

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΤΗΣ ΓΑΤΑΣ  
ΑΠΟ *LEISHMANIA* SPP.

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Κ. ΧΑΤΖΗΣ, ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2014



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΤΗΣ ΓΑΤΑΣ  
ΑΠΟ *LEISHMANIA* SPP.**

**ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Κ. ΧΑΤΖΗΣ, ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΠΟΥ ΕΚΠΟΝΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ  
ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Αναπληρωτής Καθηγητής	Μ. Ν. Σαριδομιχελάκης	Επιβλέπων
Καθηγητής	Τ. Ράλλης	Μέλος της Επιτροπής
Καθηγητής	Λ. Λεοντίδης	Μέλος της Επιτροπής

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΤΗΣ ΓΑΤΑΣ  
ΑΠΟ *LEISHMANIA* SPP.**

**ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Κ. ΧΑΤΖΗΣ, ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Το έργο υλοποιήθηκε στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος  
«Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτήθηκε από την  
Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο-ΕΚΤ) και από εθνικούς  
πόρους**

*Στους γονείς μου  
Στους δασκάλους μου*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΑΓΓΛΙΚΟΙ ΟΡΟΙ.....	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΩΣΗ ΤΗΣ ΓΑΤΑΣ .....	12
1. Εισαγωγή.....	12
2. Αιτιολογία και επιδημιολογία.....	13
3. Παθογένεια, κλινική εικόνα και εργαστηριακά ευρήματα.....	17
4. Διάγνωση.....	21
5. Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	23
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ-ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ .....	24
Α) ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	24
Β) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	25
1. Αριθμός γατών, τόπος και χρόνος πραγματοποίησης της μελέτης και άδεια πειραματισμού.....	25
2. Κριτήρια συμμετοχής των γατών στη μελέτη .....	25
3. Λήψη του ιστορικού.....	26
4. Κλινική εξέταση.....	27
5. Δειγματοληψίες.....	28
6. PCR για την ανίχνευση του DNA και την ταυτοποίηση του είδους της <i>Leishmania</i> .....	31
7. Real-time PCR.....	32
8. Κυτταρολογικές εξετάσεις .....	33
9. Ορολογική εξέταση με τη μέθοδο IFAT για IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες έναντι της <i>Leishmania</i> spp.....	33
10. Ορολογική εξέταση με τη μέθοδο ELISA για IgG έναντι της <i>Leishmania</i> spp. ....	34
11. Αιματολογική εξέταση .....	35
12. Βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος.....	35
13. Ανάλυση ούρων.....	36
14. Ορολογικές εξετάσεις για FeLV, FIV, FCV, <i>T. gondii</i> και <i>Bartonella henselae</i> .....	37
15. Παρασιτολογική εξέταση κοπράνων.....	37
16. Διάφορες άλλες εργαστηριακές εξετάσεις στις γάτες της ομάδας Β.....	38
17. Στατιστική ανάλυση .....	39
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	42
1. Στοιχεία ταυτότητας των γατών, συνθήκες διαβίωσης, διάφορα άλλα στοιχεία από το ιστορικό και χρόνος εξέτασης.....	42

2. Συμπτώματα και διαγνώσεις στις γάτες της ομάδας B.....	45
3. Ταυτοποίηση του είδους της <i>Leishmania</i> .....	46
4. Συχνότητα μόλυνσης από <i>L. infantum</i> με βάση το αποτέλεσμα της PCR.....	46
5. Παρασιτικό φορτίο με βάση το αποτέλεσμα της real-time PCR.....	51
6. Κυτταρολογικές εξετάσεις .....	51
7. Ορολογικές εξετάσεις για IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες έναντι της <i>Leishmania spp.</i> ...	52
8. Αιματολογική εξέταση .....	56
9. Βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος.....	59
10. Ανάλυση ούρων.....	64
11. Ορολογικές εξετάσεις για FeLV, FIV, FCV, <i>T. gondii</i> και <i>B. henselae</i> .....	65
11. Παρασιτολογική εξέταση κοπράνων.....	67
12. Αποτελέσματα των υπόλοιπων εργαστηριακών εξετάσεων στις γάτες της ομάδας B..	67
Δ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
1. Γενικά σχόλια για το σχεδιασμό της μελέτης.....	69
2. Είδος <i>Leishmania</i> που ευθύνεται για τη μόλυνση της γάτας στη Θεσσαλία και τη Μακεδονία.....	71
3. Συχνότητα μόλυνσης της γάτας από <i>L. infantum</i> και παράγοντες που την επηρεάζουν .	72
4. Παρασιτικό φορτίο στις μολυσμένες γάτες και ο ρόλος τους ως δεξαμενή της <i>L. infantum</i> .....	76
5. Αρνητικό αποτέλεσμα των κυτταρολογικών εξετάσεων.....	80
6. Αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων για IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες έναντι της <i>Leishmania spp.</i> .....	81
7. Επιπτώσεις της μόλυνσης της γάτας από <i>L. infantum</i> .....	85
Ε) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	91
ΣΤ) ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ .....	93
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	94
SUMMARY .....	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	123

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΑΓΓΛΙΚΟΙ ΟΡΟΙ

**Α.Π.Θ.:** Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**Γ.Π.Α.:** Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Ε.Σ.Π.Α.:** Εθνικό Στρατηγικό Πλαίσιο Αναφοράς

**Π.Θ.:** Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Τ.Δ.Λ.:** Τυποποιημένη Διαδικασία Λειτουργίας του Διαγνωστικού Εργαστηρίου της Παθολογικής Κλινικής, του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Π.Θ.

**ALP** (Alkaline Phosphatase): αλκαλική φωσφατάση

**ALT** (Alanine Aminotransferase): αλανινο-αμινοτρανσφεράση

**AST** (Aspartate Aminotransferase): ασπαρτική αμινοτρανσφεράση

**bp** (base pairs): ζεύγη βάσεων

**BUN** (Blood Urea Nitrogen): άζωτο ουρίας στο αίμα

**CI** (Confidence Interval): διάστημα εμπιστοσύνης

**CK** (Creatine Kinase): κρεατινική κινάση

**DNA** (Deoxyribonucleic Acid): δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

**DTM** (Dermatophyte test medium): υπόστρωμα για καλλιέργεια δερματοφύτων

**EDTA** (Ethylenediaminetetraacetic acid): αιθυλενο-διάμινο-τετραοξεϊκό οξύ

**ELISA** (Enzyme-linked Immunosorbent Assay): ενζυμική ανοσοαπορρόφηση

**FCV** (Feline Coronavirus): κορωναϊός της γάτας

**FeLV** (Feline Leukemia Virus): ιός της λευχαιμίας της γάτας

**FIP** (Feline Infectious Peritonitis): λοιμώδης περιτονίτιδα της γάτας

**FIV** (Feline Immunodeficiency Virus): ιός της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας της γάτας

**γ-GT** (Gamma-Glutamyl Transferase): γάμμα-γλουταμυλο-τρανσφεράση

**IFAT** (Indirect Immunofluorescence Antibody Testing): έμμεσος ανοσοφθορισμός

**Nested PCR** (Nested Polymerase Chain Reaction): εστιασμένη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

**OD** (optical density): οπτική πυκνότητα

**OR** (Odds Ratio): σχετικός λόγος πιθανοτήτων

**PBS** (Phosphate Buffer Saline): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

**ROC curve:** καμπύλη λειτουργικών χαρακτηριστικών

**PCR** (Polymerase Chain Reaction): αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

**R<sub>0</sub>** (basic reproduction number): βασικός ρυθμός αναπαραγωγής

**Real-time PCR** (Real-time Polymerase Chain Reaction): αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αληθούς χρόνου

