και κο Χ. Μπιλλίνη.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κο Κ. Μαθιόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά του και την στήριξή του καθ'όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου άσκησης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Κ. Τσουμάνη για τη βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές της. Χάριν της συμβολής της, πολλά λάθη αποφεύχθηκαν και οι εργαστηριακές διαδικασίες διεκπεραιώθηκαν αρτιότερα και μέσα σε ένα ιδιαίτερα φιλικό και ευχάριστο κλίμα.

Έυχαριστώ ακόμη τον συνάδελφο Α. Λιακόπουλο για τη βοήθειά του.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τη συνάδελφο και φίλη μου Π. Κοσκινιώτη, στην οποία οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη στήριξη που μου προσέφερε στις δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την υπομονή και την κατανόηση που έδειξαν τα τέσσερα χρόνια των σπουδών μου και ιδιαίτερα την περίοδο που πραγματοποιήθηκε η διπλωματική μου άσκηση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Τί είναι η λείσμανίαση.....	5
1.2 Βιολογία του πρωτοζώου <i>Leishmania</i>	6
1.3 Μορφολογία, ανατομία και κατάταξη του φορέα- φλεβοτόμου.....	7
1.4 Βιολογικός Κύκλος φλεβοτόμου.....	9
1.5 Κύκλος ζωής του παρασίτου <i>Leishmania</i> στις φλεβοτόμους σκνίπες και στον άνθρωπο.....	9
1.6 Κυριότερες μορφές λείσμανίασης- Είδος και κατανομή παρασίτου.....	11
1.7 Είδος και κατανομή φορέα.....	18
1.8 Σύνδεση εξάπλωσης παρασίτου με την κατανομή του φορέα.....	20
1.9 Τύποι <i>Leishmania</i> στην Ελλάδα και φορείς μετάδοσης.....	22
1.10 Εργαστηριακή διάγνωση της ασθένειας.....	24
1.11 Σκοπός.....	26
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	27
2.1 Ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό ασθενών.....	27
2.2 Εκχύλιση DNA από αίμα ασθενών.....	28
2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	29
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης.....	32
2.5 Απομόνωση του DNA από gel αγαρόζης και καθαρισμός.....	33
2.6 Σύνδεση μορίων DNA (Ligation).....	35
2.7 Μετασχηματισμός βακτηρ. κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια...	36
2.8 Μεταφορά των κυττάρων σε στερεή καλλιέργεια.....	37
2.9 Επιλογή ανασυνδυασμένων αποικιών και μεταφορά τους σε υγρή καλλιέργεια.....	38
2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	39
2.11 Πέψη πλασμιδιακού DNA.....	40
2.12 Καθαρισμός με φαινόλη/ χλωροφόρμιο.....	41
2.13 Κατακρήμνιση του DNA (Eth rpt).....	42

2.14 Ανάλυση πρωτοδιάταξης DNA αλληλουχίας (sequencing).....	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

Περίληψη

Η λείσμανίαση αποτελεί παρασιτική νόσο που ενδημεί σε τροπικές και υποτροπικές χώρες, αλλά και σε χώρες της νότιας Ευρώπης. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται γεωγραφική επέκταση της νόσου, με αυξημένο αριθμό περιπτώσεων στις περισσότερες ενδημικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένης και της χώρας μας. Προδιαθεσικούς παράγοντες νόσησης αποτελούν ο υποσιτισμός, η φυσική εξασθένηση όπως και η προσβολή από τον ιό HIV, για τον οποίο η λείσμανίαση (και συγκεκριμένα η σπλαχνική μορφή της), αποτελεί ευκαιριακή λοίμωξη. Κύριος ξενιστής του παρασίτου είναι ο σκύλος, αλλά και άλλα κατοικίδια και άγρια ζώα, καθώς και ο άνθρωπος. Η λείσμανίαση μεταδίδεται με το τσίμπημα φλεβοτόμων σκνιπών. Χαρακτηρίζεται από μία ποικιλία κλινικών συνδρόμων, με σοβαρότερο τη σπλαχνική λείσμανίαση. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη, με τη χρήση μοριακών τεχνικών, των διαφοροποιήσεων των μολυσματικών παραγόντων που μεταδίδουν τη *Leishmania* στον άνθρωπο. Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανθρώπων που έχουν μολυνθεί με τη νόσο στην περιοχή της Θεσσαλίας. Τμήμα της μικρής υπομονάδας της ριβοσωμικής περιοχής της *Leishmania* ενισχύθηκε και στη συνέχεια η πρωτοδιάταξη της αλληλουχίας αναλύθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί το υποείδος του παρασίτου που ευθυνόταν για την ασθένεια. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων, έδειξαν πως δεν υπάρχει διαφοροποίηση στους μολυσματικούς παράγοντες που μεταδίδουν τη νόσο στη χώρα μας, ενώ το υποείδος που βρέθηκε να ευθύνεται για τη νόσο (*L. infantum*) είναι αυτό που ευθύνεται για την μετάδοση της νόσου και στους σκύλους της περιοχής.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι η λείσμανίαση:

Η λείσμανίαση είναι ένα από τα μείζονα λοιμώδη νοσήματα με 1,5-2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις ετησίως. Στον κατάλογο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) / Έρευνα Τροπικών Νοσημάτων (World Health Organization / Tropical Disease Research) περιλαμβάνεται μεταξύ των 6 σημαντικότερων τροπικών νοσημάτων [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004] .

Η ασθένεια είναι γνωστή από το παρελθόν με διάφορες εξωτικές ονομασίες οι οποίες συνήθως αντανakλούν τη γεωγραφική της κατανομή, όπως: έκφυμα της Ανατολής, Νόσος της Χαλέπας, έλκος της Βαγδάτης, ρόδο της Ιεριχούς, γιούτα, εσπούντια, καλαζάρ, πυρετός dumdum, μαύρος πυρετός, χανιώτικο, μούρο, λουμπίνι [για ανασκόπηση βλέπε: Πολίτης, 2006]. Στην Αμερική, σχέδια σε αντικείμενα της εποχής πριν τον Κολόμβο αποδεικνύουν την ύπαρξη της νόσου στην ήπειρο από πολύ παλιά. Αναπαραστάσεις των δερματικών βλαβών και των παραμορφώσεων του προσώπου, βρέθηκαν σε αγγεία της προ-Ινκας εποχής στο Περού και το Εκουαντόρ και χρονολογούνται από τον 1^ο μ.Χ αιώνα [WHO, 2000]. Στην Αφρική και την Ασία, η νόσος εμφανίζεται τουλάχιστον από τα μέσα του 18^{ου} αιώνα [WHO, 2000]. Τα τελευταία 10 χρόνια οι ενδημικές περιοχές έχουν επεκταθεί και παρατηρείται απότομη αύξηση των περιπτώσεων, οι οποίες σήμερα υπολογίζονται σε 12.000.000 σε όλο τον κόσμο [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004].

Η λείσμανίαση προκαλείται από 20 και πλέον είδη του ενδοκυτταρικού πρωτόζωου **Leishmania** -εκ των οποίων τα κυριότερα είναι αυτά που ανήκουν στο σύμπλεγμα της *L. donovani*, της *L. tropica* και η *L. Braziliensis*- και μεταδίδεται σε ζώα και ανθρώπους κυρίως με το σίμπημα μολυσμένων αρθρόποδων της υποοικογένειας **Phlebotominae** (σκνίπες-sandflies), που αποτελούν τους ενδιάμεσους ξενιστές του παρασίτου [για ανασκόπηση βλέπε: Kansouzidou et al., 2006; Myler and Fasel, 2008]. Οι σκνίπες μολύνονται από το παράσιτο αφότου απομυζήσουν αίμα από μολυσμένο με λείσμανίαση άνθρωπο ή ζώο, όπως τρωκτικό ή σκύλο.



Εικόνα1 Leishmania [Med. Science:Parasites.Leishmania]

Στον άνθρωπο, δύο είναι τα είδη σκνίπας που μεταδίδουν τη νόσο: Το γένος **Lutzomyia** το οποίο οφείλεται για την εξάπλωση της στον Νέο Κόσμο και το γένος **Phlebotomus** το οποίο οφείλεται για την εξάπλωσή της στον Παλαιό Κόσμο [για ανασκόπηση βλέπε: Myler and Fasel, 2008]. Η λείσμανίαση μπορεί επίσης να μεταδοθεί στον άνθρωπο με μετάγγιση αίματος ή με μολυσμένες βελόνες, ενώ σπανίως μεταδίδεται και από την έγκυο μητέρα στο βρέφος [για ανασκόπηση βλέπε: ΚΕΕΛΠΝΟ, 2007].

Η νόσος παρουσιάζει μεγάλο εύρος κλινικών εκδηλώσεων, ανάλογα με το είδος του πρωτόζωου και την ανοσιακή κατάσταση του ξενιστή και σε περιπτώσεις που η διάγνωση και η αντιμετώπιση δεν είναι έγκαιρες, μπορεί να αποβεί θανατηφόρα [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004].

1.2 Βιολογία του πρωτοζώου Leishmania

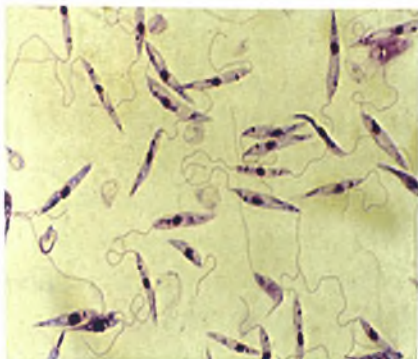
Το πρωτόζωο *Leishmania* περιγράφηκε το 1903 από τον Άγγλο στρατιωτικό χειρουργό William Boog Leishman, σε δείγμα από τον σπλήνα ασθενών που είχαν πεθάνει από πυρετό dum-dum (Dum dum ονομάζεται μία περιοχή κοντά στην Καλκούτα), και χωριστά από τον Charles Donovan μετά από μελέτη του σε ασθενείς από την Ινδία και ονομάστηκε ***Leishmania donovani*** .[για ανασκόπηση βλέπε: Kansouzidou et al., 2006;WHO, 2007]

Δομή: Ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι οργανισμοί, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα. Έχουν κυτταροπλασματική μεμβράνη που διατηρεί το σχήμα τους σταθερό και είναι εφοδιασμένοι με οργανίδια κίνησης. Το κυτταρόπλασμα τους περιέχει μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, ριβοσώματα, συσκευή Golgi, λυσοσώματα, κενοτόπια κλπ. χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών κυττάρων [για ανασκόπηση βλέπε: Stamos-Parasitology] .

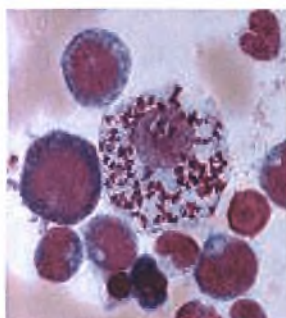
Διατροφή: ολοζωϊκή, δηλαδή προσλαμβάνουν με φαγοκυττάρωση ουσίες που διασπούν με ένζυμα.

Αναπνοή: αερόβια

Το παράσιτο υπάρχει σε **δύο μορφές**: Την **αμαστιγωτή μορφή** ή **λείσμάνια**, που δεν φέρει μαστίγιο, έχει όμως πυρήνα, βλεφαριδοπλάστη και αξόνημα, και το σχήμα της είναι σφαιρικό ή ωσειδές. Η μορφή αυτή ανευρίσκεται μέσα στα μακροφάγα των κύριων ξενιστών, που είναι τα ζώα και ο άνθρωπος ενώ σε φλεβοτόμους και σε ειδικές καλλιέργειες λαμβάνει σχήμα **λεπτομονάδας** (προμαστιγωτή μορφή). Η λεπτομονάδα είναι λεπτή, επιμήκης μορφή του παρασίτου με πυρήνα, βλεφαριδοπλάστη και μαστίγιο [για ανασκόπηση βλέπε: Stamos – Parasitology;Herwaldt 1999]



Εικόνα 2.A Λεπτομονάδες σε ειδική καλλιέργεια [Καλλέργη – Εργαστ. Διάγνωση Λοιμώξεων από Λείσμάνια]



Εικόνα 2.B Πολυάριθμες αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου μέσα στο κυτταρόπλασμα ενός μακροφάγου [Καλλέργη - Εργ. Διάγνωση Λοιμώξεων από Λείσμάνια]

1.3 Μορφολογία, ανατομία και κατάταξη του φορέα- φλεβοτόμου

Τάξη: Diptera Linnaeus

Υπόταξη: Nematocera Latreille

Οικογένεια: Psychodidae Bigot

Υποοικογένεια: Phlebotominae

Οι φλεβοτόμοι είναι αρθρόποδα, πτερυγωτά έντομα. Ανήκουν στην τάξη των διπτέρων, που σημαίνει πως έχουν μαλακό σώμα, ένα ζεύγος κεραιών και δύο ζεύγη πτερυγίων. Από τα δύο ζεύγη πτερυγίων, το πρώτο αποτελείται από μεγάλα φτερά, σαν μεμβράνες, ενώ το δεύτερο είναι πολύ μικρό και χρησιμεύει σαν όργανο ισορροπίας. Οι κεραιές τους είναι νηματοειδείς και αρκετά μακριές [για ανασκόπηση βλέπε: Ρόζος, 2003].

Όπως σε όλα τα έντομα, το σώμα τους διαχωρίζεται σε κεφαλή, θώρακα και κοιλία, καθώς και τρία ζεύγη βαδιστικών άκρων [για ανασκόπηση βλέπε: Ρόζος, 2003].

Στην κεφαλή βρίσκονται δύο σύνθετοι οφθαλμοί, οφθαλμίδια, οι κεραιές και τα στοματικά μόρια. Οι κεραιές είναι όργανα όσφρησης, αφής αλλά και διερεύνησης των ρευμάτων του αέρα. Τα στοματικά μόρια των σκνιπών είναι μυζητικού τύπου και χαρακτηρίζονται από την παρουσία προβοσκίδας. Ο θώρακας αποτελείται από τρία τμήματα και κάθε τμήμα φέρει ένα ζεύγος βαδιστικών ποδιών. Τα άκρα αποτελούνται από 5 τμήματα, εκ των οποίων το τελευταίο έχει νύχια για την σταθεροποίησή του εντόμου. Οι πτέρυγες είναι μεμβρανώδεις και στην επιφάνειά τους διακρίνονται γραμμικές παχύνσεις, τα νεύρα. Στο πεπτικό σύστημα περιλαμβάνονται το στοματικό άνοιγμα, οι σιαλογόνοι αδένες, ο φάρυγγας, ο οισοφάγος, το στομάχι και το λεπτό

έντερο, το απευθυσμένο και η έδρα. Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από ελαστικούς σωλήνες, τις τραχείες, που διακλαδίζονται σε ολόκληρο το σώμα.

Τον ρόλο του νευρικού συστήματος παίζουν τα εγκεφαλικά γάγγλια, που δίνουν νευρικούς σχηματισμούς σε όλο το σώμα. Τα αισθητήρια όργανα έχουν ενδιαφέρον, διότι είναι φωτοδέκτες, απτοδέκτες, χημοδέκτες (χημικές ουσίες, π.χ. νερό) και θερμοδέκτες. Υπάρχει φυσικά και κυκλοφορικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από την καρδιά και την αορτή. Το γεννητικό σύστημα του θηλυκού αποτελείται από δύο ωοθήκες, τους ωαγωγούς, τον κόλπο και το γεννητικό άνοιγμα. Υπάρχει κι ένα ειδικό όργανο, ο ωοθέτης, με το οποίο εναποτίθενται τα αβγά. Το γεννητικό σύστημα του αρσενικού περιλαμβάνει τους δύο όρχεις, τους σπερματογωγούς και το πέος [για ανασκόπηση βλέπε: Ρόζος, 2003].

Από την ανατομία τους γίνεται κατανοητό πως οι σκνίπες είναι πολύπλοκοι οργανισμοί, αν και απλούστεροι από τα θηλαστικά. Η ανατομική τους απλότητα ευθύνεται για το ότι τα έντομα αυτά είναι απόλυτα προσαρμοσμένα στο περιβάλλον τους. Αποτελούν τμήματα πολύπλοκων οικοσυστημάτων, αφού και τα ίδια χρησιμεύουν ως τροφή σε άλλους οργανισμούς [για ανασκόπηση βλέπε: Ρόζος, 2003].



Εικόνα 3 Phlebotomus [kynigos.net.gr/veterin/leishmaniasis]

Οι φλεβοτόμοι είναι νυκτόβιοι. Δραστηριοποιούνται σχεδόν κατά κανόνα τη νύχτα (μετά από τη δύση του ήλιου). Κατά την ανάπαυση, τοποθετούν τα φτερά τους υπό γωνία πάνω από την κοιλία τους (σε σχήμα V). Πριν από το νύγμα, πηδούν σε κύκλους γύρω από το σημείο στόχο του θύματός τους [Protozoologia / Protozoa Goldfus, 1918].

Οι αρσενικές και οι θηλυκές σκνίπες τρέφονται από φυσικές πηγές γλυκόζης. Οι θηλυκές σκνίπες χρειάζονται επιπλέον απομύζηση αίματος για την ωρίμανση των αβγών τους. Από αυτό συμπεραίνεται ότι οι αρσενικές σκνίπες δεν τσιμπούν. Πριν από την απομύζηση αίματος, προηγείται έκκριση σάλιου πάνω στο δέρμα του ξενιστή, το οποίο περιέχει αντιπηκτικές ουσίες [για ανασκόπηση βλέπε: Ρόζος, 2003; Protozoologia / Protozoa Goldfus, 1918].

Η επιλογή του ξενιστή ποικίλλει μεταξύ των ειδών. Μερικά είδη σκνίπας διατρέφονται από περιορισμένο εύρος ξενιστών, ενώ άλλα διατρέφονται από οποιοδήποτε θηλαστικό, πτηνό ή ερπετό [Protozoologia / Protozoa Goldfus, 1918].

1.4 Βιολογικός Κύκλος φλεβοτόμου

Ο πλήρης βιολογικός κύκλος της σκνίπας διαρκεί 6 εβδομάδες και δεν εξελίσσεται σε υδατοσυλλογές, αλλά σε υγρούς και σκοτεινούς χώρους.

Τα θηλυκά μόλις ενηλικιωθούν και μετά την πάροδο 24 ωρών μυζούν αίμα και μετά από 24 ώρες γονιμοποιούνται. Γεννούν αβγά σε ομάδες των 40-70 αβγών σε υγρά και σκοτεινά μέρη (χόρτα, ρωγμές εδάφους, κάτω από πέτρες, κλπ). Η γέννηση των αβγών γίνεται 4-8 ημέρες μετά από την απομύζηση αίματος.

Η εκκόλαψη συμβαίνει μετά από 6-13 ημέρες και η προνύμφη τρέφεται με οργανικά υλικά (κόπρانا σαύρας, νυχτερίδας κλπ). Μετά από 20-70 ημέρες, η προνύμφη εξελίσσεται σε νύμφη και μετά την πάροδο 9-21 ημερών εμφανίζονται τα ενήλικα έντομα, τα οποία δε ζουν περισσότερο από 14-21 ημέρες.

Η συνολική διάρκεια του βιολογικού κύκλου είναι περίπου 30-56 ημέρες. Ετησίως αναπτύσσονται 3-5 γενιές [*Protozoologia / Protozoa Goldfus, 1918*].

Στην περιοχή της Μεσογείου, η περίοδος δράσης των σκνιπών ξεκινά τον Απρίλιο και τελειώνει τον Οκτώβριο ή εάν το φθινόπωρο είναι ζεστό το Νοέμβριο [*για ανασκόπηση βλέπε: Νεόφυτος / Kynagon*].