**Rpm** (Rounds per minute): στροφές ανά λεπτό

**SD** (Standard Deviation): τυπική απόκλιση

**w/v** (weight/volume): βάρος/όγκο



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η λεισμανίωση που οφείλεται στη *Leishmania infantum* (συν. *L. chagasi*) είναι ένα από τα συχνότερα νοσήματα του σκύλου στην Ελλάδα, τις υπόλοιπες μεσογειακές χώρες, την Πορτογαλία και τις χώρες της Λατινικής Αμερικής. Οι γάτες που ζουν στις παραπάνω περιοχές μολύνονται από το πρωτόζωο χωρίς συνήθως να εμφανίζουν συμπτώματα της νόσου. Ωστόσο, οι μολυσμένες γάτες ενδέχεται να μεταδίδουν τη *L. infantum* στους φλεβοτόμους και κατά συνέπεια να αποτελούν δεξαμενή του παρασίτου και όχι τυχαίο ξενιστή.

Η έρευνα αυτή, που αποτελεί το αντικείμενο της διδακτορικής μου διατριβής, πραγματοποιήθηκε στην Παθολογική Κλινική, του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Π.Θ. από τον Ιούλιο του 2008 μέχρι τον Ιανουάριο του 2014, σε μια προσπάθεια για περαιτέρω διερεύνηση της επιδημιολογίας και της κλινικής σημασίας της μόλυνσης της γάτας από *Leishmania* spp.

Στη σημείο αυτό θέλω να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και συγκεκριμένα:

τον κ. Μανώλη Σαριδομιχελάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή της Παθολογίας των Ζώων Συντροφιάς στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Π.Θ. και επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής, ο οποίος εκτός από την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή της συνεργασίας μας και την ανεκτίμητη επιστημονική καθοδήγησή του, μου συμπαραστάθηκε σαν φίλος και δάσκαλος αμέριστα και από κάθε άποψη σε αυτή μου την προσπάθεια,

τον κ. Λεωνίδα Λεοντίδη, Καθηγητή της Επιδημιολογίας στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Π.Θ., για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του στο σχεδιασμό της μελέτης, τη στατιστική επεξεργασία και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων,

τον κ. Αλέξανδρο Κουτίνα, Καθηγητή της Παθολογίας των Ζώων Συντροφιάς στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για την ουσιαστική συμβολή του στο σχεδιασμό της μελέτης και τη γενικότερη στήριξή του την περίοδο που ήταν μέλος της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και συγκεκριμένα από την έναρξη της διατριβής μέχρι το 2011 που συνταξιοδοτήθηκε,

τον κ. Τιμολέοντα Ράλλη, Καθηγητή της Παθολογίας των Ζώων Συντροφιάς στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για την προθυμία του να αντικαταστήσει τον κ.

Αλέξανδρο Κουτίνα ως μέλος της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και για τη γενικότερη επιστημονική στήριξή του.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά:

τον κ. Παναγιώτη Ξενούλη, Διδάκτορα και Πανεπιστημιακό Υπότροφο της Παθολογικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., ο οποίος εξασφάλισε τα 75 δείγματα ορού αίματος από γάτες που ζούσαν σε περιοχή των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής όπου η λείσμανίωση από *L. infantum* δεν είναι ενδημική,

την κ. Λαμπρινή Αθανασίου, Επίκουρη Καθηγήτρια της Κτηνιατρικής Γενικής Παθολογίας στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Π.Θ., για την πολύτιμη βοήθειά της στην εκτέλεση των ορολογικών εξετάσεων με τη μέθοδο IFAT,

τον κ. Ηλία Παπαδόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή της Παρασιτολογίας και Παρασιτικών Νοσημάτων στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για την πολύτιμη βοήθειά του στην εκτέλεση των ορολογικών εξετάσεων με τη μέθοδο ELISA,

τον κ. Ιωάννη Οικονομόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή της Υγιεινής Αγροτικών Ζώων στο Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γ.Π.Α., για την ανεκτίμητη επιστημονική του καθοδήγηση στην εκτέλεση των μοριακών εξετάσεων,

την κ. Μαργαρίτα Ανδρεάδου, υποψήφια Διδάκτορα στο Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γ.Π.Α., για την πολύτιμη βοήθειά της στην εκτέλεση των μοριακών εξετάσεων,

τον κ. Ματθαίο Μυλωνάκη, Επίκουρο Καθηγητή της Παθολογίας των Ζώων Συντροφιάς στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για τη συμβολή του στην επιλογή της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη δειγμάτων μυελού των οστών και για τη βοήθειά του στη ένταξη στη μελέτη και τη δειγματοληψία από γάτες που προσκομίζονταν στην Κλινική των Ζώων Συντροφιάς του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ.,

τον κ. Χαράλαμπο Βερβερίδη, Επίκουρο Καθηγητή της Μαιευτικής και Παθολογίας Αναπαραγωγής των Ζώων Συντροφιάς στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για τη βοήθειά του στη ένταξη γατών στη μελέτη,

την κ. Ζώη Σοφία, υποψήφια Διδάκτορα στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Π.Θ. και τον κ. Γκουγκουλή Δημήτριο, Διδάκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για τη συμβολή τους στην ένταξη μεγάλου αριθμού γατών στη μελέτη και για τη βοήθειά τους κατά τις δειγματοληψίες,

τον κ. Απόστολο Γαλάτο, Αναπληρωτή Καθηγητή της Χειρουργικής και Αναισθησιολογίας των Ζώων στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Π.Θ., για την καθοριστική συμβολή του στην επιλογή των πρωτοκόλλων χημικής συγκράτησης,

τον κ. Ιωάννη Παπά, Αναπληρωτή Καθηγητή της Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Π.Θ., για τη βοήθειά του στην επεξεργασία των δειγμάτων που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τις μοριακές εξετάσεις,

τους κ. Δημήτριο Κασαμπαλή, Κοσμά Αποστολίδη και Δημήτριο Μπαλωμένο, υποψήφιους Διδάκτορες του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., η βοήθεια των οποίων κατά τις δειγματοληψίες ήταν ουσιαστική,

τον κ. Θεόδωρο Πετανίδη, Λέκτορα της Παθολογίας των Ζώων Συντροφιάς στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Π.Θ., για την σημαντική βοήθειά του στις δειγματοληψίες, και για την συνεχή ενθάρρυνση κατά τη διάρκεια της διατριβής,

τις κ. Ελένη Ντότσικα και Όλγα Κουτσόνη, του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς για τη Λεϊσμανίωση, Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, για την προμήθεια των προμαστιγοφόρων του Ελληνικού στελέχους της *L. infantum* MHOM/GR/78/L4A που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνο για τις ορολογικές εξετάσεις IFAT και ELISA,

τους μετεκπαιδευόμενους Κτηνιάτρους, τους φοιτητές και το υπόλοιπο προσωπικό της Παθολογικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για την βοήθειά τους στις δειγματοληψίες,

το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», Ε.Σ.Π.Α.- Ηράκλειτος ΙΙ, για την υποτροφία που μου χορήγησε μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου και από την οποία καλύφθηκαν τα έξοδα της διατριβής.

Ευχαριστώ βαθύτατα και εκφράζω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για την άνευ όρων υποστήριξη, υπομονή και πίστη τους στο πρόσωπό μου όλα τα χρόνια, από την έναρξη των σπουδών μου μέχρι σήμερα. Τέλος, χωρίς τη συμπαράσταση και την ψυχολογική στήριξη της συζύγου μου, Χρυσάνθης-Μαρίας Νέρου, η ολοκλήρωση αυτού του έργου θα ήταν αβέβαιη.

## ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΩΣΗ ΤΗΣ ΓΑΤΑΣ

Η βιβλιογραφική αυτή ανασκόπηση στηρίζεται στη δημοσίευση «Η λεϊσμανιώση της γάτας που οφείλεται στη *Leishmania infantum* (συν. *L. chagasi*)»: Μ. Χατζής, Μ.Ν. Σαριδομιχελάκης, Α.Φ. Κουτίνας, Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας 2010, 61 (4): 359-367, στο κείμενο της οποίας προστέθηκαν όσα καινούρια στοιχεία προέκυψαν στη χρονική περίοδο που μεσολάβησε από τη συγγραφή της δημοσίευσης μέχρι σήμερα.

### 1. Εισαγωγή

Οι λεϊσμανιώσεις του ανθρώπου και των ζώων προκαλούνται από 20 περίπου είδη πρωτόζωων του γένους *Leishmania* που μεταδίδονται, κατά κύριο λόγο, με τα νύγματα των θηλυκών σκνιπών που ανήκουν στα γένη *Phlebotomus* και *Lutzomyia* (Ashford, 2000; Bañuls et al., 2007). Τα παράσιτα αυτά μπορούν να μολύνουν και να προκαλέσουν τη νόσο στον άνθρωπο, που ανάλογα με την κλινική της εικόνα, διακρίνεται σε δερματική, βλεννογονοδερματική και σπλαχνική (Ashford, 2000). Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ζωικά είδη, περισσότερο συχνές και καλύτερα μελετημένες είναι οι λεϊσμανιώσεις του σκύλου, που οφείλονται σε 10 διαφορετικά είδη *Leishmania* (*L. infantum*-συν. *L. chagasi*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. arabica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. colombiensis*), από τα οποία βέβαια ιδιαίτερη σημασία για τις μεσογειακές χώρες έχει η *L. infantum* (Saridomichelakis, 2009). Παρά το σχετικά περιορισμένο αριθμό μελετών, είναι γνωστό ότι και οι γάτες μπορούν να μολυνθούν από οκτώ τουλάχιστον είδη του γένους *Leishmania* (*L. infantum*-συν. *L. chagasi*, *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* και *L. panamensis*), που συνήθως είναι ίδια με εκείνα που ευθύνονται για τη μόλυνση του ανθρώπου και του σκύλου στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή (Craig et al., 1986; Morsy and Abou el Seoud, 1994; Bonfante-Garrido et al., 1996; Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Schubach et al., 2004; Grevot et al., 2005; Ayllon et al., 2008; da Silva et al., 2008; Sarkari et al., 2009; Souza et al., 2009; Coelho et al., 2010; Hatam et al., 2010; Trainor et al., 2010; Coelho et al., 2011b; Sherry et al., 2011; Vides et al., 2011; Ayllón et al., 2012; Pennisi et al., 2013). Όπως και στο σκύλο, ιδιαίτερη σημασία για

τις μεσογειακές χώρες έχει η μόλυνση από τη *L. infantum* (Ayllón et al., 2012; Pennisi et al., 2013) που, αν και τις περισσότερες φορές είναι ασυμπτωματική, φαίνεται ότι είναι αρκετά συχνή, γεγονός που εγείρει υποψίες για τον πιθανό ρόλο της γάτας ως δεξαμενής του πρωτόζωου στη φύση (Mancianti, 2004; Maroli et al., 2007; Maia and Campino, 2011).

## **2. Αιτιολογία και επιδημιολογία**

Επειδή στις περισσότερες κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες για τη μόλυνση της γάτας από τη *Leishmania* spp. δεν έχει ταυτοποιηθεί το υπεύθυνο είδος του πρωτόζωου, αναγκαστικά και ίσως αυθαίρετα αυτό ταυτίζεται με το συχνότερο ή το μοναδικό είδος που απομονώνεται από τον άνθρωπο ή/και το σκύλο στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή. Η φυσική όμως μόλυνση της γάτας από τη *L. infantum* (ή την ταυτόσημη με αυτή *L. chagasi*) έχει αποδειχθεί σε χώρες της Ευρώπης (Ιταλία, Ελβετία, Γαλλία, Ισπανία, Πορτογαλία), της Λατινικής Αμερικής (Βραζιλία) και της Ασίας (Ιράν) (Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Grevot et al., 2005; Ayllon et al., 2008; da Silva et al., 2008; Sarkari et al., 2009; Hatam et al., 2010; Pennisi et al., 2013). Στις περισσότερες περιπτώσεις υπεύθυνος ζυμότυπος είναι ο MON-1, που άλλωστε κυριαρχεί στους ανθρώπους και τους σκύλους στις μεσογειακές, τουλάχιστον, χώρες, ενώ έχουν διαπιστωθεί και περιπτώσεις μόλυνσης από λιγότερο συχνούς ζυμότυπους της *L. infantum*, όπως είναι οι MON-72 και MON-201 (Gramiccia et al., 2005; Grevot et al., 2005; Maroli et al., 2007).

Η επιδημιολογική σημασία της μόλυνσης της γάτας από τη *L. infantum* παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη, λόγω του μικρού αριθμού των σχετικών μελετών και των ελάχιστων ερευνητικών δεδομένων αναφορικά με την ικανότητα των μολυσμένων γατών να μεταδίδουν το πρωτόζωο στους φλεβοτόμους (Maroli et al., 2007; da Silva et al., 2010; Maia and Campino, 2011; Pennisi et al., 2013).