1.5 Κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania* στις φλεβοτόμους σκνίπες και στον άνθρωπο

Η σχέση των φλεβοτόμων σκνιπών με τη μετάδοση της νόσου αποδείχθηκε το 1931-1934 στην Ινδία [*για ανασκόπηση βλέπε: Kansouzidou et al., 2006*]. Οι σκνίπες απομυζούν αίμα απ' το σούρουπο μέχρι το ξημέρωμα και ζουν κυρίως σε δασώδεις περιοχές, σε υποτροπικά και τροπικά κλίματα, γι' αυτό και η λείσμανίαση ενδημεί περισσότερο σε τροπικές και υποτροπικές χώρες και σε χώρες της Νότιας Ευρώπης [*για ανασκόπηση βλέπε: Καλογερόπουλος, 2002*].

Οι θηλυκοί φλεβοτόμοι μολύνονται όταν κατά τη διάρκεια του γεύματός τους, λάβουν μακροφάγα μολυσμένα με αμαστιγωτές μορφές από μολυσμένο ζώο ή άνθρωπο [*CDC, Division of Parasitic Diseases*]. Κατά την απομύζηση αίματος, οι αμαστιγωτές μορφές προσλαμβάνονται και απελευθερώνονται στο πίσω τμήμα του μεσέντερου της σκνίπας και εκεί μετατρέπονται γρήγορα στις κινητές προμαστιγωτές μορφές. Οι προμαστιγωτές μορφές πολλαπλασιάζονται γρήγορα με διαδική διχοτόμηση [*Protozoologia / Protozoa Goldfus, 1918*].

Το αίμα που απομυζήθηκε περιβάλλεται στον εντερικό αυλό της σκνίπας από περιτροφική μεμβράνη. Τα ένζυμα που παράγονται από τα παράσιτα της *Leishmania* καταστρέφουν τη μεμβράνη αυτή και απελευθερώνουν τα παράσιτα. Στο έντερο προσκολλώνται στο τοίχωμα. Καθώς τα παράσιτα πολλαπλασιάζονται, μετακινούνται κρανιακά προς την οισοφαγική βαλβίδα του θωρακικού μεσέντερου [*Protozoologia / Protozoa Goldfus, 1918*].

Οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές παράγονται σε όλη τη διάρκεια αυτού του σταδίου. Αυτή η μορφή του παράσιτου (λεπτομονάδα) είναι ικανή να μολύνει τους σπονδυλωτούς ξενιστές. Οι μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές διαφέρουν μορφολογικά από τις μορφές που πολλαπλασιάζονται και είναι ανθεκτικές στην πέψη από τα μακροφάγα. Οι μετακυκλικές μορφές εισβάλλουν στα στοματικά μόρια της σκνίπας και μπορεί να τις δει κανείς στους σιαλογόνους αδένες της σκνίπας. Υπάρχουν διαφορετικές απόψεις για τη σχέση της ύπαρξης των παρασίτων στις θέσεις αυτές και της μετάδοσης. Φαίνεται ότι η *Leishmania* μεταδίδεται με αναγωγή από το θωρακικό μεσέντερο στο δέρμα του ξενιστή κατά τη διάρκεια του νύγματος της σκνίπας [*Protozoologia / Protozoa Goldfus, 1918*].

Όταν ο άνθρωπος μολυνθεί με τις λεπτομονάδες, αυτές προσλαμβάνονται απ' τα μακροφάγα (κύτταρα άμυνας) του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος με φαγοκυττάρωση [*για ανασκόπηση βλέπε: Herburn et al., 2000*].

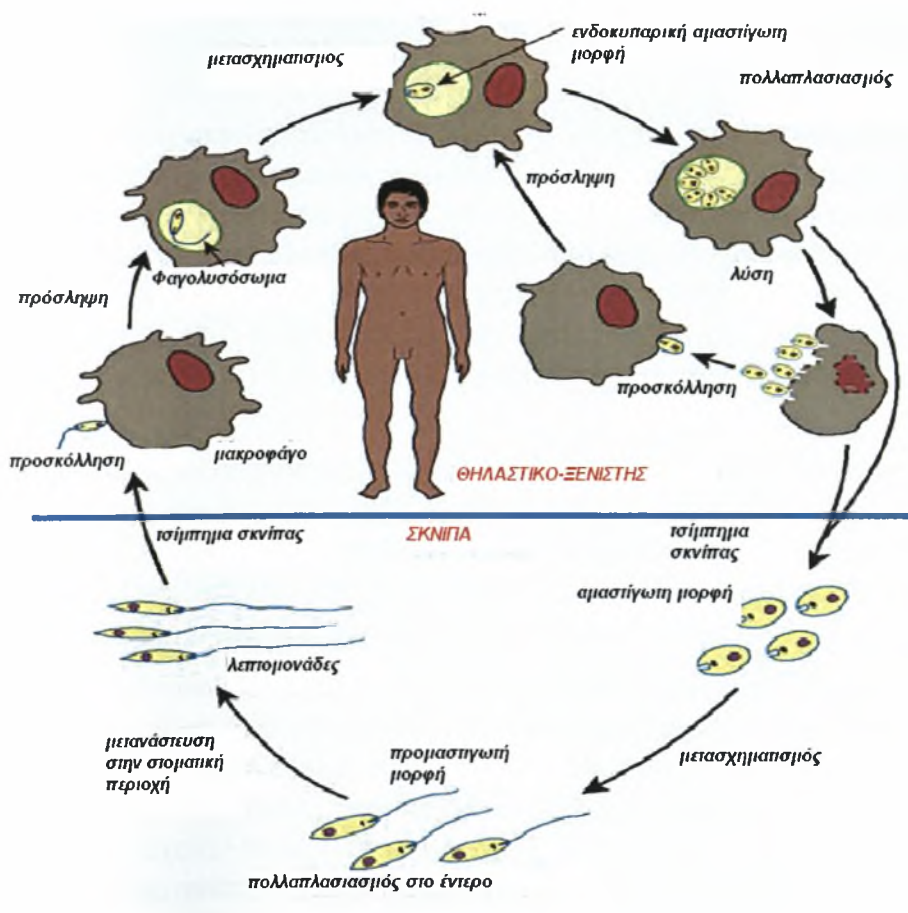


Εικόνα 4. Λείσμάνια εισέρχεται σε μακροφάγο [*icp.ac.be/trop/images*]



Εικόνα 5. Σκνίπα (*Phlebotomus*) [*keele.ac.uk/depts/aep/staff*]

Ακολούθως τα μακροφάγα μεταφέρονται στα διάφορα όργανα (ιδίως σπλήνα, συκώτι, λεμφαδένες, μυελό οστών). Εντός των μονοπύρηνων μακροφάγων, οι λείσμάνιες μετατρέπονται και πάλι στην ενδοκυττάρια αμαστίγωτη μορφή. Ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων εντός των μακροφάγων οδηγεί τελικά στη ρήξη των κυττάρων, στην απελευθέρωση στην κυκλοφορία, στην προσβολή άλλων μακροφάγων και τελικά στην επέκτασή τους σε όλα τα όργανα του δικτυο-ενδοθηλιακού συστήματος [*για ανασκόπηση βλέπε: Herburn et al., 2000*]



Εικόνα 6. Κύκλος ζωής της *Leishmania* στην σκνίπα και στον άνθρωπο
 [Καλλέργη - Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων από Λείσμανία]

1.6 Κυριότερες μορφές λείσμανίασης- Είδος και κατανομή παρασίτου

Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι λείσμανίασης - σπλαχνική (visceral), δερματική (cutaneous), και βλεννογονοδερματική λείσμανίαση (mucocutaneous) - καθένας εκ των οποίων προκαλείται από διαφορετικά είδη *Leishmania* [Alvar et al., 1997]:

Σπλαχνική	Δερματική	Βλεννογονοδερματική
<i>L.donovani</i>	<i>L.tropica</i>	<i>L.brasiliensis</i>
<i>L.infantum</i>	<i>L.major</i>	
<i>L.chagasi</i>	<i>L.aethiopica</i>	

Πίνακας 1. Ταξινόμηση Ειδών *Leishmania* που προκαλούν τη νόσο στον άνθρωπο
 [Καλλέργη - Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων από Λείσμανία].

α) ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ :

Η σπλαχνική λείσμανίαση είναι επίσης γνωστή ως Κάλα-Αζάρ (το οποίο στα νεοϊνδικά σημαίνει «μαύρος πυρετός»), είναι η πιο σοβαρή μορφή της ασθένειας, στην οποία το παράσιτο μολύνει το ανοσοποιητικό σύστημα. Παλαιότερα οι επιστήμονες πίστευαν πως προκαλείται από έναν μόνο παράγοντα αλλά πλέον έχει βρεθεί πως οφείλεται σε τουλάχιστον τρία υποείδη που ανήκουν στο σύμπλεγμα της *Leishmania donovani*, ωστόσο διαχωρίζονται μεταξύ τους κλινικά και βιοχημικά και επίσης έχουν διαφορετική γεωγραφική κατανομή [Magill et al., 1993]:

Η *Leishmania donovani donovani* συναντάται στην Ινδία, στο Πακιστάν, στην Ταϊλάνδη, στη Βιρμανία, στη Σουμάτρα, στην Ουγκάντα, στην Κένυα, στο Σουδάν, στην Αιθιοπία, στη Σομαλία, στο Τζιμπουτί, στη Νιγηρία και στην κεντρική Αφρική. Μολύνει άτομα οποιασδήποτε ηλικίας και μεταδίδεται μέσω της φλεβοτόμου σκνίπας [David John et al., 2006].

Η *Leishmania donovani infantum* συναντάται κατά μήκος όλων των παραλίων της Μεσογείου – στην Ευρώπη, στις Ανατολικές χώρες και στην Αφρική. Στην Ευρώπη βρίσκεται κυρίως στην Ρουμανία και Ουγγαρία καθώς επίσης και στη Νότια Σοβιετική Ένωση. Επίσης έχει βρεθεί στην Βόρεια Κίνα και στην Νότια Σιβηρία. Σχεδόν αποκλειστικά, προσβάλλονται παιδιά μέσω τσιμπήματος από φλεβοτόμο σκνίπα όμως ο άνθρωπος θεωρείται “κατάλαθος” ξενιστής αφού οι κύριοι ξενιστές στη φύση είναι σκύλοι και αλεπούδες αλλά και σκαντζόχοιροι. [David John et al., 2006]

Η *Leishmania donovani chagasi* συναντάται στην Νότια και Κεντρική Αμερική, στη Βολιβία, στη Βραζιλία, στη Βενεζουέλα στην Κολομβία, στον Ισημερινό, στη Γουατεμάλα, στο Μεξικό και στη Γουαδελούπη. Από τον ανθρώπινο πληθυσμό, κυρίως προσβάλλονται παιδιά ενώ οι φυσικοί ξενιστές είναι σκυλιά, γάτες και αλεπούδες [David John et al., 2006].

Αίτια	Κλινικά σύνδρομα	Δεξαμενές του παρασίτου	Γεωγραφική κατανομή
<i>L. d. donovani</i>	(α) Σπλαχνική λείσμανίαση (β) Μετά kala-azar δερματική λείσμανίαση (post-kala-azar dermal leishmaniasis)	Άνθρωπος	Ανατολική Αφρική (Σουδάν, Κένυα, Αιθιοπία), Ινδία, Μπανγκλαντές, Νεπάλ
<i>L. d. infantum</i>	Σπλαχνική λείσμανίαση	Σκύλοι/αλεπούδες σκαντζόχοιροι	Χώρες γύρω από τη Μεσόγειο, Δυτική Αφρική, Πακιστάν, Ιράν, Βόρεια Κίνα
<i>L. d. chagasi</i>	Σπλαχνική λείσμανίαση	Σκύλοι/αλεπούδες	Κεντρική και Νότια Αμερική

Πίνακας 2. Αίτια της σπλαχνικής λείσμανίασης, κλινικά σύνδρομα, δεξαμενές του παρασίτου και γεωγραφική κατανομή [Magill et al., 1993]



Εικόνα 7. Γεωγραφική κατανομή σπλαχνικής Λείσμανιάσης
[www.vet.uga.edu/.../leishmania/eng/leish04.htm]

Συμπτωματολογία και Παθογένεση :

Οι ασθενείς που πάσχουν από σπλαχνική λείσμανιάση συχνά παρουσιάζουν κοιλιακό οίδημα χωρίς να εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένη ασθένεια [David John et al., 2006].

Στις εξετάσεις φαίνεται πώς έχουν διογκωμένο σπλήνα και ήπαρ ενώ συχνά παρατηρείται διάρροια και πυρετός. Επίσης στα πρώιμα στάδια της ασθένειας, συχνά οι ασθενείς εμφανίζουν αδυναμία και νοσηρία. Σταδιακά παρατηρείται απώλεια βάρους του ασθενή όσο εξαπλώνεται η μόλυνση [Leishmaniasis. In: Manson's tropical diseases, 1983].

Η αναιμία είναι ένα σχεδόν μόνιμο σύμπτωμα. Η πανκυτταροπενία που υπάρχει, οφείλεται στην κατάληψη του μυελού, στον υπερσπληνισμό, αλλά και στην καταστροφή των έμμορφων στοιχείων με αυτοάνοσο μηχανισμό [Leishmaniasis. In: Manson's tropical diseases, 1983].



Εικόνα 8. Παιδί με σπλαχνική λείσμανιάση
[Patrick Woster-Chemistry of Antiparasitic Agents]

Τα περισσότερα είδη που προκαλούν σπλαχνική λείσμανιάση, παρασιτούν κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, κυρίως στον σπλήνα και στο ήπαρ, οδηγεί σε βαριάς μορφής υπερτροφία των οργάνων αυτών, τα οποία όμως μπορούν να επανέλθουν σε φυσιολογικό μέγεθος αν χορηγηθεί θεραπεία για την ασθένεια.

Επιπρόσθετα, οι ασθενείς έχουν χαμηλό αριθμό λευκοκυττάρων ενώ η σπληνομεγαλία που οφείλεται σε στάση του αίματος στις κολπώσεις, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη καταστροφή και ερυθροκυττάρων αλλά και λευκοκυττάρων [David John et al., 2006].

Θεραπεία:

Η σπλαχνική λείσμανίαση χωρίς θεραπεία είναι νόσος θανατηφόρος σε ποσοστό 80%. Ο θάνατος οφείλεται κυρίως στις επιπλοκές της νόσου, συνηθέστερες των οποίων είναι οι αιμορραγίες και οι βακτηριδιακές λοιμώξεις καθώς η είσοδος των παρασίτων στα μακροφάγα παραβλάπτει τη λειτουργικότητά τους, την παρουσίαση των αντιγόνων στα CD4 βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και την έκκριση κυτταροκινών. [Δελτ. Α' Παιδιατρ. Κλιν. Πανεπ. Αθηνών, 2003].

Η θεραπεία της σπλαχνικής λείσμανίασης τα τελευταία 40 χρόνια **βασίζεται στις ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου**: Glucantime (meglumine antimonate), Pentostam (sodium stibogluconate) [Sundar and More, 2000].

Εάν η νόσος είναι ανθεκτική στην αγωγή με ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου ή εμφανισθούν ανεπιθύμητες ενέργειες που επιβάλλουν τη διακοπή της (καρδιοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα), χρησιμοποιούνται η **αμφοτερικίνη Β**, η **πενταμιδίνη**, ή η **κετοконаζόλη**, φάρμακα αποτελεσματικά αλλά αρκετά τοξικά [για ανασκόπηση βλέπε: Berman, 1997].

Τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί με αρκετά καλά αποτελέσματα μορφές της αμφοτερικίνης Β συνδεδεμένες με διάφορα λιπίδια όπως η **λιποσωμική αμφοτερικίνη Β (Ambisome)** καθώς και η **συνδεδεμένη με χοληστερόλη (Amphocil)** [Δελτ Α' Παιδιατρ Κλιν Πανεπ Αθηνών, 2003].

Στη χώρα μας οι υποτροπές είναι σπάνιες και οι ανθεκτικές μορφές είναι ακόμη σπανιότερες (αναφέρονται ποσοστά μικρότερα του 15%). Για τις υποτροπές και την ανθεκτικότητα έχουν ενοχοποιηθεί η καθυστέρηση στη διάγνωση, η ελλιπής θεραπεία και η καθυστέρηση του δεύτερου κύκλου θεραπείας [Δελτ Α' Παιδιατρ Κλιν Πανεπ Αθηνών, 2003].

β) ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΛΑΙΟΥ ΚΟΣΜΟΥ (ΜΕΣΟΓΕΙΟΣ, ΑΣΙΑ, ΑΦΡΙΚΗ):

Η δερματική λείσμανίαση είναι η πιο συνήθης μορφή της ασθένειας, πλήττει κυρίως την επιδερμίδα, προκαλώντας απλές αλλοιώσεις, οι οποίες συνήθως θεραπεύονται από μόνες τους αλλά αφήνουν ουλές [Griffiths / Old world cutaneous leishmaniasis, 1987]. Υπάρχουν τρία είδη λείσμανίας που προκαλούν τη δερματική λείσμανίαση. Όλα ανήκουν στο σύμπλεγμα της *Leishmania tropica* και διαβιβάζονται από σκνίπες του γένους *Phlebotomus* [David John et al., 2006].

Η *Leishmania tropica* προκαλεί μία χρόνια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την δημιουργία ξηρών πληγών που υποχωρούν μετά από πολλούς μήνες και εμφανίζονται κυρίως στο πρόσωπο. Η μορφή αυτή της Λείσμανιάσης καλείται αστικού τύπου ξηρή δερματική λείσμανιάση [Griffiths / Old world cutaneous leishmaniasis, 1987]. Συναντάται στην Αρμενία, στο Αζερμπαϊτζάν, στο Ουζμπεκιστάν, στο Αφγανιστάν, στο Πακιστάν, στο Ιράν και στην Ινδία. Τα σκυλιά αποτελούν φυσικούς ξενιστές ωστόσο ο άνθρωπος δεν αποτελεί εξακριβωμένη δεξαμενή του μικροβίου [David John et al., 2006].

Η *Leishmania major* προκαλεί οξεία μόλυνση με διάρκεια από 3 έως 6 μήνες. Οι αλλοιώσεις εμφανίζονται κυρίως στα κάτω άκρα, είναι υγρές και εξελκούνται πολύ νωρίς [Griffiths / Old world cutaneous leishmaniasis, 1987]. Η *Leishmania major* συναντάται στο Ουζμπεκιστάν, στο Καζακιστάν, στο Πακιστάν, στην Ινδία, στο Ιράν, στη Συρία, στο Ισραήλ, στην Ιορδανία, στην Αλγερία, στην Αίγυπτο, στην Τυνησία, στη Νιγηρία, στο Σουδάν, στη Σαχάρα και στην Κίνα. Τα τρωκτικά αποτελούν δεξαμενές της ασθένειας και μέσω αυτών πολύ συχνά μολύνεται ο άνθρωπος [David John et al., 2006].

Η *Leishmania aethiopsica* προκαλεί παρόμοια χρόνια ασθένεια με αυτή που προκαλείται από την *Leishmania tropica* και εμφανίζεται κυρίως στην Αιθιοπία, στην Κένυα και την Υεμένη [David John et al., 2006].

Αίτιο	Κλινικά σύνδρομα	Δεξαμενές του παρασίτου	Γεωγραφική κατανομή
<i>L. tropica</i>	Ξηρού τύπου αστική δερματική λείσμανιάση (urban dry type) Υποτροπιάζουσα λείσμανιάση ή λείσμανιάση recidivans	Άνθρωπος/σκύλος	Μέση Ανατολή, Ινδία, Πακιστάν, Ιράν, ακτές Μεσογείου
<i>L. major</i>	Υγρού τύπου αγροτική δερματική λείσμανιάση (rural wet type) Σπάνια θληνογονοδερματική λείσμανιάση ¹³	Τρωκτικά	Ινδία, Πακιστάν, Βόρεια Αφρική, Μέση Ανατολή, Κίνα
<i>L. aethiopsica</i>	Διάχυτη ανεργός δερματική λείσμανιάση (diffuse anergic cutaneous leishmaniasis)	Ύραξ (hyrax)	Αιθιοπία, Κένυα, Υεμένη

Πίνακας 3. Αίτια της δερματικής Λείσμανιάσης, κλινικά σύνδρομα, δεξαμενές του παρασίτου και κυριότερη γεωγραφική κατανομή [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004].