Οι επιδημιολογικές μελέτες, που βασίστηκαν κυρίως σε κλινικά υγιείς γάτες, αφορούσαν: α) στη συχνότητα της μόλυνσης με βάση τις μοριακές τεχνικές όπως η PCR, β) τη συχνότητα της μόλυνσης με την άμεση ανίχνευση του παρασίτου (κυτταρολογική, ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοπαθολογική εξέταση, καλλιέργεια), και γ) τη συχνότητα παρουσίας ειδικών αντισωμάτων με βάση τις ορολογικές εξετάσεις (IFAT, ELISA, άμεση αιμοσυγκόλληση, ανοσοαποτύπωση κατά Western). Η μεθοδολογία που επιλέχθηκε κάθε φορά επηρέασε σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα, γεγονός που εξηγεί τις διαφορές που καταγράφονται ανάμεσα σε

μελέτες που έχουν γίνει ακόμα και στην ίδια γεωγραφική περιοχή. Με βάση την PCR, η συχνότητα μόλυνσης της γάτας που έχει καταγραφεί είναι 60,6% στην Ιταλία, 0,4-26% στην Ισπανία, 0,3-30,4% στην Πορτογαλία, 25-80% στη Βραζιλία και 10% στο Ιράν (Pennisi, 2002; Martín-Sánchez et al., 2007; Ayllon et al., 2008; Maia et al., 2008; Paludo et al., 2008; Tabar et al., 2008; Hatam et al., 2010; Maia et al., 2010; Millán et al., 2011; Sherry et al., 2011; Ayllón et al., 2012; de Morais et al., 2012; Vilhena et al., 2013). Επειδή στις παραπάνω μελέτες χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα (μικρό παρασιτικό φορτίο) και ο έλεγχος για την παρουσία του DNA του παρασίτου έγινε με κλασική PCR (που ενδέχεται να μην είναι η περισσότερο ευαίσθητη μοριακή εξέταση) (Francino et al., 2006), η συχνότητα μόλυνσης της γάτας είναι πιθανότατα μεγαλύτερη και ενδεχομένως συγκρίσιμη με εκείνη του σκύλου (Saridomichelakis, 2009; Maia and Campino, 2011). Όταν όμως επιχειρήθηκε η άμεση ανίχνευση του παρασίτου, η συχνότητα της μόλυνσης βρέθηκε να είναι σημαντικά μικρότερη, όπως για παράδειγμα 0% στην Ιταλία (ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοπαθολογική εξέταση σε διάφορους ιστούς), 0,57% στην Ισπανία (ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοπαθολογική εξέταση στο δέρμα και τους οφθαλμούς) και 0-9,9% στη Βραζιλία (κυτταρολογική εξέταση από το ήπαρ, το σπλήνα, τα λεμφογάγγλια, το μυελό των οστών και το δέρμα) (Simões-Mattos et al., 2004; Bresciani et al., 2010; Costa et al., 2010; Navarro et al., 2010; Coelho et al., 2011b; Sobrinho et al., 2012). Η παραπάνω διαφορά, αν και κατά κύριο λόγο οφείλεται στη σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία της PCR, πιθανότατα αντανακλά το σχετικά μικρό παρασιτικό φορτίο στα διάφορα όργανα των μολυσμένων γατών (Saridomichelakis, 2009; de Morais et al., 2012). Τέλος, τα αποτελέσματα των ορολογικών επιδημιολογικών μελετών ποικίλλουν δραματικά, με ποσοστά 3,9% για την Ελλάδα, 0,9-68% για την Ιταλία, 0-12,7% για την Γαλλία, 1,3-60% για την Ισπανία, 0,6-17,4% για την Πορτογαλία, 22,1% για το Μεξικό, 25% για την Ονδούρα, 0-50,5% για την Βραζιλία, 6,7% για το Ισραήλ και 20-25% για το Ιράν (Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Ramos et al., 2002; Solano-Gallego et al., 2003; Simões-Mattos et al., 2004; Vita et al., 2005; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007; Ayllon et al., 2008; da Silva et al., 2008; Maia et al., 2008; Nasereddin et al., 2008; Diakou et al., 2009; Figueiredo et al., 2009; Sarkari et al., 2009; Bresciani et al., 2010; Cardoso et al., 2010; Duarte et al., 2010; Maia et al., 2010; McCown and Grzeszak, 2010; Coelho et al., 2011a; da Silveira Neto et al., 2011; Sherry et al., 2011; Ayllón et al., 2012; Longoni et al., 2012; Sobrinho et al., 2012; Cardia et al., 2013). Ορισμένα από

τα παραπάνω αποτελέσματα δίνουν την εντύπωση ότι η συχνότητα της οροθετικότητας μπορεί να είναι παρόμοια, αν όχι μεγαλύτερη, από εκείνη της μόλυνσης που βασίζεται στο αποτέλεσμα της PCR. Επισημαίνεται όμως ότι σε όλες σχεδόν τις επιδημιολογικές μελέτες στις οποίες η συχνότητα της οροθετικότητας ήταν υψηλή, το όριο διαχωρισμού επιλέχθηκε αυθαίρετα και ταυτόχρονα ήταν σχετικά μικρό (π.χ. 1/10-1/20 για την IFAT), ώστε να δημιουργούνται υποψίες για ψευδώς-θετικά αποτελέσματα και υπερεκτίμηση της συχνότητας της οροθετικότητας. Αντίθετα, όταν το όριο διαχωρισμού καθορίστηκε με επιστημονικά αποδεκτό τρόπο, η συχνότητα του θετικού αποτελέσματος ήταν μόλις 5,3-6,3% (Solano-Gallego et al., 2007). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι με τα μέχρι σήμερα δεδομένα δε φαίνεται να υπάρχει συσχετισμός μεταξύ του θετικού αποτελέσματος της PCR και των ορολογικών εξετάσεων (Pennisi, 2002; Ayllon et al., 2008) και ότι το αποτέλεσμα των τελευταίων συχνά εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις, ακόμα και στο ίδιο ζώο, στη διάρκεια του χρόνου (Vita et al., 2005).

Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται ότι οι γάτες που ζουν σε περιοχές στις οποίες ενδημεί η λείσμανίωση του σκύλου, μολύνονται συχνά από τη *L. infantum* χωρίς όμως τις περισσότερες φορές να εκδηλώνουν συμπτώματα ή να παράγουν ειδικά αντισώματα σε υψηλούς τουλάχιστον τίτλους (Pennisi, 2002; Maia and Campino, 2011). Τα αποτελέσματα των περισσότερων επιδημιολογικών μελετών δείχνουν ότι η πιθανότητα μόλυνσης ή/και οροθετικότητας δεν εξαρτάται από το φύλο, τη φυλή και την ηλικία των γατών, την εποχή του χρόνου, την περιοχή και τη διαβίωση σε εσωτερικούς ή/και σε εξωτερικούς χώρους, την έκθεση των γατών σε εξωπαράσιτα, την εφαρμογή προληπτικής αντιπαρασιτικής αγωγής, τη γενική κατάσταση της υγείας και τη μόλυνση από τους ιούς της λευχαιμίας (FeLV), της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (FIV) και της λοιμώδους περιτονίτιδας (FIP) καθώς και από το *Toxoplasma gondii* (Pennisi, 2002; Vita et al., 2005; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007; Ayllon et al., 2008; Nasereddin et al., 2008; Tabar et al., 2008; Diakou et al., 2009; Sarkari et al., 2009; Cardoso et al., 2010; Duarte et al., 2010; Coelho et al., 2011a; Sherry et al., 2011; Ayllón et al., 2012; Sobrinho et al., 2012). Σε μικρό όμως αριθμό ερευνών έχει διαπιστωθεί ότι: α) η πιθανότητα μόλυνσης είναι μεγαλύτερη στις αρσενικές, τις μεγαλύτερες των 2 ετών (Pennisi, 2002) ή μικρότερες των 5 ετών (Tabar et al., 2008) και τις μολυσμένες από FeLV γάτες (Sherry et al., 2011) και β) η συχνότητα της οροθετικότητας είναι μεγαλύτερη στις αρσενικές, τις γάτες με ηλικία μεγαλύτερη των 2 ετών (Cardoso et al., 2010), τις

αδέσποτες γάτες (Vita et al., 2005), σε εκείνες που ζουν σε μεγάλο υψόμετρο (Nasereddin et al., 2008) ή σε αγροτικές περιοχές (Cardoso et al., 2010) και τις μολυσμένες από FeLV γάτες (Sherry et al., 2011).

Ο τρόπος που μολύνεται η γάτα από τη *L. infantum* δεν έχει μελετηθεί αρκετά, αλλά θεωρείται σχεδόν βέβαιο ότι η μετάδοση γίνεται με τα νύγματα των φλεβοτόμων. Υπέρ της άποψης αυτής συνηγορούν η ανίχνευση αίματος γάτας στον πεπτικό σωλήνα θηλυκών φλεβοτόμων (*Phlebotomous perniciosus*, *P. langeroni*, *Lutzomyia longipalpis*) που συλλέχθηκαν στη φύση και αποτελούν αποδεδειγμένους μεταδότες της *L. infantum* και το θετικό αποτέλεσμα της πειραματικής έκθεσης γατών στα νύγματα των αιματοφάγων αυτών εντόμων (el Sawaf et al., 1989; Ogusuku et al., 1994; De Colmenares et al., 1995; Pennisi, 2002; Simões-Mattos et al., 2004; Maroli et al., 2007; da Silva et al., 2008; Nasereddin et al., 2008; da Silva et al., 2010). Αν και δεν υπάρχουν αρκετά επιστημονικά δεδομένα, φαίνεται επίσης ότι οι μολυσμένες γάτες μπορούν με τη σειρά τους να μεταδώσουν το πρωτόζωο στους φλεβοτόμους, επειδή: α) η *L. infantum* μπορεί να ανιχνευθεί στο περιφερικό τους αίμα, β) το πρωτόζωο παρασιτεί το δέρμα, τουλάχιστον στα σημεία εκείνα που παρουσιάζουν δερματικές αλλοιώσεις, και γ) η έκθεση μιας φυσικά μολυσμένης γάτας στον *P. perniciosus* μόλυνε το 21% των εντόμων που ένυξαν το ζώο ενώ σε μια άλλη γάτα από τη Βραζιλία το αντίστοιχο ποσοστό για τη *Lutzomyia longipalpis* ήταν 13,1% (Maroli et al., 2007; Martín-Sánchez et al., 2007; Tabar et al., 2008; Marcos et al., 2009; da Silva et al., 2010; Navarro et al., 2010).

Όλα τα παραπάνω ευρήματα αναφορικά με τη συχνότητα της μόλυνσης και τη μετάδοση της *L. infantum* στη γάτα, ενδεχομένως λόγω του αποσπασματικού και συχνά αντιφατικού τους χαρακτήρα, έχουν δημιουργήσει διχογνωμία στην παγκόσμια επιστημονική κοινότητα αναφορικά με τον ακριβή ρόλο του ζωικού αυτού είδους στην επιδημιολογία της λεισμανίωσης του σκύλου και του ανθρώπου (Kirkpatrick et al., 1984; Poli et al., 2002; Solano-Gallego et al., 2007). Γενικά, στα μεταδοτικά νοσήματα, ένας ξενιστής θεωρείται «πρωτογενής δεξαμενή» του μολυσματικού παράγοντα όταν από μόνος του μπορεί να διατηρήσει τον κύκλο μετάδοσης στη φύση. Αντίθετα ένας ξενιστής που αποτελεί «δευτερογενή δεξαμενή», αν και δε μπορεί από μόνος του να διατηρήσει τον κύκλο μετάδοσης, αυξάνει το ρυθμό μετάδοσης του μολυσματικού παράγοντα. Τέλος οι «τυχαίοι ξενιστές» μολύνονται σποραδικά αλλά συνήθως δε μεταδίδουν τον τελευταίο (Quinnell and Courtenay, 2009). Στην περίπτωση της *L. infantum* είναι γνωστό ότι η μόνη «πρωτογενής



δεξαμενή» είναι ο σκύλος (Baneth et al., 2008) με  $R_0$  που κυμαίνεται από 1,11-1,21 στη Γαλλία (Keck and Dereure, 2003), 5,9-9 στη Βραζιλία (Quinnell et al., 1997; Quinnell and Courtenay, 2009) και 11 στη Μάλτα (Dye et al., 1992). Αν και στην περίπτωση της γάτας ο  $R_0$  είναι άγνωστος, οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούν ότι το ζωικό αυτό είδος αποτελεί μάλλον δεξαμενή και όχι «τυχαίο ξενιστή» του παρασίτου, στηριζόμενοι: α) στη σχετικά μεγάλη συχνότητα μόλυνσης, β) στο γεγονός ότι οι γάτες παραμένουν μολυσμένες για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν αυτοϊαθούν, λάβουν θεραπεία ή πεθάνουν, γ) στην παρουσία του παρασίτου στις δερματικές αλλοιώσεις και το περιφερικό αίμα των ασθενών ζώων, και δ) στο γεγονός ότι οι φλεβοτόμοι-μεταδότες νήσουν τις γάτες και μπορούν να μολυνθούν από αυτές (De Colmenares et al., 1995; Pennisi, 2002; Bongiorno et al., 2003; Mancianti, 2004; Maroli et al., 2007; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007; Tabar et al., 2008; Marcos et al., 2009; Hatam et al., 2010; Maia et al., 2010; Navarro et al., 2010; Maia and Campino, 2011; Longoni et al., 2012).