Εικόνα 9. Γεωγραφική κατανομή Δερματικής λείσμανιάσης [www.vet.uga.edu/.../leishmania/eng/leish04.htm]

Συμπτωματολογία και Παθογένεση :

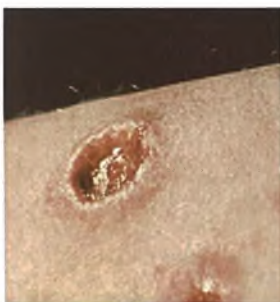
Η περίοδος επώασης μπορεί να είναι μερικοί μήνες ή και 3 χρόνια στη μόλυνση που προκαλείται από τη *Leishmania tropica* και τη *Leishmania aethiopica*. Αντίθετα, όταν κάποιος μολυνθεί από *Leishmania major*, ο χρόνος επώασης διαρκεί περίπου 2 εβδομάδες [David John et al., 2006].

Στα αρχικά στάδια της νόσου παρατηρείται εμφάνιση ερυθράς βλατίδας (εξάνθημα) στα ακάλυπτα μέρη του σώματος, η οποία βαθμιαία εξαπλώνεται. Μέσα σε χρονικό διάστημα μερικών μηνών η βλατίδα αποκτά διάμετρο 1-3 εκατ. Είναι κνησμώδης, ανώδυνη, ξηρά και καταλήγει σε έλκος που καλύπτεται από εφελκίδα (*Leishmania tropica*) [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004].

Μία άλλη μορφή της ασθένειας που φαίνεται να οφείλεται στην *Leishmania tropica* είναι η μη επουλούμενη δερματική λείσμανίαση. Η μορφή αυτή μοιάζει με την αστικού τύπου ξηρή λείσμανίαση αλλά αντί να επουλωθεί, εμφανίζει ερυθρηματώδεις πλάκες και οζίδια. Η αλλοίωση μπορεί να παραμείνει για χρόνια με εναλλαγή περιόδων ύφεσης και ενεργοποίησης [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004].

Η *Leishmania major* προκαλεί υγρού τύπου ανροτική δερματική λείσμανίαση, της οποίας τα συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτά της ξηρής μορφής της νόσου με τη διαφορά ότι η αλλοίωση είναι μεγαλύτερη σε αυτή τη μορφή και παρουσιάζεται αιμορραγική εφελκίδα. [Griffiths / Old world cutaneous leishmaniasis, 1987].

Η *Leishmania aethiopica* προκαλεί διάχυτη ανενεργό δερματική λείσμανίαση. Ο ασθενής στην περίπτωση αυτή, εμφανίζει μεμονωμένες, μη συρρέουσες, οζώδεις, διάσπαρτες αλλοιώσεις σε όλη την επιφάνεια του δέρματος. Η κλινική εικόνα του ασθενή έχει πολύ μεγάλη ομοιότητα με τη λεπρωματώδη λέπρα [Griffiths / Old world cutaneous leishmaniasis, 1987].



Εικόνα 10. Δερματική λείσμανίαση
[Patrick Woster-Chemistry of Antiparasetic Agents]

Θεραπεία

Πάνω από το 90% των περιπτώσεων δερματικής λείσμανίασης **επουλώνονται αυτόματα**, ανεξάρτητα από το είδος του υπεύθυνου παρασίτου. Οι από του στόματος χορηγούμενες **imidazoles** θα μπορούσαν να δοθούν ως μονοθεραπεία για

τις μορφές που ιώνται ταχέως [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004]. Ωστόσο, σε περιπτώσεις οξείας δερματικής λείσμανιάσης, μία απλή και αποτελεσματική μέθοδος που εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια είναι η **κρυοθεραπεία**. Στη μέθοδο αυτή οι περιοχές του δέρματος που φέρουν τις αλλοιώσεις ψύχονται με υγρό άζωτο. Η ψύξη καταστρέφει ταχύτατα τις λείσμανίες, ενώ η βλάβη επουλώνεται σε 3 – 8 εβδομάδες [Μεγάλη Διαδικτυακή Εγκυκλοπαίδεια Υγείας / Dermaline]

ν) ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΚΟΣΜΟΥ (ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΝΟΤΙΑ ΑΜΕΡΙΚΗ):

Η βλεννογονοδερματική λείσμανιάση ξεκινά με αλλοιώσεις του δέρματος, οι οποίες στη συνέχεια διευρύνονται, προκαλώντας μεγάλης έκτασης, παρόμοια με της λέπρας, καταστροφή του ιστού γύρω από το στόμα και τη μύτη [David John et al., 2006].

Προκαλείται από τη *Leishmania braziliensis* και συναντάται κυρίως στη Βραζιλία αλλά και στο Περού, την Παραγουάη, τη Βολιβία, την Κολομβία και τη Βενεζουέλα. Εκτός από τις σκνίπες του γένους *Phlebotomus*, άλλοι φορείς της *L. braziliensis* είναι οι σκνίπες του γένους *Lutzomyia* και *Psychodopygus* [David John et al., 2006].

Η βλεννογονική λείσμανιάση είναι αγροτική νόσος, περισσότερο συχνή σε άνδρες που εργάζονται στα δάση ή σε αγροτικές εγκαταστάσεις. Δεξαμενή του συγκεκριμένου είδους *Leishmania* αποτελούν τα τρωκτικά και άλλα μεγαλύτερα θηλαστικά [Al-Gindan et al., 1983].

Αίτιο	Κλινικά σύνδρομο	Δεξαμενές του παρασίτου	Γεωγραφική κατανομή
<i>L.braziliensis</i>	Βλεννογονοδερματική λείσμανιάση	τρωκτικά/σκύλος	Κεντρική και Νότια Αμερική

Πίνακας 4. Αίτια της βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης, κλινικά σύνδρομο, δεξαμενές του παρασίτου & κυριότερη γεωγραφική κατανομή [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004]



Εικόνα 11. Γεωγραφική κατανομή βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης [www.vet.uga.edu/.../leishmania/eng/leish04.htm]

Συμπτωματολογία και Παθογένεση :

Η βλεννογονική λείσμανίαση προκαλεί ρινική καταρροή, ρινορραγία, φλεγμονή και διάτρηση του ρινικού διαφράγματος. Η συμμετοχή των βλεννογόνων αποτελεί γενικά δευτεροπαθή εκδήλωση της λοίμωξης και ακολουθεί ένα πρωτοπαθές δερματικό έλκος. Προκαλείται από αιματογενή διασπορά του παρασίτου ή διασπορά διαμέσου των λεμφαγγείων. Η προσβολή των βλεννογόνων μπορεί να γίνει μέσα σε λίγες εβδομάδες ή μήνες ενώ το πρωτοπαθές έλκος είναι ακόμα ενεργό, ή μπορεί να επισυμβεί πολλά χρόνια μετά την ίαση [Al-Gindan et al., 1983].



Εικόνα 12. Βλεννογονική λείσμανίαση [Patrick Woster-Chemistry of Antiparasetic Agents]

Θεραπεία

Η **αυτόματη ίαση** της βλεννογονοδερματικής λείσμανίασης είναι σπάνια ενώ η θεραπεία με **ενώσεις του αντιμονίου** παραμένει ακόμα η καλύτερη επιλογή για ασθενείς που πάσχουν από αυτή τη μορφή της νόσου. Επίσης σε σοβαρότερα περιστατικά χορηγούνται **συνθέσεις αμφοτερικίνης Β με λιπίδια** [για ανασκόπηση βλέπε: Τζανέτου, 2004].

1.7 Είδος και κατανομή φορέα

Από τα 800 περίπου υποείδη των φλεβοτόμων (σκνιπών), τα 80 είναι πιθανοί ή αποδεδειγμένοι φορείς της *Leishmania spp.* Αυτοί οι φορείς ανήκουν όλοι στα γένη *Phlebotomus* και *Lutzomyia* [Protozoologia / Protozoa Goldfus, 1918].

Οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* είναι μορφολογικά παρόμοιες με αυτές του γένους *Lutzomyia* ωστόσο διαφέρουν ως προς την εξάπλωσή τους, γεγονός που οφείλεται κυρίως στις περιβαλλοντικές συνθήκες [για ανασκόπηση βλέπε: Ilioroulou et al., 2006]. Έρευνες έχουν δείξει πως διαφορετικά είδη *Phlebotomus* και *Lutzomyia* αναπτύσσονται σε μεταβαλλόμενες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας [για ανασκόπηση βλέπε: Ilioroulou et al, 2006]. Η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις, η υγρασία και η ποιότητα του εδάφους καθώς και το είδος βλάστησης είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που καθορίζουν την κατανομή των σκνιπών στις διάφορες χώρες και ηπείρους [για ανασκόπηση βλέπε: Tselentis et al., 2006].

Οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* συναντώνται στις χώρες του Παλαιού Κόσμου και ευθύνονται για την εξάπλωση της σπλαχνικής και δερματικής και σπανιότερα για την εξάπλωση της βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης [Zeledon RA, 1996].

Έχουν βρεθεί διάφορα είδη *Phlebotomus*, τα οποία κατηγοριοποιούνται ως προς τη γεωγραφική τους κατανομή στις χώρες της Αφρικής, της Ασίας και της Ευρώπης. Ορισμένα από αυτά τα είδη αποτελούν εξακριβωμένους φορείς της λείσμανιάσης ενώ για τα περισσότερα προς το παρόν απλώς πιθανολογείται η σχέση τους με το παράσιτο [Eldridge et al., *Medical Parasitology*]. Τα κυριότερα είδη *Phlebotomus* καθώς και η γεωγραφική τους κατανομή αναφέρονται στον Πίνακα 5:

ΕΙΔΟΣ ΣΚΝΙΠΑΣ	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΚΝΙΠΑΣ
<i>Phlebotomus longipes</i>	Κένυα, Αιθιοπία
<i>Phlebotomus pedifer</i>	Κένυα, Αιθιοπία
<i>Phlebotomus alexandri</i>	Βόρεια Αφρική μέχρι Δυτική Κίνα
<i>Phlebotomus argentipes</i>	Μπαγκλαντές, Νεπάλ, Ινδία
<i>Phlebotomus celiae</i>	Κένυα, Νότια Αιθιοπία
<i>Phlebotomus martini</i>	Ανατολική Αφρική, Αιθιοπία
<i>Phlebotomus mongolensis</i>	Κεντρική Ασία
<i>Phlebotomus orientalis</i>	Σουδάν, Αιθιοπία, Σαουδική Αραβία, Υεμένη
<i>Phlebotomus ariasi</i>	Δυτική Μεσόγειος
<i>Phlebotomus brevis</i>	Βόρειο Ιράν μέχρι Καύκασο
<i>Phlebotomus chinensis</i>	Βόρεια και Κεντρική Κίνα
<i>Phlebotomus halepensis</i>	Ιορδανία, Ιράκ
<i>Phlebotomus kandelakii</i>	Ιράν, Αφγανιστάν
<i>Phlebotomus langeroni</i>	Αίγυπτος, Τυνησία
<i>Phlebotomus longicuspis</i>	Βόρεια Αφρική
<i>Phlebotomus longiductus</i>	Βόρεια Αφρική, Κεντρική Ασία
<i>Phlebotomus neglectus</i>	Ανατολική Μεσόγειος
<i>Phlebotomus balcanicus</i>	Νοτιοανατολική Ευρώπη
<i>Phlebotomus perfilliewi</i>	Παράλια Μεσογείου, Αλγερία
<i>Phlebotomus permiciosus</i>	Δυτική Μεσόγειος
<i>Phlebotomus sichuanensis</i>	Κίνα
<i>Phlebotomus smirnovi</i>	Κεντρική Ασία
<i>Phlebotomus tobbi</i>	Ανατολική Μεσόγειος
<i>Phlebotomus transcausicus</i>	Καύκασος
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Κεντρική Τυνησία, Βόρεια Αφρική, Μέση Ανατολή
<i>Phlebotomus chaubaudi</i>	Κεντρική Τυνησία
<i>Phlebotomus ansarii</i>	Ιράν
<i>Phlebotomus caucasicus</i>	Ιράν
<i>Phlebotomus duboscqi</i>	Κένυα
<i>Phlebotomus guggisbergi</i>	Κένυα
<i>Phlebotomus sergenti</i>	Βόρεια Αφρική, Μέση Ανατολή

Πίνακας 5. Είδη *Phlebotomus* και γεωγραφική κατανομή (Young and Lawyer, 1987; Killick Kendrick, 1990 / 1999; Lane 1993)

Οι σκνίπες του γένους *Lutzomyia* συναντώνται στις χώρες του Νέου Κόσμου και ευθύνονται για την εξάπλωση της σπλαχνικής, δερματικής και της βλεννογονοδερματικής λείσμανιάσης [Zeledon, 1996]. Όπως συμβαίνει και με τα είδη *Phlebotomus*, έτσι και στη *Lutzomyia* ορισμένα είδη αποτελούν εξακριβωμένους φορείς λείσμανιάσης ενώ για τα περισσότερα απλώς πιθανολογείται η σχέση τους με το παράσιτο [Eldridge et al., *Medical Parasitology*]. Τα κυριότερα είδη *Lutzomyia* καθώς και η γεωγραφική τους κατανομή αναφέρονται στον Πίνακα 6:

ΕΙΔΟΣ ΣΚΝΙΠΑΣ	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΚΝΙΠΑΣ
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	Νότια Αμερική
<i>Lutzomyia olmeca nociva</i>	Αμαζόνιος
<i>Lutzomyia amazonensis</i>	Βόρειες περιοχές Αμαζονίου
<i>Lutzomyia ayrozai</i>	Νοτιοανατολική Βραζιλία
<i>Lutzomyia complexa</i>	Βραζιλία
<i>Lutzomyia carrerai</i>	Δυτική κοιλάδα Αμαζονίου
<i>Lutzomyia intermedia</i>	Βόρεια Βραζιλία
<i>Lutzomyia migonei</i>	Βραζιλία, Βενεζουέλα
<i>Lutzomyia ovallesi</i>	Γουατεμάλα, Βενεζουέλα
<i>Lutzomyia panamensis</i>	Κεντρική, Νότια Αμερική
<i>Lutzomyia pessoai</i>	Νότια Βραζιλία
<i>Lutzomyia spinicrassa</i>	Κολομβία
<i>Lutzomyia trinidadensis</i>	Βενεζουέλα
<i>Lutzomyia wellcomei</i>	Βραζιλία
<i>Lutzomyia whitmani</i>	Ανατολική Βραζιλία
<i>Lutzomyia evansi</i>	Κολομβία
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Κεντρική και Νότια Αμερική
<i>Lutzomyia hartmanni</i>	Κολομβία
<i>Lutzomyia gomezi</i>	Παναμάς
<i>Lutzomyia youngi</i>	Βενεζουέλα
<i>Lutzomyia anduzei</i>	Νότια Αμερική
<i>Lutzomyia umbratillus</i>	Αμαζόνιος
<i>Lutzomyia ubiquitallis</i>	Αμαζόνιος
<i>Lutzomyia anthophora</i>	Τέξας
<i>Lutzomyia diabolica</i>	Τέξας
<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Κεντρική Αμερική
<i>Lutzomyia ylephiletor</i>	Γουατεμάλα
<i>Lutzomyia peruensis</i>	Βόρειες Άνδεις
<i>Lutzomyia trapidol</i>	Κεντρική Αμερική
<i>Lutzomyia verrucarum</i>	Βόρειες Άνδεις

Πίνακας 6. Είδη *Lutzomyia* και γεωγραφική κατανομή (Young and Lawyer, 1987; Killic and Kendrick 1990 / 1999; Lane, 1993)

1.8 Σύνδεση εξάπλωσης παρασίτου με την κατανομή του φορέα

Μελέτες των τελευταίων χρόνων δείχνουν πως η λείσμανιάση είναι ενδημική σε 88 χώρες (66 του Παλαιού Κόσμου και 22 του Νέου Κόσμου) και πλήττει κυρίως φτωχές

κοινότητες σε απομονωμένες περιοχές, συχνά με τη μορφή επιδημιών [Giamarellou, 2000].

Πολλά είδη σκνίπας είναι φορείς συγκεκριμένων ειδών της *Leishmania* αλλά δεν είναι ικανές για τη μετάδοση άλλων ειδών. Σε αυτή την περίπτωση, η *Leishmania* πολλαπλασιάζεται στο έντερο της θηλυκής σκνίπας κατά τη διάρκεια της πέψης του γεύματος αίματος αλλά χάνεται κατά την αφόδευση. Θεωρείται ότι η προσκόλληση στο μεσέντερο της σκνίπας προκαλείται από μια λιποφωσφογλυκάνη, που διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών της *Leishmania* και οι φορείς πρέπει να φέρουν αρκετά σημεία προσκόλλησης στα κύτταρα του μεσέντερου ώστε να υποστηριχθεί η προσκόλληση του παράσιτου [Protozoologia/ Protozoa Goldfus, 1918].

Τα κυριότερα είδη *Leishmania*, οι σκνίπες-φορείς τους και η γεωγραφική κατανομή των σκνιπιών που φέρουν τα συγκεκριμένα είδη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 7:

ΕΙΔΟΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	ΕΙΔΟΣ ΦΟΡΕΑ	ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ & ΦΟΡΕΑ
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Phlebotomus alexandri</i>	Βόρεια Αφρική μέχρι Δυτική Κίνα
	<i>Phlebotomus argentipes</i>	Μπαγκλαντές, Νεπάλ, Ινδία
	<i>Phlebotomus celiae</i>	Κένυα, Νότια Αιθιοπία
	<i>Phlebotomus martini</i>	Ανατολική Αφρική, Αιθιοπία
	<i>Phlebotomus mongolensis</i>	Κεντρική Ασία
	<i>Phlebotomus orientalis</i>	Σουδάν, Αιθιοπία, Σαουδική Αραβία, Υεμένη
<i>Leishmania infantum</i>	<i>Phlebotomus ariasi</i>	Δυτική Μεσόγειος
	<i>Phlebotomus perfilliewi</i>	Παράλια Μεσογείου, Αλγερία
	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Δυτική Μεσόγειος
	<i>Phlebotomus balcanicus</i>	Νοτιοανατολική Ευρώπη
	<i>Phlebotomus neglectus</i>	Ανατολική Μεσόγειος
	<i>Phlebotomus sichuanensis</i>	Κίνα
	<i>Phlebotomus smirnovi</i>	Κεντρική Ασία
<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Lutzomyia evansi</i>	Κολομβία
	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Κεντρική & Νότια Αμερική
<i>Leishmania tropica</i>	<i>Phlebotomus guggisbergi</i>	Κένυα
	<i>Phlebotomus sergenti</i>	Μέση Ανατολή, Βόρεια Αφρική
<i>Leishmania major</i>	<i>Phlebotomus duboscqi</i>	Αφρική, Κένυα
	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Βόρεια Αφρική, Μέση Ανατολή
<i>Leishmania aethiopica</i>	<i>Phlebotomus longipes</i>	Κένυα, Αιθιοπία
	<i>Phlebotomus pedifer</i>	Κένυα, Αιθιοπία
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Lutzomyia carrerai</i>	Δυτική κοιλάδα Αμαζονίου
	<i>Lutzomyia ovallesi</i>	Γουατεμάλα, Βενεζουέλα
	<i>Lutzomyia wellcomei</i>	Βραζιλία
	<i>Lutzomyia whitmani</i>	Ανατολική Βραζιλία

Πίνακας 7. Είδη *Leishmania*, φορείς και γεωγραφική κατανομή φορέων (Young and Lawyer, 1987; Killick-Kendrick, 1990 / 1999; Lane, 1993)

1.9 Τύποι *Leishmania* στην Ελλάδα και φορείς μετάδοσης

Η μεσογειακή μορφή της λείσμανίασης απαντάται κυρίως στον άνθρωπο, το σκύλο, το λύκο, την αλεπού, το τσακάλι, τη γάτα, τον επίμου και τις νυχτερίδες και οφείλεται στη *Leishmania infantum* η οποία μεταδίδεται από σκνίπες *Phlebotomus spp* [για ανασκόπηση βλέπε: Χαραλαμπίδης, 1998].

Στις μεσογειακές χώρες και ανάλογα με τη γεωγραφική εξάπλωση του φορέα, η σπλαχνική λείσμανίαση (*L. infantum*) εμφανίζεται ως ανθρωπονόσος (άνθρωπος-σκνίπα-άνθρωπος) και ως ζωοανθρωπονόσος (ζώο-σκνίπα-άνθρωπος), ενώ η δερματική λείσμανίαση εμφανίζεται ως ανθρωπονόσος (άνθρωπος-σκνίπα-άνθρωπος), όταν οφείλεται στη *Leishmania tropica* και ως ζωοανθρωπονόσος (τρωκτικά-σκνίπα-άνθρωπος), όταν οφείλεται στη *Leishmania major* [για ανασκόπηση βλέπε: Χαραλαμπίδης, 1993].

Στην Ελλάδα, οι σκνίπες εμφανίζονται το Μάιο έως το Νοέμβριο και πετούν μετά τη δύση του ήλιου, συνήθως τις ώρες 21.00-05.00 ή ολόκληρο το 24ωρο σε σπηλιές. Επιβιώνουν 14-45 ημέρες και απομυζούν αίμα για πρώτη φορά τις πρώτες 24-48 ώρες της ζωής τους και μετά, κάθε 3-5 ημέρες. Γεννούν ομάδες αυγών (40-70 αυγά / ομάδα) σε σκοτεινά μέρη, σε σωρούς χόρτων, φωλιές ζώων, πέτρινους τοίχους, ρωγμές εδάφους κ.ά., 3-4 ημέρες μετά την απομύζηση αίματος. Από τα αυγά, εκκολάπτονται προνύμφες που μετατρέπονται σε νύμφες και σε σκνίπες, σε 28-82 ημέρες [για ανασκόπηση βλέπε: Χαραλαμπίδης, 1993].

Η πρώτη περίπτωση ασθενή με σπλαχνική λείσμανίαση στην Ελλάδα, αναφέρθηκε στην Κρήτη το 1907 και η πρώτη περίπτωση ασθενή με δερματική λείσμανίαση, αναφέρθηκε επίσης στην Κρήτη το 1909 [για ανασκόπηση βλέπε: Kansouzidou et al., 2006]. Τις τελευταίες δεκαετίες, στις μεσογειακές χώρες βρέθηκαν 19 είδη σκνιπών και στην Ελλάδα 10 είδη σκνιπών του γένους *Phlebotomus* (*Phlebotomus neglectus*, *P. perfilliewi*, *P. tobbi*, *P. balcanicus*, *P. simici*, *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. similis*, *P. alexandri*, *P. mascittii*), για τα οποία είναι γνωστό ότι:

Ο ***P. neglectus*** επιτίθεται στον άνθρωπο, τα βοοειδή, τον ίππο, το χοίρο κ.ά., όχι όμως στο σκύλο και είναι μεταδότης της *L. infantum* (μόνο στο είδος αυτό σκνίπας έχει βρεθεί η προμαστιγωτή μορφή της *L. infantum* στη χώρα μας).

Ο ***P. perfilliewi*** επιτίθεται σε σκύλο, ίππο, βοοειδή, χοίρο, πρόβατο, κόνικλο, λαγό κ.ά. και είναι πιθανός μεταδότης της *L. infantum* στην Ελλάδα.

Ο ***P. tobbi*** επιτίθεται σε πρόβατο, κόνικλο, σκύλο κ.ά. (δεν βρέθηκε *Leishmania spp.* στο είδος αυτό σκνίπας).

Ο ***P. balcanicus*** επιτίθεται στη νυχτερίδα και τον άνθρωπο και θεωρείται πιθανός μεταδότης της *L. infantum* σε Θράκη, Μακεδονία και Θεσσαλία.

Ο ***P. simici*** (μοιάζει με τον *P. balcanicus*), επιτίθεται σε κόνικλο, νυχτερίδα και άνθρωπο και θεωρείται πιθανός μεταδότης της *L. infantum* σε Αττική, Θράκη, Μακεδονία και Θεσσαλία, παρά το γεγονός ότι υπό πειραματικές συνθήκες δεν επιτίθεται στον άνθρωπο ή σε κάποιο είδος ζώου.

Ο *P. papatasi* εμφανίζει ανθρωποφιλία και είναι μεταδότης της *L. major* (στην Ελλάδα είναι είδος υπό εξαφάνιση, ενώ στη Μακεδονία και τη Θράκη σχεδόν έχει εξαφανισθεί).

Ο *P. sergenti* επιτίθεται στον άνθρωπο και σπανίως σε ζώα (κόνικλος, νυχτερίδα κ.ά.). Είναι μεταδότης της *L. tropica* στην Ελλάδα και πιθανός μεταδότης της *L. infantum*.

Ο *P. similis* (μοιάζει με τον *P. sergenti*), επιτίθεται στη νυχτερίδα και ευκαιριακά, σε σπηλιές στον άνθρωπο. Θεωρείται πιθανός μεταδότης της *L. tropica* στη Β. Ελλάδα, παρά το γεγονός ότι στη Μακεδονία και τη Θράκη δεν αναφέρθηκαν κρούσματα δερματικής λείσμανιάσης.

Ο *P. alexandri* επιτίθεται στον άνθρωπο και υπό πειραματικές συνθήκες στον επίμου και το χάμστερ.

Ο *P. mascittii* βρέθηκε μόνο στην Κρήτη και τη Ρόδο.

[για ανασκόπηση βλέπε: Χαραλαμπίδης -Παρασιτικά νοσήματα των ζώων και του ανθρώπου / Θέματα παρασιτολογίας που ενδιαφέρουν τη δημόσια υγεία στην Ελλάδα, 1993].

Ως προς τον φορέα, στη χώρα μας το νόσημα εμφανίζεται ως ανθρωπονόσος (άνθρωπος-σκνίπα-άνθρωπος) με πιθανότερο μεταδότη τον *P. neglectus* και ως ζωνόσος (σκύλος-σκνίπα-σκύλος) με πιθανότερο μεταδότη τον *P. perfilliewi*, τουλάχιστον σε περιοχές της χώρας, με υψόμετρο έως 200 μέτρα (π.χ. στο Ν. Χαλκιδικής και γύρω από την πόλη της Θεσσαλονίκης, όπου δεν απαντάται ο *P. neglectus*). Η ύπαρξη δύο, ανεξάρτητων μεταξύ τους, κύκλων εξέλιξης του παρασίτου στην Ελλάδα, φαίνεται από το γεγονός ότι: α) σε πολλές περιοχές, όπως π.χ. στους νομούς Χαλκιδικής, Αγίου Όρους, Γρεβενών, Κοζάνης κ.α., δεν αναφέρονται κρούσματα σπλαχνικής λείσμανιάσης στον άνθρωπο, παρά την ύπαρξη στις περιοχές αυτές μολυσμένων σκύλων και *P. neglectus*. Επίσης, στο Ν. Χαλκιδικής, όπου ο *P. neglectus* είναι σπάνιο είδος σκνίπας και γύρω από την πόλη της Θεσσαλονίκης, όπου ο *P. neglectus* δεν απαντάται, αναφέρθηκαν στον άνθρωπο συνολικά 9 κρούσματα σπλαχνικής λείσμανιάσης τα τελευταία 46 έτη, παρά την υψηλή μόλυνση του σκύλου που είναι 6.6% στο Ν. Χαλκιδικής και 6.4% γύρω από τη Θεσσαλονίκη, β) ο *P. neglectus* θεωρείται ως ο πιθανότερος μεταδότης της *L. infantum* στον άνθρωπο, παρά το γεγονός ότι δεν επιλέγει συχνά τον άνθρωπο για την απομύζηση αίματος, γ) η συμμετοχή του σκύλου στη μόλυνση του ανθρώπου αμφισβητείται και από την αναφορά συχνών κρουσμάτων σπλαχνικής λείσμανιάσης στον άνθρωπο σε περιοχές, όπως π.χ. στην Καλλιθέα του Ν. Δράμας, όπου ο αριθμός των σκύλων είναι πολύ μικρός και ο *P. neglectus* αποτελεί το 95% των σκνιπών, και δ) τα κρούσματα λείσμανιάσης στον άνθρωπο στη χώρα μας, ανέρχονται κατά μέσο όρο σε 25 ετησίως, ενώ στο σκύλο ξεπερνούν τις 100.000 (αναλογία κρουσμάτων σε άνθρωπο / σκύλο, 1:4.000)

[για ανασκόπηση βλέπε: Χαραλαμπίδης -Παρασιτικά νοσήματα των ζώων και του ανθρώπου / Θέματα παρασιτολογίας που ενδιαφέρουν τη δημόσια υγεία στην Ελλάδα, 1993].

1.10 Εργαστηριακή διάγνωση της ασθένειας

Διάφορα είναι τα δείγματα βιολογικών υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εργαστηριακή διάγνωση της νόσου [Alvar et al., 1997] :

- Τεμάχιο βιοψίας δέρματος για μικροσκοπική εξέταση και καλλιέργεια.
- Τεμάχιο βιοψίας από σπλήνα, ήπαρ ή λεμφαδένα για μικροσκοπική ανάλυση και καλλιέργεια. Ο σπλήνας θεωρείται το πιο κατάλληλο όργανο για την αναζήτηση του παρασίτου αλλά εγκυμονεί κινδύνους (πχ αιμορραγία).
- Μυελός των οστών για μικροσκοπική εξέταση, καλλιέργεια και μοριακές μεθόδους. Η βιοψία του μυελού των οστών προτιμάται ,έναντι της βιοψίας ήπατος, σπληνός ή λεμφαδένων, διότι είναι απλούστερη και με λιγότερους κινδύνους.
- Δείγμα αίματος για μικροσκοπική εξέταση, καλλιέργεια και μοριακές μεθόδους.
- Ούρα για την ανίχνευση του αντιγόνων του παρασίτου.

Η εξέταση παρασκευασμάτων από ιστούς (μυελός των οστών, δείγμα βιοψίας από σπλήνα ή ήπαρ, υλικό από λεμφαδένες) βαμμένων με Giemsa παραμένει η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την αναζήτηση του παρασίτου, των αμαστιγιωτών μορφών που είναι η τυπική μορφή με την οποία βρίσκεται στους ιστούς [για ανασκόπηση βλέπε: Herwaldt, 1999]

Με τη χρώση Giemsa, το κυτταρόπλασμα του παρασίτου χρωματίζεται απάλο μπλε, ενώ ο πυρήνας και ο κινητοπλάστης παίρνουν κόκκινο ή ιώδες χρώμα. Η ευαισθησία ανεύρεσης του παρασίτου σε δείγματα βιοψίας σπληνός, φτάνει το 98%, στο μυελό των οστών κυμαίνεται από 78-94%, ενώ των άλλων οργάνων είναι <90% [για ανασκόπηση βλέπε: Kansouzidou et al., 2006].

Η καλλιέργεια του παρασίτου σε ειδικό θρεπτικό υλικό (Novy- Nicoll-Mc Neal) είναι συμπληρωματική των άμεσων μεθόδων και ακόμη χρησιμεύει στον έλεγχο αντιλειτουργικών φαρμάκων, είναι όμως αρκετά χρονοβόρα (3-4 εβδομάδες) ακριβή και απαιτητική διαδικασία [για ανασκόπηση βλέπε: Roumelioti et al., 2007]. Η ευαισθησία απομόνωσης του παρασίτου από καλλιέργεια μυελού των οστών κυμαίνεται από 40-95% [Alvar et al., 2007] ενώ από το σπλήνα φτάνει το 98% [Guerin et al., 2002].

Αντίθετα η καλλιέργεια δειγμάτων βιοψίας δέρματος χαρακτηρίζεται από ευαισθησία 78-94% [Alvar et al., 2007].

Από τις μοριακές μεθόδους, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) εκτός από την διάγνωση της νόσου, είναι χρήσιμη για τον έλεγχο της πλήρους εξουδετέρωσης του παρασίτου μετά από θεραπεία καθώς και για την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών και στελεχών του παρασίτου [για ανασκόπηση βλέπε: Roumelioti et al., 2007]. Για την PCR χρησιμοποιούνται δείγματα ολικού αίματος ή ορού, αλλά και υλικό ιστών (μυελός των οστών, υλικό από λεμφαδένες, δείγμα δερματικής βλάβης) με στόχο συνήθως το DNA του κινητοπλάστη του παρασίτου [Marfurt et al., 2003; Osman et al., 1997; Cortes et al., 2004].

Η ανίχνευση των αντιγόνων γίνεται και με το **KATEX** (Kalon Biological UK) που κυκλοφορεί σε εμπορική συσκευασία Latex και ανιχνεύει μη πρωτεϊνικά αντιγόνα στα

ούρα. Η ανίχνευση αντιγόνων είναι πιο ειδική μέθοδος από την ανίχνευση των αντισωμάτων.

Η διάγνωση της νόσου μπορεί να στηριχθεί επίσης στην ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων με ανοσοδιαγνωστικές μεθόδους, η ευαισθησία και η ειδικότητα των οποίων εξαρτάται από το κλινικό σύνδρομο και τη μέθοδο. Σοβαρό μειονέκτημα είναι ότι με την ανίχνευση των αντισωμάτων δε μπορεί να γίνει διαχωρισμός της παλαιάς από την πρόσφατη λοίμωξη, ιδιαίτερα σε ενδημικές περιοχές. Επίσης η ανίχνευση των αντισωμάτων μπορεί να αποδειχθεί πολύ χρήσιμη για τη διάγνωση της σπλαχνικής μορφής, αλλά στη δερματική μορφή δε βοηθά ιδιαίτερα διότι οι περισσότεροι ασθενείς δεν αναπτύσσουν αντισώματα [CDC, Division of Parasitic Diseases (DPDx)]. Οι ειδικές IgG ανοσοσφαιρίνες ανιχνεύονται σε όλες τις φάσεις της μόλυνσης, οι IgM μετά την πρωτομόλυνση ή τις αναμολύνσεις, ενώ οι ειδικές IgE συνήθως μόνο στις αναμολύνσεις. Ο έλεγχος του τίτλου των αντισωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου (υποτροπή) [για ανασκόπηση βλέπε: Roumelioti et al., 2007].

Για τον προσδιορισμό των κυκλοφορούντων αντισωμάτων χρησιμοποιείται ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA), η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA), η ανοσοχρωματογραφία (ICT) και η άμεση συγκολλητινοαντίδραση (DAT) [Arya, 2002; Ryan, Smithyman et al., 2002]. Από αυτές τις ορολογικές μεθόδους, η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη είναι η ανοσοενζυμική (ELISA), που ανιχνεύει αντισώματα έναντι του ανασυνδυασμένου rK39 αντιγόνου, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας της έναντι των υπόλοιπων μεθόδων. Η DAT παρά την αρκετά υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά της, δε διαχωρίζει παλιά από πρόσφατη λοίμωξη και ακόμη είναι χρονοβόρα διαδικασία (18-24h). Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA) παρουσιάζει ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα ωστόσο μειονεκτεί στο ότι παρουσιάζει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα παράσιτα του αίματος. Η ανοσοχρωματογραφία χρησιμοποιείται ως προκαταρκτική μέθοδος για τη διάγνωση της νόσου. Ανιχνεύει αντισώματα έναντι του rK39 αντιγόνου με μεγάλη ειδικότητα, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις σπλαχνικής λείσμανίασης ενώ η ευαισθησία διαφέρει κατά περιοχή (στη Μεσόγειο E=71%). Είναι γρήγορη, φθηνή και απλή μέθοδος γι' αυτό και χρησιμοποιείται ευρέως [Καλλέργη - Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων από Λείσμανια].

Μειονέκτημα όλων των Ορολογικών Μεθόδων αποτελούν οι εξής παράγοντες :

- 1) Δεν διαχωρίζουν παλιά και πρόσφατη λοίμωξη
- 2) Παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία σε ασθενείς με HIV
- 3) Δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε υγιή άτομα που ζουν σε ενδημικές περιοχές [Καλλέργη - Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων από Λείσμανια].

Μεθοδος	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Ανίχνευση αντισώματος		
IFA	55-70	70-89
DAT	90-100	72-95
rK39-ELISA	100	100
rK39-ICT	100	93-97
Ανίχνευση Ag		
KATEX	68-100	100
Μοριακές (PCR)	90-100	100

Πίνακας 8. Σύγκριση διαγνωστικών μεθόδων ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητα [Καλλέργη - Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων από Λεισμάνια].

1.11 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάλυση, με τη χρήση μοριακών κυρίως τεχνικών, των διαφόρων απλοτύπων του παρασίτου *Leishmania* που ευθύνεται για τη μετάδοση της ασθένειας στον άνθρωπο. Το ενδιαφέρον μας αυτό προέρχεται από το γεγονός ότι, η διαφορά στα ποσοστά εξάπλωσης της ασθένειας στον άνθρωπο και στο σκύλο ^{είναι κενά} (αναλογία ετησίων κρουσμάτων σε άνθρωπο / σκύλο στην Ελλάδα, 1:4.000) και, κατά συνέπεια, γενάται το ερώτημα το κατά πόσο η διαφορά αυτή θα μπορούσε να αποδωθεί σε διαφορετικά υποείδη του παρασίτου. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 Ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό ασθενών

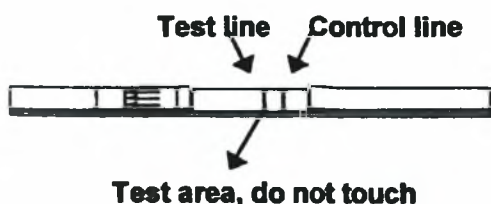
Παρά την ευρεία εφαρμογή τους, εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης της λείσμανιάσης που ανιχνεύουν αντισώματα (όπως η άμεση συγκολλητινοαντίδραση DAT και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός) χρησιμοποιούν ολόκληρο το παράσιτο για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας, με συνέπεια πολλές φορές να δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα όταν οι ασθενείς έχουν μολυνθεί από μυκοβακτήριο ή τρυπανόσωμα. Επιπλέον, η προετοιμασία ολόκληρου του παρασίτου είναι ασταθής και ποικίλει σε ποιότητα.

Το Leishmania Strip Quick Test της Cypress Diagnostics είναι μία ποιοτική ανοσο-ανάλυση, βασισμένη σε μεμβράνη και χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων στον ορό ασθενών, που παράγονται έναντι ενός ανασυνδυασμένου αντιγόνου (K39), ειδικού για την σπλαχνική λείσμανιάση που προκαλείται από μέλη λείσμανιάς που ανήκουν στο σύμπλεγμα της *L. donovani*. Τα αποτελέσματα του τεστ δεν διασταυρώνονται με άλλες παρασιτικές ασθένειες όπως π.χ η μαλάρια.

Η μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης που χρησιμοποιείται στο Leishmania Strip Test, έχει επιχρισθεί με ένα νέο ανασυνδυασμένο αντιγόνο (K39) στην περιοχή test line και με την anti-protein A κοτόπουλου στην control line περιοχή.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας τα δείγματα των ασθενών αντιδρούν με μία χρωστική σύζευξης (protein A-colloidal gold conjugate) που βρίσκεται στο Vial Buffer Solution το οποίο περιέχεται στο kit του τεστ. Στη συνέχεια, το μίγμα μετακινείται προς τα πάνω στη μεμβράνη χρωματογραφικά μέσω τριχοειδών, και αντιδρά με το ανασυνδυασμένο αντιγόνο δημιουργώντας μία κόκκινη γραμμή.