### **3. Παθογένεια, κλινική εικόνα και εργαστηριακά ευρήματα**

Για το σκύλο είναι γνωστό ότι η ανθεκτικότητα (ασυμπτωματικοί φορείς) ή η ευαισθησία (άρρωστα ζώα) στη *L. infantum* εξαρτάται από τις επαναλαμβανόμενες μολύνσεις, την έγχυση του σάλιου των φλεβοτόμων στο δέρμα, τη λοιμογόνο ισχύ του πρωτόζωου, το γενετικό υπόστρωμα του ξενιστή, την ενεργοποίηση της κυτταρικής ή/και της χυμικής ανοσίας, την παραγωγή κυτταροκινών και τα διάφορα νοσήματα ή παθήσεις που ενδέχεται να συνυπάρχουν (Saridomichelakis, 2009). Για τη γάτα δυστυχώς, δεν υπάρχουν παρά μόνο ελάχιστα αντίστοιχα δεδομένα. Τα αποτελέσματα των πειραματικών μολύνσεων, σε συνδυασμό με την πολύ μικρή συχνότητα της νόσου σε σύγκριση με τη συχνότητα της μόλυνσης (Kirkpatrick et al., 1984; Pennisi, 2002; Simões-Mattos et al., 2004; Martín-Sánchez et al., 2007; Tabar et al., 2008; Maia et al., 2010), δείχνουν ότι κατά κανόνα το γενετικό υπόστρωμα της γάτας ευνοεί την ανθεκτικότητα στη *L. infantum* (Mancianti, 2004; Solano-Gallego et al., 2007; Pennisi et al., 2013). Η υπόθεση αυτή ισχυροποιείται και από την πολύ μικρή συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων στον ορό των μολυσμένων γατών (Vita et al., 2005; Maia et al., 2010), σε αντίθεση με τους σκύλους, στους οποίους η διέγερση της χυμικής ανοσίας έχει συνδεθεί με αυξημένη ευαισθησία (Saridomichelakis, 2009). Το παρασιτικό φορτίο, τουλάχιστον στο δέρμα και τους οφθαλμούς, των συμπτωματικών γατών άλλοτε είναι μικρό, προφανώς λόγω της

αποτελεσματικότητας της κυτταρικής ανοσίας, ενώ άλλοτε είναι μεγάλο και μάλιστα παρά τα πολυάριθμα μακροφάγα, που εφόσον το ζώο ήταν ανθεκτικό θα έπρεπε να είχαν εξουδετερώσει τα παράσιτα (Navarro et al., 2010; Pennisi et al., 2013). Είναι λοιπόν προφανές, ότι αν και οι περισσότερες γάτες έχουν κάποιο βαθμό φυσικής ανοσίας, ορισμένες είναι ευαίσθητες στη νόσο. Στους παράγοντες που έχουν κατά καιρούς θεωρηθεί υπεύθυνοι για την ευαισθησία αυτή περιλαμβάνονται η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών και κυτταροστατικών φαρμάκων και η μόλυνση από τον FeLV ή τον FIV (Leiva et al., 2005; Pennisi, 2006; Maroli et al., 2007; Vides et al., 2011; Pennisi et al., 2013).

Μέχρι σήμερα δεν έχει διαπιστωθεί προδιάθεση ως προς την ηλικία, το φύλο ή τη φυλή (τα περισσότερα περιστατικά αφορούσαν στην κοινή ευρωπαϊκή φυλή), με τις περισσότερες ασθενείς γάτες να έχουν πρόσβαση σε εξωτερικό περιβάλλον ή να ζουν συνέχεια έξω από το σπίτι (Hervás et al., 1999; Hervás et al., 2001; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Grevot et al., 2005; Marcos et al., 2009; Navarro et al., 2010; Pennisi et al., 2013).

Ενώ μεγάλος αριθμός συμπτωμάτων, παθολογικών καταστάσεων και εργαστηριακών ευρημάτων έχει κατά καιρούς αποδοθεί στη λειψμανίωση της γάτας (Ozon et al., 1998; Mancianti, 2004; Grevot et al., 2005; Ayllon et al., 2008; Navarro et al., 2010; Pennisi et al., 2013), η απλή διαπίστωσή τους στις μολυσμένες από *L. infantum* γάτες δεν αρκεί για να αποδείξει τη σχέση μεταξύ αιτίου και αιτιατού αφού μπορεί να οφείλονται σε άλλα νοσήματα ή παθήσεις που ενδεχομένως συνυπάρχουν (Saridomichelakis, 2009; Pennisi et al., 2013). Για να αποδειχθεί αυτό πρέπει: α) να αποκλειστούν όλα τα υπόλοιπα νοσήματα και παθήσεις που μπορούν να δώσουν παρόμοια συμπτώματα ή εργαστηριακά ευρήματα, β) τα ευρήματα της ιστοπαθολογικής εξέτασης να είναι ανάλογα με εκείνα της λειψμανίωσης του σκύλου ή του ανθρώπου, γ) να βρεθεί η *L. infantum* (ανοσοϊστοχημική εξέταση, άμεσος ανοσοφθορισμός, μοριακές εξετάσεις) στα προσβεβλημένα όργανα και ιστούς και δ) να υποχωρήσουν τα συμπτώματα ή/και τα εργαστηριακά ευρήματα με την ειδική αντιλειψμανιακή θεραπεία. Δυστυχώς, σε λίγα μόνο περιστατικά συντρέχουν οι παραπάνω προϋποθέσεις (Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; Pennisi et al., 2004; Leiva et al., 2005; Rüfenacht et al., 2005; Navarro et al., 2010), με αποτέλεσμα η ακριβής κλινική και εργαστηριακή εικόνα της νόσου να παραμένει άγνωστη.

Τα συμπτώματα της λειψμανίωσης της γάτας προέρχονται συχνότερα από το δέρμα (65-93%) και τους οφθαλμούς (33%) και σπανιότερα από τα διάφορα