Η παρουσία της κόκκινης γραμμής υποδηλώνει θετικό αποτέλεσμα, ενώ η απουσία της υποδηλώνει αρνητικό αποτέλεσμα. Ανεξάρτητα από την παρουσία αντισωμάτων έναντι της σπλαχνικής λείσμανιάσης, καθώς το μίγμα εξακολουθεί να μετακινείται κατά μήκος της μεμβράνης προς την περιοχή της ακινητοποιημένης anti-protein A του κοτόπουλου, μία κόκκινη γραμμή εμφανίζεται πάντα στην περιοχή control line. Αυτό συμβαίνει γιατί η χρωστική σύζευξης (protein A-colloidal gold conjugate) αντιδρά με την anti-protein A και έτσι η παρουσία αυτής της κόκκινης γραμμής είναι ένδειξη ότι έχει γίνει σωστά το τεστ.



Η δοκιμασία αυτή υποδηλώνει μόνο την παρουσία αντισωμάτων έναντι του ανασυνδιασμένου αντιγόνου (K39) στον ορό ασθενών και δεν θα πρέπει να λαμβάνεται σαν ολικό κριτήριο για την διάγνωση λείσμανίασης.

Ασθενείς που πάσχουν από HIV ή άλλη ασθένεια του ανοσοποιητικού συχνά έχουν χαμηλή ή μη ανιχνεύσιμη ποσότητα αντισωμάτων έναντι της λείσμανια και για τον λόγο αυτό το τεστ μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Μέθοδος

1. Τα δείγματα των ασθενών και οι ειδικές ταινίες του τεστ, βγαίνουν από το ψυγείο και αφήνονται μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.
2. Οι ταινίες του τεστ αφαιρούνται από την ειδική σακούλα προστασίας στην οποία περιέχονται.
3. Προστίθενται 20 μl δείγματος σε μία από τις ταινίες του τεστ, στην περιοχή που βρίσκεται κάτω από τα βέλη.
4. Η ταινία τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα με τέτοιο τρόπο ώστε τα βέλη να δείχνουν προς τα κάτω.
5. Προστίθενται 2-3 σταγόνες Vial Buffer Solution μέσα στον δοκιμαστικό σωλήνα.
6. Περιμένουμε 10 λεπτά προτού διαβάσουμε τα αποτελέσματα. Είναι σημαντικό το υπόβαθρο της ταινίας να είναι καθαρό προτού διαβαστούν τα αποτελέσματα, ειδικότερα όταν τα δείγματα έχουν χαμηλό αριθμό αντισωμάτων έναντι της λείσμανια και εμφανίζεται μία ασθενής μπάντα στην περιοχή test line.

2.2 Εκχύλιση DNA από αίμα ασθενών

Το DNA αποτελεί την απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της Μοριακής Βιολογίας. Η απομόνωσή του σε καθαρή μορφή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για κάθε παραπέρα διαδικασία. Για κάθε διαφορετικό τύπο DNA (χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό κτλ.) υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης που όμως, έχουν κοινά στοιχεία:

- Ελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων.
- Διαχωρισμός του DNA από άλλα μακρομόρια.

Σε ορισμένες μοριακές διεργασίες, όπως οι αντιδράσεις αλληλούχισης, το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι πλήρως καθαρό γι' αυτό και προτιμάται η εκχύλισή του με τη χρήση αυτόματων συσκευών απομόνωσης DNA, χωρίς να απαιτείται εργαστηριακή εργασία. Ένας ακόμη πολύ σημαντικός λόγος που προτιμάται η αυτοματοποιημένη απομόνωση του DNA, είναι η απαραίτητη προστασία και διατήρηση της τριτοταγούς δομής του DNA, η οποία μπορεί εύκολα να μεταβληθεί αν δεν τηρηθούν σωστά ορισμένες εργαστηριακές συνθήκες όπως το pH, η θερμοκρασία και η ιονική ισχύς [*Microbial Life Educational Resources*].

Το MagaZorb DNA Common Kit-200N της Magration, αποτελεί μία απλή, γρήγορη και πολύ αποτελεσματική μέθοδο απομόνωσης DNA υψηλής ποιότητας από ολικό αίμα ασθενών, η οποία απαιτεί ποσότητα δείγματος ίση με 200μl.

Όλα τα αντιδραστήρια του MagaZorb DNA Common Kit-200N προϋπάρχουν μέσα σε ένα φουσίγγιο και δεν απαιτείται προσθήκη οργανικού διαλύτη. Αυτή η αυτόματοποιημένη μέθοδος, εξαλείφει την ανάγκη φυγοκέντρησης, διήθησης σε κενό, ή διαχωρισμό με ειδικές στήλες και επιπρόσθετα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο επιμολύνσεων και βελτιώνει την αναπαραγωγικότητα. Το καθαρισμένο DNA στη συνέχεια είναι έτοιμο για περαιτέρω εφαρμογές.

Η διαδικασία εκχύλισης του DNA γίνεται σε ειδική συσκευή η οποία λέγεται Magration System 6GC/12GC. Η μέθοδος στηρίζεται στον αυτόματο μαγνητικό διαχωρισμό του DNA από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος.

Μέθοδος

1. 200 μl δείγματος ολικού αίματος από ασθενείς τοποθετούνται σε ειδικό erpendorf και στη συνέχεια στη συσκευή Magration System 6GC /12GC.
2. Το ειδικό kit τοποθετείται επίσης στη συσκευή και το πρόγραμμα εκχύλισης τίθεται σε λειτουργία.
3. Αρχικά τα κύτταρα κυτταρολύονται με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διάσπασης (lysis buffer) στο δείγμα και στη συνέχεια μαγνητικά σωματίδια προστίθενται στο δείγμα με αποτέλεσμα την απορρόφηση του DNA πάνω στα σωματίδια.
4. Στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (binding buffer) στο δείγμα το οποίο χρειάζεται για τη δέσμευση του DNA (το οποίο είναι πλέον συνδεδεμένο με τα μαγνητικά σωματίδια) σε ειδικό tip που περιέχεται στη συσκευή.
5. Ακολουθεί πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και επόμενη πλύση με δεύτερο διάλυμα πλύσης ώστε να απομακρυνθούν όσα συστατικά του δείγματος δε χρειάζονται και να καθαρίσει πλήρως το DNA. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, το kit περιέχει πρωτεϊνάση K.
6. Στη συνέχεια με μαγνητικό διαχωρισμό, απομακρύνονται τα μαγνητικά σφαιρίδια από το DNA και ολοκληρώνεται η αυτόματη διαδικασία εκχύλισης.

2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση Της Πολυμεράσης πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρίας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών [για ανασκόπηση βλέπε: Markoulatos *et al.*, 1996]. Πρόκειται για μία ενζυμική μέθοδο αντιγραφής DNA ανεξαρτήτου προελεύσεως, *in vitro*. Μ' αυτή τη

μέθοδο λίγα αρχικά μόρια DNA (DNA-στόχος) οδηγούν τελικά στο σχηματισμό τεράστιου αριθμού αντιγράφων [G. Neonakis et al., 2003]. Η PCR αποτελεί πρωτεύον εργαλείο στη μοριακή διάγνωση παρασιτικών νοσημάτων αλλά επιπλέον είναι πολύ χρήσιμη και για τον έλεγχο της πλήρους εξουδετέρωσης του παρασίτου μετά από θεραπεία καθώς και για την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών και στελεχών του παρασίτου [για ανασκόπηση βλέπε: Roumelioti et al., 2007].

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60 [για ανασκόπηση βλέπε: Markoulatos et al., 1996].

Το DNA-στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην PCR. Ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων) με δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA-στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς το ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση [Saiki et al., 1988].

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA-στόχου κατά την οποία οι συμπληρωματικές αλυσίδες ενός δίκλωνου DNA (dsDNA) διαχωρίζονται η μια από την άλλη (ssDNA). Εν συνεχεία συνδέονται (υβριδίζονται) τα 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία λέγονται εκκινητές (primers) στις 2 πλευρές του DNA-στόχου στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2^ο στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε primer και η αλυσίδα επεκτείνεται (3^ο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται 2 καινούριες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των 2 κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητών με τη σύνθεση καινούριου κλώνου (extention), αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR [Saiki et al., 1988; Rychlik et a., 1990].

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων για το οποίο απαιτούνται : DNA στόχος, primers, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, MgCl₂ και κατάλληλο, για τη δράση του ενζύμου, ρυθμιστικό διάλυμα. Τα dNTPs χρειάζονται για να δημιουργηθεί ο νέος συμπληρωματικός κλώνος, η Taq πολυμεράση συνθέτει μία μονόκλωνη αλυσίδα DNA συμπληρωματική με τη μήτρα και είναι θερμοάντοχο ένζυμο, τα ιόντα Mg²⁺ είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου καθώς το ιόντα Mg²⁺ δρουν ως συμπαραγόντες [Saiki RK et al., 1988].

Στο τέλος του 1^{ου} κύκλου, οι κλώνοι του DNA στόχου είναι 4, στο τέλος του 2^{ου} κύκλου 8 και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων, αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του DNA στόχου, καθώς οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στην μη ανίχνευση του DNA στόχου.

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα στάδια

μετουσίωσης, υβριδισμού και επέκτασης [για ανασκόπηση βλέπε: Markoulatos et al., 1996]:

Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 92-95° C για 30 περίπου sec.

Ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A / T, G / C συνήθως σε θερμοκρασία 50-65° C επί 1-2 min και τέλος η επέκταση των εκκινητών σε θερμοκρασία 70-78° C επί 1-2 min.

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερόμενων θερμοκρασιών, σε λιγότερο από 1 min για αυξομείωση θερμοκρασίας 40° C.

Η αλληλουχία βάσεων του DNA στόχου είναι δυνατόν να είναι άγνωστη, θα πρέπει όμως η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του DNA στόχου να είναι γνωστή ώστε να κατασκευασθούν τα συνθετικά εκκινητικά μόρια (primers). Οι primers θα πρέπει να έχουν παραπλήσιο αριθμό G / C , να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή το 5' άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός του νέου κλώνου DNA. Επίσης οι primers θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιατάξεως ή τήξεως (Tm, melting temperature). [Persing, 1991; Erlich, 1991; Kordossi, 1993].

Η ειδικότητα της PCR εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο, η οποία εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία υβριδισμού (Ta). Όσο πιο κοντά είναι η Ta προς την Tm, τόσο πιο πολύ η ειδικότητα αυξάνει [Rychlik et al., 1990].

Μέθοδος

Για μία αντίδραση PCR για *Leishmania* ,τελικού όγκου 50 μl, το πρωτόκολλο αναγράφεται στον πίνακα:

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Buffer	10x	1x
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,8 mM
primer 1	50 μM	0,5 μM
primer 2	50 μM	0,5 μM
Taq polymerase	5 u /μl	1u /μl

Αφού υπολογιστούν οι ποσότητες που απαιτούνται από κάθε αντιδραστήριο, το mix (περιέχει όλα τα αντιδραστήρια του πίνακα) συμπληρώνεται με H₂O μέχρι ο όγκος να φτάσει στα 45 μl. Σε κάθε tube εισάγονται τα 45 μl από το mix και 5 μl DNA ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μl.

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα (gel) αναρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αναρόζης είναι μια μέθοδος που χωρίζει τα μακρομόρια, όπως νουκλεϊνικά οξέα ή πρωτεΐνες, βάσει του μεγέθους τους και του ηλεκτρικού τους φορτίου.

Ο όρος ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη μετακίνηση του υπό μελέτη μορίου στο πήκτωμα αναρόζης κάτω από την επιρροή ηλεκτρικού πεδίου. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης υπάρχουν ενεργοποιημένα ηλεκτρόδια που παρέχουν την κατευθυντήρια δύναμη, επομένως οι ιδιότητες ενός μορίου (όπως το μοριακό του βάρος, η μορφή και το φορτίο του) καθορίζουν πόσο γρήγορα ένα ηλεκτρικό πεδίο μπορεί να κινήσει το μόριο μέσω ενός ζελατινούχου υλικού [Berg et al., 2002].

Ός προς το DNA, η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την απομόνωση και τον καθαρισμό και ακόμη για τον προσδιορισμό του μεγέθους τμημάτων DNA. Τα γραμμικά δίκλινα μόρια DNA μετακινούνται σε ηλεκτρικό πεδίο γρηγορότερα από κυκλικά και υπερελικωμένα μόρια, με ταχύτητα που εξαρτάται πάντα από το φορτίο και το μοριακό τους βάρος. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης διαθέτει άνοδο στο κάτω τμήμα της και κάθοδο στο επάνω τμήμα της. Το αρνητικό ηλεκτρόδιο τοποθετείται στην κάθοδο ενώ το θετικό στην άνοδο. Το DNA, ως αρνητικά φορτισμένο μόριο, κατευθύνεται στην άνοδο με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους [Roby John et al., 1990].

Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα μόρια στο πήκτωμα, δεν εξαρτάται μόνο από το φορτίο και το μέγεθος και τη στερεοδιάταξη (μορφή) των μορίων αλλά και από το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Όσο πιο μεγάλα είναι τα μόρια, τόσο πιο αργά κινούνται διαμέσου μικρών πόρων. Το μέγεθος των πόρων της πηκτής καθορίζεται από τη συγκέντρωση αναρόζης που χρησιμοποιείται. Όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση της αναρόζης, τόσο πιο μικροί είναι οι πόροι της πηκτής. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα συγκέντρωσης αναρόζης 1% επιτυγχάνεται διαχωρισμός τμημάτων μεγέθους 0,5-5 kb [Roby John et al., 1990].

Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA εξαρτάται ακόμη από την ένταση του ρεύματος που εφαρμόζεται. Όσο μεγαλύτερη τάση εφαρμόζεται, τόσο μεγαλύτερη είναι και η κινητικότητα των μορίων, ωστόσο η αυξημένη τάση μειώνει την διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος.

Το πήκτωμα αναρόζης περιέχει την χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο, που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως καθιστώντας έτσι ορατές τις μπάντες του DNA που προκύπτουν.

Μέθοδος

Για το πήκτωμα αναρόζης χρειάζονται: ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x
Αναρόζη
H₂O

1. Σε κωνική φιάλη προστίθενται οι σωστές ποσότητες σκόνης αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος. Για τη δημιουργία 100ml πηκτώματος, αναμιγνύονται 10ml stock διαλύματος 5xTBE σε 90ml απιονισμένο νερό και προστίθεται 1g αγαρόζης.
2. Ακολουθεί θέρμανση με ταυτόχρονη ανακίνηση έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται να κατέβει σε θερμοκρασία περίπου 55° C ώστε η θερμοκρασία του να μην επηρεάσει την πλαστική βάση (στάδιο 4).
3. Προστίθενται βρωμιούχο αιθιδίου από διάλυμα 10 mg / ml έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.25 μg / ml.
4. Το διάλυμα της αγαρόζης αποχύνεται στη βάση όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα. Προηγουμένως, έχουν τοποθετηθεί κάθετα στην κατάλληλη θέση τα "χτενάκια" που θα δημιουργήσουν θήκες για τη φόρτωση του δείγματος όταν πήξει η αγαρόζη.
5. Αφού πήξει τελείως η αγαρόζη, τα χτενάκια απομακρύνονται.
6. Η βάση με το πήκτωμα βυθίζεται στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα.
7. Στα προϊόντα της PCR, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα (Loading Dye Buffer) που περιέχει γλυκερόλη (ώστε να "κάτσει" το DNA στις θήκες) και μπλε της βρωμοφαινόλης (χρωστική). Η ποσότητα που φορτώνεται στις θήκες εξαρτάται από το μέγεθος των δοντιών της χτένας.
8. Ρυθμίζεται η κατάλληλη τάση ρεύματος και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται.
9. Έκθεση του gel σε υπεριώδες φως, επιτρέπει την ορατότητα των μπαντών του DNA.

2.5 Απομόνωση του DNA από gel αγαρόζης και καθαρισμός

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το DNA που διαχωρίστηκε ανακτάται με τη χρήση του Wizard Genomic DNA Purification Kit της εταιρείας Promega.

Το Membrane Binding Buffer που εσωκλείεται στο kit, περιέχει guanidine isothiocyanate 4,5M και 0,5M potassium acetate, που εξασφαλίζουν την ισχυρή δέσμευση του DNA στην ειδική στήλη.

Το Membrane Wash Solution που εσωκλείεται στο kit, περιέχει 10 mM potassium acetate, 80% αιθανόλη για κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων κ EDTA το οποίο δεσμεύει δισθενή ιόντα που είναι απαραίτητα για τη δράση διαφόρων ενζύμων, όπως η DNA polymerase.

Μέθοδος

A. Διάλυση του κομματιού του gel που περιέχει την επιθυμητή μπάντα DNA

1. Μετά την ηλεκτροφόριση, η μπάντα που μας ενδιαφέρει κόβεται από το gel αγαρόζης και το κομμάτι του gel μεταφέρεται σε eppendorf.
2. Προστίθενται 10 µl Membrane Binding Solution για κάθε 10 mg του κομματιού του gel. Ακολουθεί vortex και το eppendorf αφήνεται σε υδατόλουτρο στους 50-65 °C μέχρι να διαλυθεί τελείως το κομμάτι του gel.

B. Δέσμευση του DNA

3. Η ειδική στήλη SV Minicolumn τοποθετείται σε Collection Tubes.
4. Το gel, που έχει διαλυθεί πλήρως, μεταφέρεται στην στήλη. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
5. Φυγοκέντριση στις 16000 rpm για 1 min. Απόρριψη του διαλύματος που βρίσκεται στο Collection Tube και επανατοποθέτηση της στήλης στο Tube.

Γ. Πλύση

6. Προσθήκη 700 µl Membrane Wash Solution (που περιέχει αιθανόλη). Φυγοκέντριση στις 16000 rpm για 1 min. Απόχυση του υπερκείμενου και επανατοποθέτηση της ειδικής στήλης στο Collection Tube.
7. Επανάληψη βήματος 6 με 500 µl Membrane Wash Solution. Φυγοκέντριση σε 16000 rpm για 5 min.
8. Το περιεχόμενο του Collection Tube απορρίπτεται και ακολουθεί φυγοκέντριση του περιεχομένου της στήλης στις 16000 rpm για 1 min με το καπάκι της φυγόκεντρου ανοιχτό για να εξατμιστεί όση αιθανόλη έχει παραμείνει στη στήλη.

Δ. Έκλουση

9. Η ειδική στήλη μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα καθαρό eppendorf.
10. Προσθήκη στη στήλη 50 µl H₂O, απαλλαγμένου από νουκλεάσες. Η στήλη αφήνεται για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 16000 rpm για 1 min.
11. Η στήλη απορρίπτεται και το DNA φυλάσσεται στους 4 °C ή στους -20 °C.

2.6 Σύνδεση μορίων DNA (Ligation)

Το ligation είναι μία διαδικασία ένωσης των άκρων δύο μορίων DNA. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού ανάμεσα στο 3' υδροξύλιο ενός νουκλεοτιδίου και της 5' φωσφορικής ρίζας ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από ένα ένζυμο που λέγεται DNA λιγάση και συνδέει θραύσματα DNA που έχουν ελεύθερα συμπληρωματικά άκρα. Η T4 DNA λιγάση, είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη DNA λιγάση σε αντιδράσεις ligation και μπορεί να συνδέσει είτε κολλώδη είτε αμβλέα άκρα [για ανασκόπηση βλέπε: Hadfield, 2009; Crowe et al, 1991].

Η αντίδραση ligation καθιστά δυνατή την κλωνοποίηση της αλληλουχίας ενός γονιδίου σε κατάλληλους φορείς. Οι φορείς είναι τμήματα DNA ικανά για αυτόνομο διπλασιασμό. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι φορείς είναι τα βακτηριακά πλασμίδια. Τα περισσότερα βακτήρια, εκτός από τα κύρια χρωμοσώματά τους, περιέχουν και έναν αριθμό "mini" κυκλικών χρωμοσωμάτων που λέγονται πλασμίδια. Τα πλασμίδια μεταφέρουν γονίδια αντίστασης των βακτηρίων σε αντιβιοτικά καθώς και γονίδια για την παραγωγή τοξινών. Εισάγοντας ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA μέσα σε ένα πλασμίδιο μπορούν να παρασκευασθούν ποσότητες DNA σε επίπεδο χιλιογραμμάτων, γεγονός που επιτρέπει τη λεπτομερή ανάλυση της γονιδιακής δομής [Gelehrter et al, Αρχές Ιατρικής Γενετικής]. Από τον συνδυασμό τμημάτων φυσικών πλασμιδίων, έχουν κατασκευασθεί κ τεχνητά πλασμίδια (πχ pBluescript II SK(+)) τα οποία διαθέτουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά που αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις για να είναι ένα πλασμίδιο κατάλληλο για τον ρόλο του φορέα γενετικού υλικού [Noukleinika Oksea & ProteinoSynthesi, chem.gr] :

- Έχουν μικρό μέγεθος με αποτέλεσμα να μεταφέρουν ξένο γενετικό υλικό μέχρι 4-10 Kb. Μεγαλύτερα πλασμίδια έχουν το μειονέκτημα ότι η πιθανότητα πρόσληψής τους από τα κύτταρα ξενιστές μειώνεται σημαντικά και επιπλέον είναι ασταθή, δηλαδή κατά τον αναδιπλασιασμό τους αποσπώνται μερικά κομμάτια ξένου DNA.
- Περιέχουν αφετηρία αναδιπλασιασμού, οπότε μπορούν να πολλαπλασιαστούν ανεξάρτητα από το DNA του ξενιστή.
- Περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που χρησιμεύουν ως γονίδια δείκτες στο στάδιο της κλωνοποίησης.
- Περιέχουν επιπλέον γονίδια δείκτες, όπως το γονίδιο LacZ που εκφράζει την β-γαλακτοσιδάση, η οποία δίνει μπλε χρώμα στις αποικίες όταν αντιδρά με το κατάλληλο υποστρώμα.
- Διαθέτουν κατάλληλα σημεία δράσης περιοριστικών ενζύμων.

Για την αντίδραση ligation χρειάζεται το κομμάτι του DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε (ένθεμα), φορέας, T4 λιγάση, ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και απιονισμένο H₂O για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια του ligation, ο φορέας αλλά και το ένθεμα εμφανίζουν τάση επανακυκλοποίησης προς σχηματισμό τυχαίων ολιγομερών. Γι'αυτόν το λόγο οι

απαιτούμενες συγκεντρώσεις του φορέα και του ενθέματος υπολογίζονται προσεκτικά ώστε τα αποτελέσματα της αντίδρασης να είναι βέλτιστα.

Υπολογισμός της Ποσότητας του ενθέματος:

μάζα ενθέματος σε ng = μάζα φορέα σε ng x (μήκος ενθέματος σε bp / μήκος φορέα σε bp) x 6

Μέθοδος

Για την αντίδραση σύνδεσης, εφαρμόστηκε το εξής πρωτόκολλο:

1. Τοποθέτηση του ενθέματος, του φορέα και του H₂O σε eppendorf που βρίσκεται στον πάγο.
2. Προσθήκη T4 DNA λιγάσης και του Buffer της.
3. Overnight αντίδραση στους 4° C.

Πριν από το επόμενο στάδιο (Transformation), το ligation αραιώνεται 1:10 με H₂O.

2.7 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Τα τροποποιημένα πλασμίδια-φορείς όταν εισαχθούν σε βακτήρια, πολλαπλασιάζονται σε κάθε κυτταρική διαίρεση των βακτηρίων, τα οποία καθώς πολλαπλασιάζονται γρήγορα, πολλαπλασιάζουν ταυτόχρονα σε εκατοντάδες αντίγραφα και τα τροποποιημένα πλασμίδια. Έτσι, το γονίδιο που έχει εισαχθεί και οι ιδιότητές του, μεταβιβάζονται στις επόμενες γενεές του βακτηρίου, δηλαδή το γονίδιο κλωνοποιείται και φορέας της κλωνοποίησης είναι το πλασμίδιο. Η κλωνοποίηση του DNA σε πλασμιδικούς φορείς και η εισαγωγή του σε βακτήρια, αποτελεί μια μορφή γενετικής τροποποίησης κάποιου μικροοργανισμού [*Focus, 2003*].

Εκτός από τους βακτηριοφάγους και τους ιούς των ευκαρυωτικών κυττάρων που διαθέτουν μηχανισμό επιτυχούς εισόδου στα κύτταρα, οι υπόλοιποι φορείς κλωνοποίησης μεταφέρονται μέσα στα κύτταρα-ξενιστές με τρεις κυρίως τρόπους:

1. Με χρήση χημικών ουσιών που προκαλούν διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης.
2. Με χρήση του γονιδιακού όπλου που ενύει μόρια ανασυνδυασμένου DNA επιχρισμένα σε μικροσκοπικά σφαιρίδια βολφραμίου.
3. Με ηλεκτροδιάτρηση, δηλαδή αύξηση της περατότητας της κυτταρικής μεμβράνης με την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης.

Τα βακτήρια *E. Coli* που χρησιμοποιήσαμε, δε διαθέτουν φυσικό μηχανισμό μετασχηματισμού γ'αυτό και η ικανότητα αυτή επάγεται τεχνητά με ηλεκτροδιάτρηση. Μετά την ηλεκτροδιάτρηση τα κύτταρα αφήνονται για αρκετό χρονικό διάστημα ώστε να επουλωθούν οι μεμβράνες τους, προτού στρωθούν σε τρυβλία που φέρουν

επιλεκτικό θρεπτικό υλικό [Neumann et al., 1982; *Molecular Station- Electroporation protocols*].

Μέθοδος

1. Προστίθενται 2μl από το αραιωμένο (1:10) ligation σε περίπου 40 μl competent cells και προσθήκη στον πάγο για 1 λεπτό.
2. Ετοιμάζεται κυβέτα, η οποία βρισκόταν στους 4° C για να μην έχει μεγάλη διαφορά θερμοκρασίας με τα κύτταρα.
3. Μόλις περάσει 1 λεπτό, προστίθενται στην κυβέτα τα κύτταρα μαζί με το ligation και ακολουθεί ηλεκτροδιάτρηση.
4. Αμέσως μετά προστίθενται 1000μl SOC.
5. Το περιεχόμενο της κυβέτας τοποθετείται σε σωλήνα, ο οποίος αφήνεται για 40 περίπου λεπτά, προτού στρωθούν σε στερεή καλλιέργεια τα κύτταρα, για να επουλωθούν τα κύτταρα από την ηλεκτροδιάτρηση.

2.8 Μεταφορά των κυττάρων σε στερεή καλλιέργεια

Η μεταφορά των μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων σε τρυβλία που περιέχουν κατάλληλο θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη τους, γίνεται προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο πέτυχε ή όχι ο ανασυνδυασμός, τί ποσοστό των βακτηρίων φέρει το εισαχθέν τμήμα DNA αλλά και για να μπορέσουν να απομονωθούν για περαιτέρω επεξεργασία τα ανασυνδυασμένα στελέχη από τις αντίστοιχες αποικίες.

Μέσα σε κάθε τρυβλίο εισάγεται διάλυμα LB άγαρ που αποτελεί το θρεπτικό υλικό στο οποίο θα αναπτυχθούν τα βακτήρια, ενώ προηγουμένως έχει προστεθεί στο LB άγαρ αμπικιλίνη (100 μl αμπικιλίνης / 100 ml LB άγαρ) που είναι αντιβιοτικό στο οποίο φέρουν ανθεκτικότητα μόνο τα ανασυνδυασμένα βακτήρια.

Πριν από την επίστρωση των κυττάρων στα τρυβλία, προστίθεται σ'αυτά X- gal που αποτελεί το υπόστρωμα της β- γαλακτοσιδάσης και IPTG που επάγει την έκφραση των γονιδίων [Για λεπτομέρειες της μεθόδου βλέπε: Sambrook et al., *Molecular Cloning Protocols*].

Μέθοδος

1. Για το στρώσιμο 300 μl σε κάθε τρυβλίο, 300 μl από κάθε σωλήνα που περιέχει τα κύτταρα μεταφέρονται σε erpendorf το οποίο φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 2-3 min μέχρι να επιτευχθεί κατακάθιση των κυττάρων.
2. Αφαιρούνται τα 100 μl από το erpendorf (γιατί τα 200 μl απορροφούνται

καλύτερα).

3. Αναδιάλυση των κυττάρων που κατακάθισαν, με ελαφρύ πιπετάρισμα.
4. Προσθήκη 30 μl X-gal και 3 μl IPTG.
5. Στρώσιμο τρυβλίων και αφήνουμε στους 37° C για 12 ώρες μέχρι να μεγαλώσουν οι αποικίες.

2.9 Επιλογή ανασυνδυσασμένων αποικιών και μεταφορά τους σε υγρή καλλιέργεια

Η επιλογή των βακτηριακών αποικιών που έχουν ανασυνδυσαστεί και όχι απλώς μετασχηματιστεί, δηλαδή έχουν ενσωματώσει πλασμίδια που περιείχαν το ένθεμα και όχι πλασμίδια στα οποία δεν πέτυχε ο ανασυνδυασμός, γίνεται με βάση το χρώμα τους.

Οι αποικίες που αποτελούνται από βακτήρια τα οποία φέρουν μη ανασυνδυσασμένα πλασμίδια, έχουν μπλε χρώμα λόγω έκφρασης του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης και αντίδρασής της με το υπόστρωμά της X-gal. Οι αποικίες που αποτελούνται από βακτήρια με ανασυνδυσασμένα πλασμίδια, έχουν λευκό χρώμα διότι το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης είναι απενεργοποιημένο λόγω αλλαγής του αναγνώστiku πλαισίου μετά την είσοδο του ενθέματος στο πλασμίδιο. Το ένθεμα ενσωματώνεται στην περιοχή MCS, δηλαδή την περιοχή πολυσυνδέτη, που έχει παρασκευασθεί τεχνητά ώστε να περιέχει θέσεις αναγνώρισης πολλών περιοριστικών ενζύμων και έχει εισαχθεί μέσα στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Έτσι δεν παράγεται β-γαλακτοσιδάση και επομένως δεν υφίσταται αντίδραση με το X-gal ώστε να χρωματιστούν μπλε οι αποικίες.

Η υγρή καλλιέργεια αποτελείται από διάλυμα LB-Broth, που παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στα βακτήρια, στο οποίο προστίθεται NaCl (5 g NaCl / 1000 ml LB Broth) και αμπικιλίνη (100 μl αμπικιλίνης/ 100 ml LB)

[Για λεπτομέρειες της μεθόδου βλέπε: Sambrook et al., *Molecular Cloning Protocols*].

Μέθοδος

1. 30 ml διαλύματος LB Broth, μεταφέρονται σε σωλήνα ο οποίος έχει προηγουμένως αποστειρωθεί.
2. Με την αποστειρωμένη άκρη οδοντογλυφίδας μεταφέρεται μία λευκή αποικία από το τρυβλίο στον σωλήνα.
3. Μεταφορά και άλλων λευκών αποικιών του ίδιου τρυβλίου σε διαφορετικούς σωλήνες (μία αποικία σε κάθε σωλήνα).
4. Οι καλλιέργειες αφήνονται για 12 περίπου ώρες σε ψυχόμενο επωαστήριο.

2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Μετά την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια, απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA που περιέχει το ένθεμα. Η διαδικασία πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή ώστε να απομονωθεί μόνο το πλασμιδιακό DNA και όχι το χρωμοσωμικό [Για λεπτομέρειες της μεθόδου βλέπε: Sambrook et al., *Molecular Cloning Protocols*].

Με την προσθήκη διαλύματος που περιέχει γλυκόζη, διατηρείται ισοτονικό το διάλυμα για να μη σπάνε οι μεμβράνες κατά την διαδικασία απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA.

Η προσθήκη του διαλύματος alkali (περιέχει NaOH) δημιουργεί τρύπες στις μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων ώστε να εξέλθει το πλασμιδιακό DNA και όχι το χρωμοσωμικό.

Η προσθήκη διαλύματος οξικού καλίου σταματάει τη λύση των κυττάρων, εμποδίζοντας τη δράση του SDS που περιέχεται μέσα στο alkali.

Η αιθανόλη που επίσης χρησιμοποιείται στην απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, έχει την ικανότητα να κατακρημνίζει νουκλεϊκά οξέα.

Η TE- RNAase χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του RNA.

Μέθοδος

1. Οι αποικίες μεταφέρονται σε erpendorf.
2. Φυγοκέντριση 3 min στις 3000 rpm. Αφαίρεση όσο γίνεται περισσότερου υπερκείμενου και κρατάμε το ίζημα (βακτήρια) στον πάγο.
3. Προσθήκη 100 μl παγωμένου διαλύματος που περιέχει γλυκόζη και αναδιάλυση ιζήματος. Ακολουθεί vortex για 1 min και αφήνεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 200 μl διαλύματος alkali (NaOH). Ανάδευση αναποδογυρίζοντας το erpendorf (5 φορές) και αφήνεται στον πάγο για 3-5 min (ανάλογα με το ιξώδες μπορεί να διαφέρει→σχηματισμός πυκνού διαλύματος).
5. Προσθήκη 150 μl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου CH₃COOK (pH περίπου 4,8). Ανάδευση στο vortex (ανάποδα το erpendorf) και αφήνεται στον πάγο για 8-10 λεπτά.
6. Φυγοκέντριση για 5 min στις rpm max. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.
7. Προσθήκη 2v αιθανόλης 100% (1 ml) για κατακρήμνιση του DNA , vortex για λίγα sec, μεταφορά στους -20° C για 10 min, αφήνεται για 2-3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Φυγοκέντριση για 5 min σε rpm max. Αφαίρεση υπερκείμενου.

9. Προσθήκη 0,5ν αιθανόλης 70% (0,5 ml) για την απομάκρυνση των αλάτων που έχουν μείνει. Ανάδευση αναποδογυρίζοντας το erppendorf. Επανάληψη βήματος 8.
10. Το erppendorf αφήνεται να στεγνώσει. Αναδιάλυση ιζήματος σε TE-RNAase 50 μl (απομακρύνει το RNA). Διατήρηση στους 4° C.

2.11 Πέψη πλασμιδιακού DNA

Η διαδικασία της πέψης του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιείται με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Τα περιοριστικά ένζυμα, που ονομάζονται επίσης και περιοριστικές ενδονουκλεάσες επειδή κόβουν μέσα σε μια αλυσίδα DNA, είναι ένζυμα απομονωμένα από βακτήρια, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να τέμνουν το δίκλωνο DNA σε ειδική αλληλουχία νουκλεοτιδίων [*Gelehrter et al., Αρχές Ιατρικής Γενετικής*].

Περιέχονται σε πολλά προκαρυωτικά κύτταρα και ρόλος τους είναι να διασπούν τα “ξένα” μόρια DNA που εισβάλλουν στο κύτταρο. Δε διασπούν τα δικά τους μόρια DNA, γιατί τα σημεία που τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν στο DNA για να το διασπάσουν, στην περίπτωση των δικών τους μορίων είναι τροποποιημένα (πχ μεθυλιωμένα) [www.chem.uoa.gr/courses/Undergraduate/Diatrofi/]

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί εκατοντάδες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αλλά μόνο από προκαρυωτικά κύτταρα. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα δεν έχουν βρεθεί τέτοια ένζυμα. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι: Τύπου I, εκείνες που κόβουν το μόριο του DNA όταν αυτό δεν περιέχει τροποποιημένες νουκλεϊνικές βάσεις και Τύπου II, εκείνες που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες βάσεων (έως 8 ζευγάρια) στη διπλή έλικα του DNA και μάλιστα τοποθετημένες κατά παλίνδρομο τρόπο. Μπορούν δηλαδή να υδρολύουν κάποιο συγκεκριμένο φωσφοδιεστερικό δεσμό και στις δύο αλυσίδες του DNA [www.chem.uoa.gr/courses/Undergraduate/Diatrofi/].

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ειδικά ένζυμα αφού ο συνδυασμός των τεσσάρων βάσεων απαντάται μόνο κάθε μερικές εκατοντάδες βάσεις, ενώ ο συνδυασμός των έξι βάσεων μόνο μια φορά κάθε μερικές χιλιάδες βάσεις.

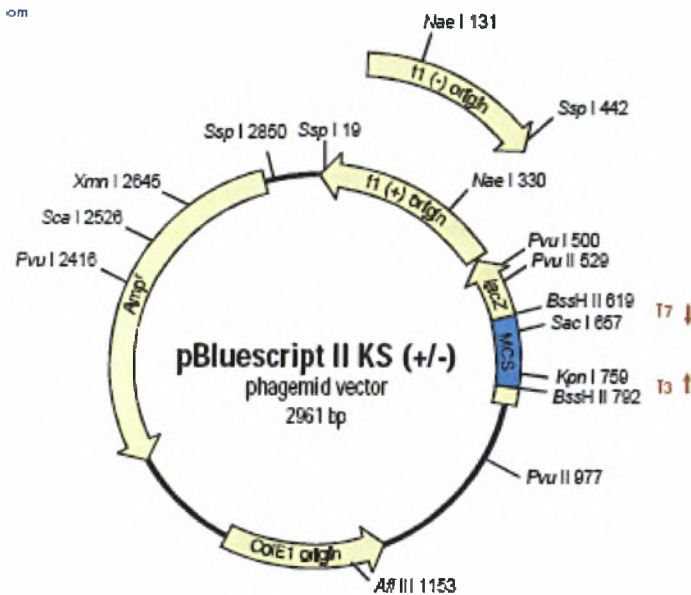
Το κόψιμο του DNA με αυτόν τον τρόπο, δημιουργεί στα άκρα του μικρά μονόκλωνα τμήματα με συμπληρωματικές βάσεις που μπορούν να ξαναενωθούν με υβριδισμό και με αποκατάσταση των φωσφοδιεστερικών δεσμών με τη δράση του ενζύμου λιγάση του DNA. Γι' αυτό, τα άκρα αυτά ονομάζονται και κολλώδη.

Το κόψιμο με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες γίνεται και με τέτοιο τρόπο ώστε τα άκρα του DNA να μην είναι κολλώδη, αλλά να είναι απότομα. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιούνται:

1. στην ανάλυση της δομής των χρωματοσωμάτων,
2. στην εύρεση της ακολουθίας μεγάλων μορίων DNA,
3. στην απομόνωση γονιδίων και
4. στη δημιουργία νέων μορίων DNA που χρησιμοποιούνται στον ανασυνδυασμό του

DNA [www.chem.uoa.gr/ courses/ Undergraduate/ Diatrofi].

Ο φορέας που επιλέχθηκε είναι ο pBluescript II SK(+), ο οποίος αποτελεί τεχνητό πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 2961 bp. Το ένζυμο με το οποίο “κόπηκαν” τα πλασμίδια είναι το PvuII το οποίο δρα σε δύο σημεία στο πλασμίδιο pBluescript II SK(+): α) 529 και β) 977 (5'-CAG[^]CTG-3', 3'-GTC[^]GAC-5')



Μέθοδος

Για αντίδραση πέψης χρειάζονται τα εξής αντιδραστήρια: πλασμιδιακό DNA, ένζυμο (Pvu II), το Buffer του ενζύμου και H₂O.

1. Τα αντιδραστήρια μεταφέρονται στον πάγο.
2. Προσθήκη H₂O και του πλασμιδιακού DNA σε tube.
3. Προσθήκη του ενζύμου και του buffer του στο tube.
4. Επώαση στους 37° C για 1 ώρα.

Μετά την πέψη, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται ώστε να δούμε αν ήταν επιτυχής η ενίσχυση.

2.12 Καθαρισμός με φαινόλη/ χλωροφόρμιο

Σε περιπτώσεις που απαιτείται υψηλή καθαρότητα του DNA, τα δείγματα πρέπει να καθαρίζονται με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η απομάκρυνση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται καλύτερα όταν χρησιμοποιούνται δύο οργανικοί διαλύτες αντί ενός. Στη συνέχεια πρέπει να

ακολουθήσει και νέα εκχύλιση με χλωροφόρμιο το οποίο απομακρύνει τα υπολείμματα της φαινόλης [Για λεπτομέρειες της μεθόδου βλέπε: Sambrook et al., *Molecular Biology methods*].