εσωτερικά όργανα (7-17%) (Ozon et al., 1998; Mancianti, 2004; Simões-Mattos et al., 2004; Pennisi, 2006; Maroli et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007; Ayllon et al., 2008; Navarro et al., 2010; Vides et al., 2011; Pennisi et al., 2013). Οι συχνότερες δερματικές αλλοιώσεις είναι τα έλκη (25-33%) και τα οζίδια (40%) (Pennisi et al., 2004; Simões-Mattos et al., 2004; Sobrinho et al., 2012; Pennisi et al., 2013). Τα έλκη εντοπίζονται στην κεφαλή (βλεννογονοδερματικά όρια, επιρρίνιο, πρόσωπο, πτερύγια των αυτιών) και λιγότερο συχνά στις οστέινες προεξοχές, τα άκρα και το θώρακα (Hervás et al., 1999; Hervás et al., 2001; Pennisi, 2002; Grevot et al., 2005; Coelho et al., 2010; Vides et al., 2011). Οι αλλοιώσεις αυτές συνήθως είναι μονήρεις, μερικές φορές συνοδεύονται από γενικευμένη αλωπεκία και εφελκιδοποίηση, ενώ στην ιστοπαθολογική τους εξέταση μπορεί να διαπιστωθεί διάχυτη κοκκιωματώδης φλεγμονή και μέτριος αριθμός παρασίτων (Pennisi, 2002; Navarro et al., 2010). Τα δερματικά οζίδια συχνότερα είναι πολλαπλά, μερικές φορές εξελκωμένα και εντοπίζονται στο επιρρίνιο και τα πτερύγια των αυτιών και λιγότερο συχνά στα βλεννογονοδερματικά όρια (χείλη, βλέφαρα, πρωκτός), τα άκρα και την ουρά (Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Savani et al., 2004; Simões-Mattos et al., 2004; Rüfenacht et al., 2005; Navarro et al., 2010). Στην ιστοπαθολογική εξέταση παρατηρείται διάχυτη κοκκιωματώδης δερματίτιδα και περιθυλακίτιδα, ενώ το παρασιτικό φορτίο δεν είναι πάντα μεγάλο, σε αντίθεση με το σκύλο (Saridomichelakis, 2009; Navarro et al., 2010). Στις λιγότερο συχνές δερματικές αλλοιώσεις που ενδέχεται να οφείλονται στη λεισμανίωση της γάτας περιλαμβάνονται η αποφολιδωτική δερματίτιδα (Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; da Silva et al., 2010; Navarro et al., 2010; Vides et al., 2011; Sobrinho et al., 2012; Pennisi et al., 2013), η ποδοδερματίτιδα (Navarro et al., 2010), η βλατιδώδης δερματίτιδα, η διάχυτη αλωπεκία (με ή χωρίς ερύθημα και υπερχρωμία), η γενικευμένη εφελκιδώδης δερματίτιδα, η ονχογρύπωση (da Silva et al., 2010), οι κύστεις με αιμορραγικό περιεχόμενο και η βλεφαρίτιδα (Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; Mancianti, 2004; Pennisi et al., 2004; Simões-Mattos et al., 2004; Coelho et al., 2010; Vides et al., 2011; Sobrinho et al., 2012; Pennisi et al., 2013). Τέλος, επισημαίνεται ότι οι δερματικές αλλοιώσεις της λεισμανίωσης της γάτας, όπως άλλωστε και εκείνες του σκύλου, συνήθως δεν είναι κνησμώδεις (Pennisi et al., 2013).

Στα συμπτώματα από τους οφθαλμούς, που μπορεί να είναι ετερόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα, περιλαμβάνονται η επιπεφυκίτιδα, η κερατίτιδα, η ελκώδης

κερατίτιδα, η πρόσθια και οπίσθια ραγοειδίτιδα, η χοριοαμφιβληστροειδίτιδα και η πανοφθαλμίτιδα (Hervás et al., 2001; Pennisi, 2002; Pennisi et al., 2004; Leiva et al., 2005; Ayllon et al., 2008; Navarro et al., 2010; Vides et al., 2011; Sobrinho et al., 2012; Pennisi et al., 2013). Στην ιστοπαθολογική εξέταση των προσβεβλημένων οφθαλμικών ιστών διαπιστώνεται διάχυτη κοκκιωματώδης φλεγμονή που συνοδεύεται από μεγάλο παρασιτικό φορτίο (Navarro et al., 2010).

Στα συμπτώματα που δείχνουν ότι έχουν προσβληθεί τα εσωτερικά όργανα περιλαμβάνονται ο πυρετός, η κατάπτωση, η ανορεξία, η κακή θρεπτική κατάσταση, η αφυδάτωση, η ωχρότητα, η συμφόρηση ή η ικτερική χροιά των ορατών βλεννογόνων, η περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία, η σπληνομεγαλία, η ηπατομεγαλία, η χρόνια ελκώδης στοματίτιδα, οι έμετοι, η διάρροια, η ρινίτιδα, η δύσπνοια, τα συμπτώματα της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας στα οποία περιλαμβάνονται η πολυουρία και η πολυδιψία, οι αποβολές και η αυξημένη θνησιμότητα των νεογέννητων (Hervás et al., 1999; Hervás et al., 2001; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Savani et al., 2004; Simões-Mattos et al., 2004; Vita et al., 2005; Maroli et al., 2007; Marcos et al., 2009; da Silva et al., 2010; Navarro et al., 2010; Vides et al., 2011; Sobrinho et al., 2012; Pennisi et al., 2013). Τα κλινικά όμως ευρήματα που θα μπορούσαν με περισσότερη βεβαιότητα να αποδοθούν στη λείσμανίωση είναι η περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία, η σπληνομεγαλία, η ηπατομεγαλία και τα συμπτώματα εξαιτίας της νεφροπάθειας (σπειραματονεφρίτιδα, διάμεση νεφρίτιδα), αφού τόσο το παράσιτο όσο και οι συμβατές με τη νόσο ιστολογικές αλλοιώσεις βρέθηκαν στα όργανα αυτά (Hervás et al., 1999; Grevot et al., 2005; Marcos et al., 2009; Hatam et al., 2010; Navarro et al., 2010; Sobrinho et al., 2012; Pennisi et al., 2013). Για τα υπόλοιπα χρειάζονται περισσότερες μελέτες ώστε να διευκρινιστεί αν οφείλονται στη λείσμανίωση ή σε άλλες παθήσεις που μπορούν να εμφανιστούν στις ασυμπτωματικά μολυσμένες γάτες (Pennisi et al., 2004).

Κατά τρόπο ανάλογο, έχει αναφερθεί πλήθος εργαστηριακών διαταραχών από την αιματολογική εξέταση (αναιμία, λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία, ουδετεροφιλία ή ουδετεροπενία, λεμφοκυττάρωση ή λεμφοκυτταροπενία, μονοκυττάρωση, θρομβοκυτταροπενία, παγκυτταροπενία), τις βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος (αυξημένη συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών και σφαιρινών, υπολευκωματιναιμία, αζωθαιμία, αυξημένη δραστηριότητα των ALP, ALT και AST) και την ανάλυση των ούρων (πρωτεϊνουρία, χολερυθρινουρία, αιματουρία), χωρίς

όμως να έχει αποδειχθεί αν πράγματι οφείλονται στη λειψμανίωση (Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Leiva et al., 2005; Rüfenacht et al., 2005; Vita et al., 2005; Ayllon et al., 2008; Paludo et al., 2008; Marcos et al., 2009; da Silva et al., 2010; Pennisi et al., 2013). Το μόνο ίσως εργαστηριακό εύρημα που φαίνεται να συνδέεται άμεσα με το νόσημα είναι η υπερσφαιριναιμία, που μπορεί να είναι πολυκλωνική ή μονοκλωνική και να αφορά τις α<sub>2</sub>-, τις β- ή/και τις γ-σφαιρίνες (Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; Pennisi et al., 2004; Leiva et al., 2005; Marcos et al., 2009).