Η φαινόλη είναι υδρόφοβη ουσία γι'αυτό όταν την βάζουμε στο διάλυμα, τα υδρόφοβα αμινοξέα των πρωτεϊνών βγαίνουν προς τα έξω (στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών) και κατακρημνίζονται, οπότε μένει μόνο το DNA στο υπερκείμενο.

Το χλωροφόρμιο αυξάνει την πυκνότητα της οργανικής φάσης για πιο εύκολη κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και επιπλέον απομακρύνει τα υπολείμματα της φαινόλης από το διάλυμα.

Μέθοδος

1. Προσθήκη 350 μl H₂O => Τελικός όγκος 400 μl.
2. Προσθήκη φαινόλης : χλωροφορμίου (1:1) ίσου όγκου δηλαδή 200 μl :200 μl και καλή ανάδευση.
3. Φυγοκέντριση για 5 min σε rpm max.
4. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf (περίπου 400 μl).
5. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου (δηλαδή 400 μl) και ανάδευση.
6. Φυγοκέντριση για 5 min σε rpm max.
7. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf.
8. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου (δηλαδή 400 μl) και ανάδευση.
9. Φυγοκέντριση για 5 min σε rpm max.
10. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf.

2.13 Κατακρήμνιση του DNA (Eth ppt)

Μετά τον καθαρισμό με φαινόλη και το χλωροφόρμιο, ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη, CH₃COONa και γλυκογόνο:

Η αιθανόλη, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, αποτελεί αφυδατικό μέσο, επομένως χρησιμοποιείται για να απομακρύνει το H₂O από το DNA.

Το γλυκογόνο βελτιώνει την απόδοση καθώς είναι μεγαλομοριακή ένωση που δημιουργεί σύμπλοκο με το DNA και το "τραβάει" προς τα κάτω, βοηθάει δηλαδή να γίνει η κατακρήμνιση.

Το CH₃COONa χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου του DNA.

Μέθοδος

1. Προσθήκη 2,5 V (όγκους) 100% αιθανόλης στο erpendorf με το DNA που είχαμε πάρει στο τέλος της προηγούμενης διαδικασίας.
2. Προσθήκη CH_3COONa 2,31 M.
3. Προσθήκη 0,5 μl γλυκογόνου.
4. Καλή ανακίνηση και μεταφορά στους -20°C για 15 min.
5. Φυγοκέντριση για 15 min σε rpm_{max} και απόρριψη υπερκείμενου.
6. Προσθήκη 0,5 V 70% αιθανόλης .
7. Φυγοκέντριση για 15 min σε rpm_{max} και απόρριψη υπερκείμενου.
8. Μεταφορά στον κλίβανο επώασης για στέγνωμα και έπειτα αναδιάλυση σε 100 μl H_2O και vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.

2.14 Ανάλυση πρωτοδιάταξης DNA αλληλουχίας (sequencing)

Η μέθοδος sequencing χρησιμοποιείται προκειμένου να βρεθεί η ακριβής δομή ενός μορίου DNA .Υπάρχουν δύο τεχνικές με τις οποίες βρίσκεται η δομή ενός μορίου: Η πρώτη αναπτύχθηκε από τους Maxam-Gilbert και είναι η λεγόμενη χημική μέθοδος και η δεύτερη είναι η μέθοδος Sanger, γνωστή και ως διδεοξυ-μέθοδος [για ανασκόπηση βλέπε: Russelr, 2002; Metzenberg , 2003].

Η μέθοδος Sanger βασίζεται στον βασηο-ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικής καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή. Τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις γίνονται ταυτόχρονα, που όλες περιέχουν εκκινητή, DNA-μήτρα, ένζυμο πολυμερισμού και τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεϊτίδια (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), αλλά κάθε μία περιέχει και ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο, το οποίο σταματά την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το νουκλεοτίδιο αυτό είναι ένα διδεοξυ-νουκλεοτίδιο, το οποίο μπορεί και ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δε μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3' θέση [Sanger et al., 1977 / 1980].

Συνεπώς σε κάθε αντίδραση, παράγεται ένα μίγμα θραυσμάτων που όλα τερματίζουν στο ίδιο τροποποιημένο νουκλεοτίδιο. Όταν τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή, μπορεί να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στις τέσσερις σειρές του πηκτώματος ηλεκτροφόρισης. Η θέση των θραυσμάτων αποκαλύπτεται με τη σήμανσή τους πριν ή κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων επέκτασης [Sanger et al., 1977 / 1980].

Μέθοδος

1. Το προς ανάλυση δείγμα DNA γίνεται μονόκλωνο και χωρίζεται σε τέσσερα δείγματα.
2. Σημαίνεται ο εκκινητής ή κάποιο νουκλεοτίδιο.
3. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ο εκκινητής, τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση και ένα από τα τέσσερα διδεοξυ-νουκλεοτίδια.
4. Ακολουθεί επέκταση του DNA, η οποία τερματίζεται όταν ενσωματωθεί το διδεοξυ-νουκλεοτίδιο.
5. Το DNA αποδιατάσσεται και ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπου τα κομμάτια διαχωρίζονται βάση μεγέθους.
6. Η οπτικοποίηση γίνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας αν η σήμανση έγινε με ραδιενέργεια, ή σε υπεριώδες φως αν η σήμανση έγινε με φθορισμό.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό ασθενών

Σε 500 τυχαία δείγματα αίματος ασθενών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας, εφαρμόστηκε η τεχνική ανίχνευσης αντισωμάτων με τη χρήση του Leishmania Rapid Test με σκοπό την πιθανή ανεύρεση θετικών αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα και των 500 δειγμάτων ήταν αρνητικά.

Το Leishmania Rapid Test εφαρμόστηκε επίσης σε 3 δείγματα ασθενών στους οποίους είχε διαγνωσθεί η νόσος. Τα αποτελέσματα του Rapid Test επιβεβαίωσαν την αρχική διάγνωση.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εφαρμόστηκε στα 3 θετικά δείγματα για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων του Rapid Test και κυρίως για τον περαιτέρω εντοπισμό, πολλαπλασιασμό και απομόνωση του ριβοσωμικού τμήματος του DNA του παρασίτου, για το οποίο είχαν σχεδιαστεί οι ειδικοί εκκινητές.

Η περιοχή του DNA της Leishmania που αναγνώριζαν οι εκκινητές, δηλαδή ένα τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί το rRNA της μικρής υπομονάδας της Leishmania, είναι εξαιρετικά συντηρημένη στα διάφορα υποείδη του παρασίτου και για τον λόγο αυτό οι συγκεκριμένοι εκκινητές αποτελούν αξιόπιστο μοριακό "εργαλείο" για την εργαστηριακή διάγνωση της νόσου. Ωστόσο, λόγω της υψηλής συντήρησης της περιοχής δεν ήταν βέβαιο κατά πόσο θα μπορούσε να γίνει διαχωρισμός των διαφόρων υποειδών της Leishmania.

Η ακολουθία των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η εξής:

LEI 70 R: 5' - CGC GGT GCT GGA CAC AGG GTA – 3'

LEI 70 L: 5' - CGC AAC CTC GGT TCG GTG TG – 3'

Το πρόγραμμα που σχεδιάστηκε για την Leishmania στη συσκευή της PCR ήταν το εξής:

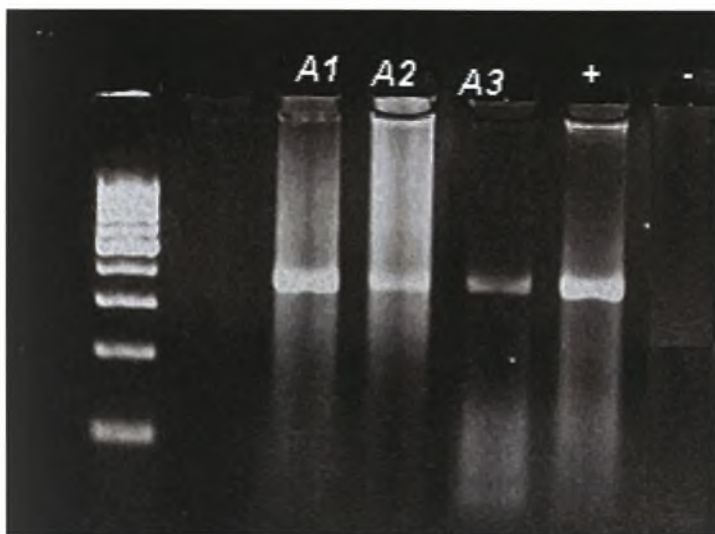
1. 95° C για 5 min
2. 95° C για 30 sec
3. 65° C για 30 sec
4. 72° C για 30 sec
5. go to step 2 για 39 φορές (επανάληψη βήματος 2,3,4,5 39 φορές)
6. 72° C για 5 min

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μl, εκ των οποίων τα 5 μl ήταν το DNA.

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR έγινε σε πήκτωμα συγκέντρωσης αγαρόζης 1%. Η μπάντα που αναμέναμε έχει μέγεθος 345 bp.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο πήκτωμα με τη σειρά που φαίνεται στην Εικόνα 10, δηλαδή πρώτα το A1, A2, A3 και μετά ο θετικός μάρτυρας και ο αρνητικός μάρτυρας. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε σκυλίσιο DNA.



Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 13, και τα τρία ανθρώπινα δείγματα έδωσαν μπάντα στις 345 bp, επομένως ήταν θετικά για την υπο μελέτη ασθένεια. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το ενισχυμένο DNA του παρασίτου καθαρίστηκε και εστάλη απευθείας για sequencing.

Ανάλυση πρωτοδιάταξης DNA αλληλουχίας (sequencing)

Τα αποτελέσματα του sequencing επιβεβαίωσαν ότι πρόκειται για λειψμάνια αλλά δεν ήταν αρκετά καθαρά ώστε να δούμε και το υποείδος του παρασίτου. Για τον λόγο αυτό τα PCR products ηλεκτροφορήθηκαν και πάλι και στη συνέχεια έγινε απομόνωση της μπάντας που μας ενδιέφερε και καθαρισμός του DNA μετά την απομόνωσή του από το πήκτωμα αγαρόζης, προκειμένου να ακολουθήσει η κλωνοποίησή του μέσα σε κατάλληλους φορείς.

Λίγαση και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pBluescript II SK(+) της εταιρείας Fermentas. Το ένθεμα εισήχθη στην περιοχή MSC του φορέα.

Για αντίδραση σύνδεσης τελικού όγκου 10 μl, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες:

DNA (insert)	1 μl
DNA (vector- pBluescript II SK+)	3 μl
Buffer 1x	1 μl
T4 ligase	1 μl
H ₂ O	4 μl

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων της *E. Coli*, έγινε με ηλεκτροδιάτρηση λόγω της μεγάλης απόδοσης που έχει αυτή η τεχνική σε σχέση με αντίστοιχες χημικές μεθόδους αλλά και λόγω της ταχύτητάς της.

Μετά τον μετασχηματισμό τα κύτταρα στρώθηκαν σε τρυβλία προκειμένου να γίνει απομόνωση των ανασυνδυασμένων στελεχών και έπειτα απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Μέσω της διαδικασίας κλωνοποίησης το κομμάτι του DNA που μας ενδιέφερε, ενισχύθηκε πολύ περισσότερο απ'ότι με την PCR, επομένως πήραμε περισσότερο προϊόν απ'ότι στην αρχή που το DNA εστάλη απευθείας μετά την PCR για sequencing.

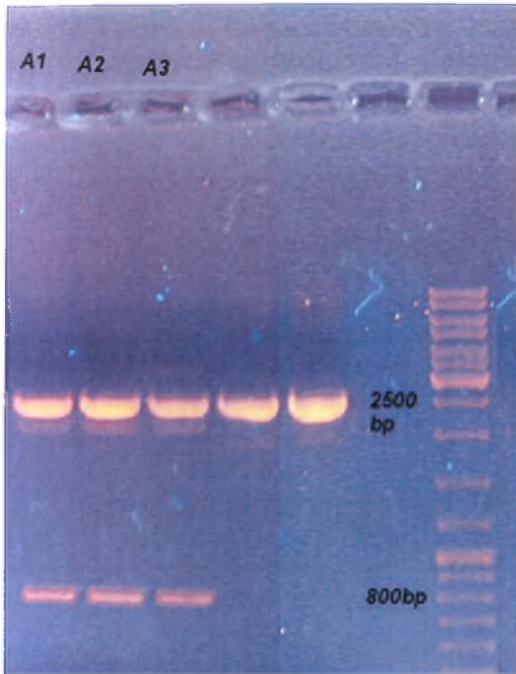
Πέψη πλασμιδιακού DNA

Για αντίδραση πέψης τελικού όγκου 10 μl, χρησιμοποιήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Πλασμιδιακό DNA	2 μl
Buffer (10x → 1x)	1 μl
Pvu II (10u / μl → 2u / μl)	0,2 μl
H ₂ O	6,8 μl

Το περιοριστικό ένζυμο που επελέγει ήταν το Pvu II, το οποίο δρα σε δύο σημεία στο τεχνητό πλασμίδιο pBluescript II SK(+) τα οποία βρίσκονται έξω από την MSC περιοχή: α) 529 και β) 977 (5'-CAG[^]CTG-3', 3'- GTC[^]GAC-5'). Η περιοχή MCS έχει τον ρόλο πολυσυνδέτη και είναι η περιοχή όπου εισάγεται το ένθεμα.

Ο ανασυνδυασμένος φορέας έχει μέγεθος 3306 bp. Το μέγεθος του φορέα χωρίς το ένθεμα είναι 2561 bp. Εφόσον οι θέσεις κοπής του Pvu II βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης που εισήχθη το ένθεμα, στην ηλεκτροφόρηση που ακολουθεί μετά την πέψη, αναμέναμε δύο μπάντες: η μία μπάντα θα έχει μέγεθος 793 bp (από τη μία θέση κοπής έως την άλλη + το ένθεμα) και η άλλη 2513 bp. Στην Εικόνα 14 φαίνονται τα αποτελέσματα της πέψης:



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης.

Όπως δείχνει η Εικόνα 14, η κλωνοποίηση του ενθέματος ήταν επιτυχής και οι μπάντες είχαν το αναμενόμενο μέγεθος που σημαίνει ότι το ένθεμα εισήχθη στη σωστή θέση. Στο 4^ο και 5^ο "πηγαδάκι" τρέξαμε σκυλίσια δείγματα, θετικά για τη νόσο αλλά δεν έδωσαν αποτέλεσμα, επομένως δεν έγινε σωστά η ενίσχυση στα δείγματα αυτά.

Ανάλυση πρωτοδιάταξης DNA αλληλουχίας (sequencing)

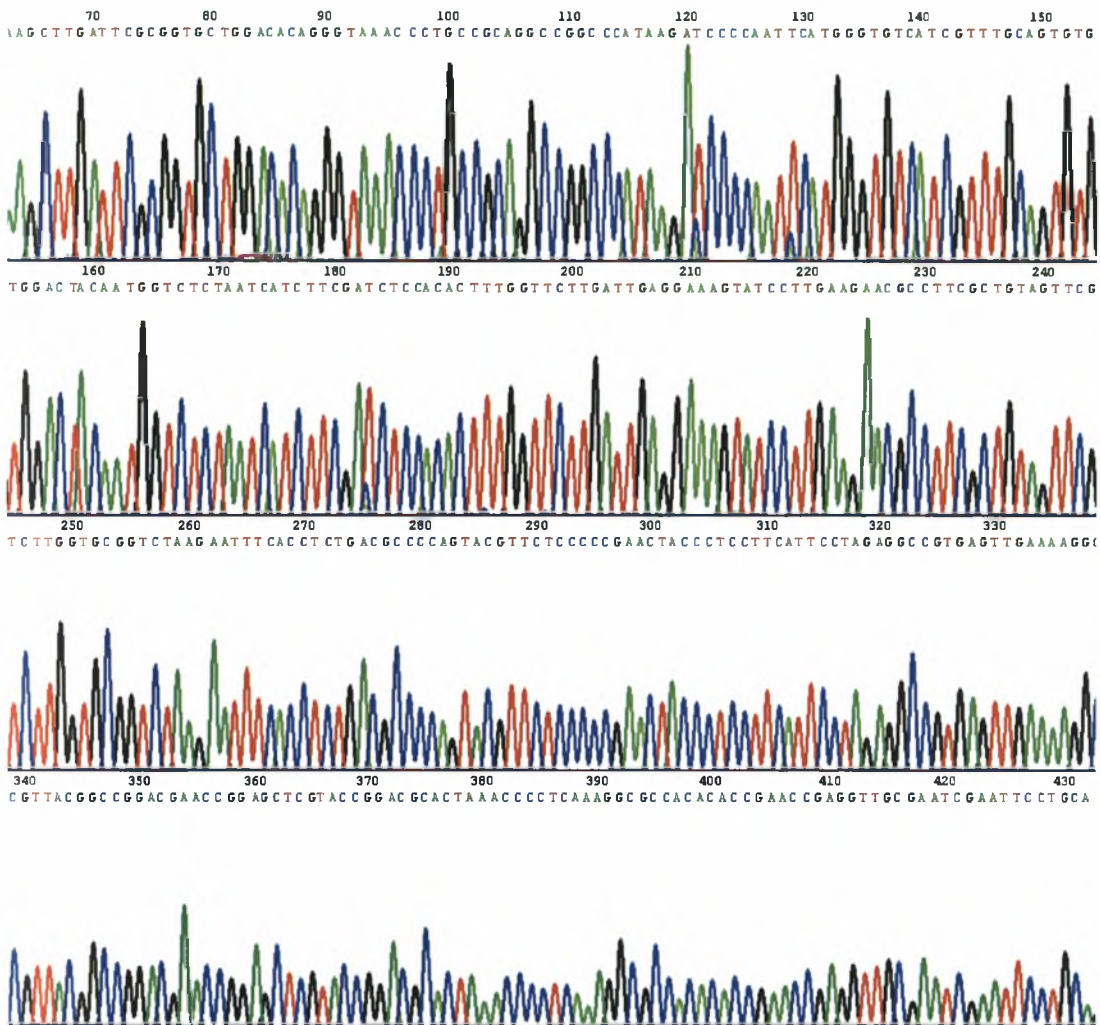
Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της πέψης με φαινόλη / χλωροφόρμιο και την επακόλουθη κατακρήμνιση του DNA, τα δείγματα στάλθηκαν για sequencing και πάλι.

Τα αποτελέσματα του sequencing υπέστησαν επεξεργασία σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, με το πρόγραμμα OMEGA προκειμένου να απομακρυνθούν τα τμήματα του φορέα που ήταν ενωμένα με το ένθεμά μας. Το ένζυμο Pvu II αναγνωρίζει τις θέσεις 529 και 977 σαν θέσεις κοπής και ανάμεσα στα σημεία αυτά έχει ενσωματωθεί το ένθεμα, επομένως έπρεπε να απομακρυνθούν 448 βάσεις που βρίσκονταν εκατέρωθεν της αλληλουχίας που μας ενδιέφερε.

Στη συνέχεια έγινε αναζήτηση με το πρόγραμμα BLAST προκειμένου να βρεθεί η ομολογία της αλληλουχίας του ενθέματος μας με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων του BLAST. Τα αποτελέσματα έδειξαν 100% ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή της *Leishmania infantum* αλλά και με την αντίστοιχη περιοχή της *Leishmania donovani* και της *Leishmania chagasi*.

Δεδομένου ότι το υποείδος που έχει βρεθεί στη χώρα μας είναι η *Leishmania*

infantum, το αντίστοιχο αποτέλεσμα χαρακτηρίστηκε πιθανότερο. Τέλος, η σύγκριση των ενισχυμένων ριβοσωμικών περιοχών των τριών ανθρώπινων δειγμάτων μεταξύ τους, έδειξε ότι υπήρχε 100% ομολογία. Στην Εικόνα 15 παρατίθεται το χρωματογράφημα ενός εκ των τριών δειγμάτων, έτσι όπως προέκυψε από το sequencing και μετά από την επεξεργασία με το OMEGA.



Εικόνα 15. Χρωματογράφημα δείγματος A1.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λείσμανίαση είναι μια παρασιτική νόσος που προκαλείται από 20 και πλέον είδη του παρασίτου *Leishmania* και μεταδίδεται με το τσίμπημα της σκνίπας. Υπάρχουν τρεις κύριες μορφές λείσμανίασης: η δερματική, η σπλαγχνική (καλααζάρ) και η βλεννογονική, η οποία είναι πιο σπάνια μορφή. Ενδημεί περισσότερο σε τροπικές και υποτροπικές χώρες και σε χώρες της Νότιας Ευρώπης. Πρόκειται για επιδημική νόσο που προκαλεί αυξημένη θνησιμότητα, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες ενώ τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρήθηκε αύξηση των περιστατικών στην Ελλάδα.

Παρά την σχετικά μεγάλη εξάπλωση στον άνθρωπο, ο κύριος ξενιστής της νόσου είναι ο σκύλος, με τα κρούσματα λείσμανίασης στον άνθρωπο στη χώρα μας να ανέρχονται κατά μέσο όρο σε 25 ετησίως, ενώ στο σκύλο να ξεπερνούν τις 100.000. Η διαφορά αυτή στην επιλογή του ξενιστή προκάλεσε το ενδιαφέρον πολλών μελετητών τα τελευταία χρόνια και οδήγησε στην πεποίθηση ύπαρξης δύο, ανεξάρτητων μεταξύ τους, κύκλων εξέλιξης του παρασίτου στη χώρα μας. Η πεποίθηση αυτή ενισχύθηκε από έρευνες που έδειξαν πως τις περισσότερες φορές ο φορέας της *Leishmania* (σκνίπα) που μεταδίδει την νόσο στον άνθρωπο, διαφέρει απ' τον φορέα που μεταδίδει τη νόσο στον σκύλο. Υπάρχουν δηλαδή διαφορετικοί φορείς με διαφορετική προτίμηση για τα ζώα και τον άνθρωπο ο καθένας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία ήταν η αρχή μιας προσπάθειας προσέγγισης του ζητήματος από άλλη όψη. Η έρευνα επικεντρώθηκε όχι στους διαφορετικούς φορείς της νόσου, αλλά στα πιθανώς διαφορετικά υποείδη της *Leishmania* που προκαλούν την λείσμανίαση στη χώρα μας, τόσο στους σκύλους όσο και στον άνθρωπο. Για επίστευση της διαδικασίας, η έρευνα χωρίστηκε σε δύο μέρη ώστε να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη μελέτη μέρους του ανθρώπινου αλλά και μέρους του σκυλίσιου πληθυσμού της Θεσσαλίας.

Στη συγκεκριμένη εργασία λοιπόν, η οποία αφορά την μελέτη του παρασίτου στον άνθρωπο, αρχικά εξετάστηκε αντιπροσωπευτικό δείγμα ανθρώπινου πληθυσμού της Λάρισας (500 τυχαίοι ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας) προκειμένου να διαπιστωθεί το ποσοστό εξάπλωσης της νόσου στον γενικό πληθυσμό. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ορολογική και αφορούσε την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του παρασίτου στο αίμα των ασθενών. Η ανίχνευση των αντισωμάτων έγινε με τη χρήση του *Leishmania Rapid Test*, το οποίο διαπιστώσαμε πως δίνει εξίσου αξιόπιστα αποτελέσματα όταν αντί για τον ορό του αίματος, εξετασθεί το ολικό αίμα ή ο μυελός των οστών. Τα αποτελέσματα μας, έδειξαν πως η λείσμανίαση μεταδίδεται στον ανθρώπινο πληθυσμό της περιοχής με συχνότητα πολύ μικρότερη από 1:500 άτομα.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν δείγματα αίματος από τρεις ασθενείς για τους οποίους είχε διαγνωσθεί από πριν πως έφεραν τη νόσο, και τα δείγματα τους είχαν σκοπίμως φυλαχθεί στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μοριακές και αποσκοπούσαν στην ανάλυση των απλοτύπων των μολυσματικών παραγόντων που μετέδωσαν τη νόσο στους ασθενείς αυτούς.

Αρχικά, έγινε εξαγωγή του DNA από το αίμα των ασθενών και στη συνέχεια PCR. Το πρόγραμμα της PCR που επιλέχθηκε στη συσκευή έχει αναλυθεί παραπάνω (για λεπτομέρειες βλέπε: σελίδα 42) ωστόσο διαπιστώσαμε ότι και με μειωμένη τη θερμοκρασία υβριδισμού στους 58° C αντί για 65° C, η PCR έδινε εξίσου αξιόπιστα αποτελέσματα και ο αριθμός των μη ειδικών προϊόντων δεν ήταν σημαντικός. Η PCR χρειάστηκε να επαναληφθεί αρκετές φορές μέχρι να επιβεβαιωθούν οι αναμενόμενες ζώνες ενίσχυσης. Αφού εξετάστηκαν προσεκτικά όλες οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια, διαπιστώθηκε πως η μη καθαρή εικόνα της PCR οφειλόταν σε επιμόλυνση των εκκινητικών μορίων. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί πως πριν εφαρμόσουμε την τεχνική PCR έγινε ποσοτικοποίηση του DNA κάθε δείγματος μέσω ηλεκτροφόρησης, προκειμένου να βρούμε τον κατάλληλο όγκο του DNA που θα προσθέταμε στην PCR. Ο όγκος που επιλέχθηκε τελικά ήταν τα 5 μl DNA. Η Taq Polymerase που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν υψηλής ποιότητας διότι παρατηρήσαμε πως εξίσου καλά δούλευε και η απλή Taq Polymerase, αφού οι θερμοκρασίες που αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης δεν απαιτούσαν εξαιρετικά θερμοάντοχο ένζυμο.

Μετά την PCR, τα δείγματα καθαρίστηκαν και στάλθηκαν για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς αλληλουχίας- (sequencing). Τα αποτελέσματα του sequencing έδειχναν πως το DNA ανήκε στο παράσιτο, ωστόσο για τον έναν εκ των τριών ασθενών, δεν ήταν αρκετά καθαρά ώστε να προσδιοριστεί με ακρίβεια το υποείδος του παρασίτου. Αυτό που υποθέσαμε ήταν πως αυτή η εικόνα θα μπορούσε να οφείλεται σε 3 παράγοντες: α) σε μη καλά καθαρισμένο PCR προϊόν β) σε παραπάνω από ένα υποείδος *Leishmania* που είχε προκαλέσει τη νόσο στον συγκεκριμένο ασθενή για τον οποίο η εικόνα του sequencing δεν ήταν καθαρή και γ) στα εκκινητικά μόρια τα οποία είχαν κατασκευασθεί ώστε να αναγνωρίζουν μία εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή του DNA του παρασίτου και δε μπορούσαν να ξεχωρίσουν το ένα υποείδος από το άλλο. Προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιον από τους παραπάνω παράγοντες οφειλόταν το αποτέλεσμα του sequencing που πήραμε, αποφασίσαμε να κλωνοποιήσουμε την υπό μελέτη αλληλουχία σε πλασμιδιακούς φορείς. Η κλωνοποίηση εξασφαλίζει περισσότερο προϊόν, διότι ενισχύει πολύ περισσότερο την αλληλουχία απ' ό τι η PCR, καθαρότερο προϊόν και ακόμη ξεχωρίζει τα υποείδη του παρασίτου που περιέχονται σε κάθε δείγμα αφού σε κάθε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιέχεται ένας μόνο κλώνος της αλληλουχίας του παρασίτου.

Κατά την απομόνωση των ανασυνδυασμένων βακτηριακών αποικιών από την στερεή καλλιέργεια, παρατηρήσαμε πολλές αποικίες γαλάζιου χρώματος αντί του αναμενόμενου μπλε ή άσπρου που περιμέναμε. Το γαλάζιο χρώμα οφείλεται σε μη πλήρως απενεργοποιημένο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω του μικρού μεγέθους του ενθέματος το οποίο δεν αλλάζει το αναγνωστικό πλαίσιο μετά την εισαγωγή του.

Η πέψη του πλασμιδιακού DNA έγινε με το περιοριστικό ένζυμο Pvu II. Οι θέσεις κοπής που αναγνωρίζει το ένζυμο Pvu II βρίσκονται αρκετές βάσεις μακρύτερα από την περιοχή της ένθεσης. Επομένως, κατά την πέψη αποκόπτεται μεγαλύτερο τμήμα του ενθέματος, γεγονός που διευκολύνει την αναγνώριση των τμημάτων πέψης και

τον εντοπισμό των ανασυνδυασμένων κλώνων.

Μετά την πέψη, ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Μετά από αυτόν τον καθαρισμό, ξαναέγινε πέψη με Ρνυ II για να ελέγξουμε αν έγινε σωτά ο καθαρισμός διότι αν είχε μείνει φαινόλη στο δείγμα, δε θα μπορούσε να δράσει το ένζυμο επομένως δε θα παίρναμε αποτέλεσμα ούτε στο sequencing. Επίσης με τη δεύτερη πέψη και ηλεκτροφόρηση, ποσοτικοποιήσαμε τα δείγματα ώστε να ξέρουμε πόσο DNA περιέχεται στο καθένα από αυτά.

Τα αποτελέσματα του δεύτερου sequencing ήταν καθαρά και έδειχναν 100% ομολογία με την ριβοσωμική περιοχή της *Leishmania infantum* και της *Leishmania donovani* και *chagasi*. Από αυτό συμπεράναμε πως στην αλληλουχία των συγκεκριμένων εκκινητικών μορίων που είχαμε χρησιμοποιήσει, οφειλόταν τα μη ειδικά αποτελέσματα που πήραμε σχετικά με το υποείδος του παρασίτου αφού το γονίδιο που κωδικοποιεί το rRNA της μικρής υπομονάδας της *Leishmania* έχει εξαιρετικά συντηρημένη δομή ανάμεσα στα διάφορα υποείδη που προκαλούν τη νόσο. Επομένως, για να δωθεί απάντηση στο ερώτημα κατά πόσο τα διαφορετικά ποσοστά εξάπλωσης της ασθένειας στους σκύλους και στον άνθρωπο οφείλονται σε διαφορετικά υποείδη του παρασίτου, είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός νέων εκκινητικών μορίων από περιοχή του DNA της *Leishmania* με μεγαλύτερα ποσοστά πολυμορφισμών ανάμεσα στα διάφορα υποείδη.

Τέλος, πρέπει να τονισθεί πως είναι πολύ πιθανό το ενδεχόμενο η διαφορά να μη βρίσκεται στον μολυσματικό παράγοντα, αλλά στον φορέα που μεταδίδει τη νόσο. Μπορεί δηλαδή το υποείδος που μεταδίδει την ασθένεια και στους σκύλους και στον άνθρωπο στην Ελλάδα, να είναι η *Leishmania infantum* αλλά το υποείδος της φλεβοτόμου σκνίπας να διαφέρει και να υπάρχει σε μεγαλύτερη αναλογία στη χώρα μας η φλεβοτόμος που προτιμά τον σκύλο για απομύζηση αίματος απ'ότι η φλεβοτόμος που προτιμάει τον άνθρωπο. Η υπόθεση αυτή άλλωστε ενισχύεται και από τις περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει στη χώρα μας σχετικά με την άνιση κατανομή της νόσου σε ζώα και στον άνθρωπο (για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τις μελέτες αυτές βλέπε: Χαραλαμπίδης -Παρασιτικά νοσήματα των ζώων και του ανθρώπου / Θέματα παρασιτολογίας που ενδιαφέρουν τη δημόσια υγεία στην Ελλάδα, 1993).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Κ. Τζανέτου, Λεισμανίαση. Τρέχουσες απόψεις για την επιδημιολογία, τα κλινικά σύνδρομα, τη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2005;22(3):239-253.
- Ε. Πολίτης, Γ. Κοντοχριστόπουλος, Δερματική Λεισμανίαση. Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ. 17:3 227-237, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Communicable diseases surveillance and response: geographical distribution. <http://www.who.int>
- Myler P; Fasel N. (2008). Leishmania: After the Genome. ISBN 978-1-904455-28-8.
- WHO. Leishmaniasis and Leishmania / HIV co-infection. WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1
- WHO-TDR. Leishmaniasis. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>
- WHO. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>.
- Α. Κανσουζίδου, Λεισμανίαση-Μία παλαιά νόσος με νέα δεδομένα. Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική, Περίοδος Β', Τόμος 11, Τεύχος 3, σελ. 112-126, 2006.
- [www.eveofscience.com /.../medizin/bsp5.html](http://www.eveofscience.com/.../medizin/bsp5.html)
- Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), Λεισμανίαση: Ερωτήσεις & Απαντήσεις για το κοινό. Μάιος 2007.
- G. Stamos, Parasitic Diseases RSS. International Journal for Parasitology. December, 2008.
- Γ. Στάμος, Μαθήματα Μικροβιολογίας για σπουδαστές Ιατρικών και Βιολογικών Εργαστηρίων. Ι.Ε.Κ Microbiology-Parasitology.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999, 354: 1191-1199.
- CDC, Division of Parasitic Diseases (DPDx). Leishmaniasis. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.
- Protozoologia. Protozoa Goldfus 1918.
- Κ. Καλλέργη, Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων από Λεισμάνια. The BioMeds Labs.
- Γ. Ι. Ρόζος, Κουνούπια- Σκνίπες: Αναμένεται έξαρση. Κυνηγεσία και Κυνοφιλία 2003.
- Κ. Νεόφυτος, Ενδοπαράσιτα. Kynagon Positive Dog Training; Stats 48, 246.
- www.pets.ar/doa/pervaidiatr/261102.htm
- Ι. Καλογερόπουλος, Λεισμανίαση με προσβολή του ΓΕΣ σε άνδρα με AIDS. Research and Clinical Forums 2002.
- Hepburn NC, Cutaneous Leishmaniasis. Clin Exp Dermatol 2000; 25:363-370.
- Lane, R.P. Phlebotomine sandflies. In: Manson's tropical diseases, 19th edition, Eds. P.E.C. Manson-Bahr & D.R. Bell, London, Bailliere Tindall, 1987, pp.1395-1404.
- Killick-Kendrick R. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann Parasitol Hum Comp 1990, 65(Suppl 1):37-42.
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev 1997, 10: 298-319.
- David John, Parasites, Parasitism and Host Relations, 2006.
- Magill AJ, GROGL M, Gasser RA, Sun W, Oster CN. Visceral infection caused by Leishmania tropica in veterans of Operation Desert Storm. N Engl J Med 1993, 328:1383-1387.
- www.vet.uqa.edu/...leishmania/eng/leish04.htm
- Leishmaniasis. In: Manson's tropical diseases. 18th ed. Bailliere Tindall, London,

1982:93–115.

- Patrick Woster- Chemistry of Antiparasetic Agents.
- Δελτίο Α' Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπ Αθηνών 2003, 50(1):48-52)
- Griffiths WD. Old world cutaneous leishmaniasis. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) The leishmaniasis in biology and medicine. Vol II. London, Academic Press, 1987:617–636.
- Al-Gindan Y, Omer Ah, Al-Humaidan Y, Petres W, Evans Da. A case of mucocutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia caused by *Leishmania major* and its response to treatment. Clin Exp Dermatol 1983, 8:185–188.
- Berman JD. US Food and Drug Administration approval of Ambisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis 1999, 28:49–51
- Giamarellou H., Aids and the skin: Parasitic Diseases. Clin Dermatol. 2000; 18:433-439
- Χαραλαμπίδης ΣΘ. Θέματα παρασιτολογίας που ενδιαφέρουν τη δημόσια υγεία στην Ελλάδα. University Studio Press, Θεσσαλονίκη (1993).
- Χαραλαμπίδης ΣΘ. Πρωτοζωολογία. 2η έκδ. University Studio Press, Θεσσαλονίκη (1998).
- Χαραλαμπίδης ΣΘ. Ανοσολογία Παρασιτώσεων. 2η έκδ. University Studio Press, Θεσσαλονίκη (1998).
- Sundar S, More Dk, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makhariaa et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. Clin Infect Dis 2000, 31:1104–1107
- Eldridge F. and John D. Edman, Medical Entomology: A textbook on Public Health and Veterinary Problems.
- Lawer P.G, Young D.G, New World Vectors of the Leishmaniasis, 1987. Pp.29-71 in K.F Harris Current Topics in Vector Research Vol.4 Springer-Verlag, New York.
- Killick-Kendrick R., The leishmaniasis in biology and medicine, 1987. Pp 941, Vol2, Clinical aspects and control. Academic Press. New York.
- Zeledon RA, Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations, 1996.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis 2002, 2: 494-501.
- Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe Cl, Beck Hp, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minixon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2003, 41:3147–3153
- Iliopoulou P., Tselentis Y., Urban Expansions in the Greater Athens Region and the spread of Zoonoses: The Case of Leishmaniasis 2007.
- Ρουμελιώτη Α., Φύλλα Κατάρτισης Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων 2007.
- Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NCM, Schoone GJ, Khalil EAG, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 1997, 35: 2454-2457.
- Cortes S, Rolao N, Ramada J, Campino I. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. Trans R Soc Trop Med Hyg 2004, 98: 12-17.
- Μεγάλη Διαδικτυακή Εγκυκλοπαίδεια Υγείας. Dermaline. Leishmaniasis.
- Arya SC. Enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of leishmaniasis in patients coinfecting with Human Immunodeficiency Virus. J Clin Microbiol 2002, 40: 3110.
- Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G-H, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous

- leishmaniasis. J Clin Microbiol 2002, 40: 1037-1043.
- Microbial Life Educational Resources- DNA extraction, created by George Rice, Montana State University.
 - Markoulatos P, Samara P, Marinakis G, Kaparos M, Fountoukidou P, Krikelis B, Spyrou N, Vamvakopoulos N. The polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of viral infections. Hellenic Virology 1996, 1: 83-88.
 - Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, 1988. Science 239: 487-91.
 - Rychlik W, Spenser WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, 1990. Nucl Acids Res 18: 6409-6412.
 - Persing: Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches. J Clin Microbiol 1991, 29:1281-1285.
 - Erlich H, Gelfand D, Sninsky J: Recent advances in the Polymerase chain reaction. Science 1991, 252: 1643-1650.
 - Markoulatos P, Kordossi A, Lambropoulou V, Moncany M. HIV related detection by polymerase chain reaction in seronegative multitransfused thalassemic patients, 1993. J. Virol Dis. 3: 50-60.
 - Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry, 2002. WH Freeman.
 - Robyt, John F. White, Bernard J. Biochemical Techniques Theory and Practice. Illinois: Waveland Press.
 - Crowe JS, Cooper HJ, Smith MA, Sims MJ, Parker D and Gewert D. Nucleic Acids Res. 1991.
 - Hadfield J. CRUK Cambridge Research Institute, Robinson Way. DNA ligation. 2009.
 - Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. Αρχές Ιατρικής Γενετικής.
 - www.chem.gr / Noukleinika oksea kai ProteinoSynthesi.
 - Transformation efficiency of *E.Coli* electroporated with large plasmid DNA, Focus, 2003.
 - Kalinski T, Jaquet K, Langen R, Wang L, Gabbert HE, Gerharz CD. An optimized electroporation protocol for transfection of sensitive cell lines using basic laboratory equipment, 2004. Biotechnology Techniques. Pp 717-722.
 - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. The Condensed Protocols From Molecular Cloning, 1989.
 - www.chem.uao.gr/courses/Undergraduate/Diatrofi
 - Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, 1977. J. Mol. Biol. 94 (3): 441-8.
 - Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA, 1980.
 - Russell P. 2002. iGenetics. Pearson Education, Inc., San Francisco, Pp 187-189.
 - Metzberg St. Sanger Method-Dideoxynucleotide Chain Termination <http://www.csun.edu/sanger.html>