Όπως και στο σκύλο (Saridomichelakis, 2009), ορισμένες φυσικά μολυσμένες από τη *L. infantum* γάτες έχει βρεθεί ότι πάσχουν ταυτόχρονα και από διάφορες άλλες δερματοπάθειες (δερματοφύτωση, ωτοδηκτική ψώρα, δεμοδήκωση, αλλεργική από ψύλλους, δερματίτιδα, αλλοιώσεις του συμπλέγματος των εωσινοφιλικών κοκκιομάτων, φυλλώδης πέμφιγα), μολύνσεις και λοιμώξεις (FeLV, FIV, FIP, λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού, τοξοπλάσμωση, ηπατοζώνωση, ερlichίωση, αναπλάσμωση, μπαρτονέλλωση, ρικετσίωση, βρογχοπνευμονία, πυοθώρακας), μεταβολικά νοσήματα (σακχαρώδης διαβήτης) και νεοπλάσματα (ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, λέμφωμα, νεοπλάσματα των μαστών) (Hervás et al., 2001; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Savani et al., 2004; Simões-Mattos et al., 2004; Grevot et al., 2005; Rüfenacht et al., 2005; Vita et al., 2005; Ayllon et al., 2008; Tabar et al., 2008; Vides et al., 2011; Ayllón et al., 2012; Pennisi et al., 2013; Vilhena et al., 2013). Εκτός από το γεγονός ότι περιπλέκουν την κλινική εικόνα και τα εργαστηριακά ευρήματα της λειψμανίωσης, ορισμένα τουλάχιστον από τα νοσήματα αυτά (πχ FeLV, FIV FIP), ενδέχεται να αυξήσουν και την ευαισθησία της γάτας στη *L. infantum* και να συμβάλλουν στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου (Poli et al., 2002).

#### 4. Διάγνωση

Η διαπίστωση της μόλυνσης από τη *L. infantum* σε γάτες με δερματικές αλλοιώσεις ή συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή από τα εσωτερικά όργανα μπορεί να γίνει άμεσα (μοριακές μέθοδοι, κυτταρολογική, ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση, καλλιέργεια) ή έμμεσα (ορολογικές εξετάσεις).

Οι μοριακές μέθοδοι (PCR, nested PCR, real-time PCR) είναι αναμφισβήτητα οι περισσότερο ευαίσθητες, αφού, ανάλογα με την τεχνική που υιοθετείται κάθε φορά, μπορεί να ανιχνευτεί το DNA ακόμα και ενός μόνο παρασίτου

(Saridomichelakis, 2009). Συνεπώς, το αποτέλεσμα εξαρτάται σε μικρότερο βαθμό από το παρασιτικό φορτίο του συγκεκριμένου βιολογικού υλικού σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εξετάσεις. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από το αρνητικό αποτέλεσμα της κυτταρολογικής εξέτασης, της καλλιέργειας μυελού των οστών, οπού λεμφογαγγλίων και περιφερικού αίματος σε 7 γάτες, που ήταν μολυσμένες με βάση τα αποτελέσματα της PCR στο αίμα (Martín-Sánchez et al., 2007). Γενικότερα, στις άρρωστες γάτες, το παράσιτο έχει ανιχνευτεί σε δείγματα μυελού των οστών (PCR, κυτταρολογική εξέταση, καλλιέργεια), λεμφογαγγλίων (PCR, κυτταρολογική και ιστοπαθολογική εξέταση, καλλιέργεια), σπλήνα (PCR, κυτταρολογική και ιστοπαθολογική εξέταση), ήπατος (PCR, κυτταρολογική εξέταση), νεφρών (PCR), περιφερικού αίματος (PCR, κυτταρολογική εξέταση, καλλιέργεια), στοιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη (κυτταρολογική εξέταση) και αλλοιώσεων από το δέρμα (PCR, κυτταρολογική, ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση, καλλιέργεια) και τους οφθαλμούς (ιστοπαθολογική εξέταση) (Hervás et al., 1999; Hervás et al., 2001; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Savani et al., 2004; Simões-Mattos et al., 2004; Grevot et al., 2005; Leiva et al., 2005; Rüfenacht et al., 2005; Vita et al., 2005; Maroli et al., 2007; Martín-Sánchez et al., 2007; Marcos et al., 2009; Coelho et al., 2010; da Silva et al., 2010; Vides et al., 2011; Pennisi et al., 2013). Επειδή ο αριθμός των μελετών είναι μικρός, είναι δύσκολο να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη διαγνωστική ευαισθησία των παραπάνω διαγνωστικών τεχνικών στα διαφορετικά βιολογικά υλικά, με μόνη ίσως εξαίρεση την PCR στο περιφερικό αίμα που φαίνεται να έχει μικρότερη ευαισθησία συγκριτικά με την PCR στο λεμφογάγγλιο (Vita et al., 2005). Τέλος, μια παράμετρος που λαμβάνεται υπόψη στην κλινική πράξη για την επιλογή της διαγνωστικής εξέτασης είναι η ευκολία λήψης των βιολογικών υλικών, αφού για παράδειγμα η λήψη μυελού των οστών από τις γάτες απαιτεί εμπειρία και είναι τεχνικά δυσκολότερη από ότι στο σκύλο, ενώ η παρακέντηση για λήψη οπού λεμφογαγγλίου συνήθως αποτυγχάνει όταν το ζώο δεν παρουσιάζει περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία.

Η ευαισθησία και η ειδικότητα των ορολογικών εξετάσεων εξαρτάται από τη συγκέντρωση των αντισωμάτων κατά της *L. infantum* που συχνά είναι μικρή (Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Sarkari et al., 2009), τη μεθοδολογία που εφαρμόζεται κάθε φορά (Solano-Gallego et al., 2007; Sobrinho et al., 2012), το αντιγόνο που χρησιμοποιείται (da Silveira Neto et al., 2011; Longoni et al., 2012) και ενδεχομένως

την ηλικία της γάτας, μιας και το θετικό αποτέλεσμα σε πολύ νεαρά ζώα μπορεί να οφείλεται στην παρουσία μητρικών αντισωμάτων (Cardia et al., 2013). Όπως ήδη αναφέρθηκε, μεγάλη σημασία έχει το όριο διαχωρισμού για να μπορεί το αποτέλεσμα να θεωρηθεί θετικό, ενώ απαραίτητη είναι και η βελτιστοποίηση της μεθόδου και όχι απλά η υιοθέτηση της ίδιας μεθοδολογίας που ισχύει για το σκύλο (Solano-Gallego et al., 2007). Τα παραπάνω θα μπορούσαν, εν μέρει τουλάχιστον, να δικαιολογήσουν το φτωχό συσχετισμό μεταξύ του αποτελέσματος της ορολογικής εξέτασης και της PCR (Vita et al., 2005; Martín-Sánchez et al., 2007). Οι ορολογικές εξετάσεις που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα σε συμπτωματικές γάτες ήταν οι IFAT, ELISA, η δοκιμή της άμεσης και της έμμεσης αιμοσυγκόλλησης και η ανοσοαποτύπωση κατά Western (Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Savani et al., 2004; Grevot et al., 2005; Leiva et al., 2005; Rüfenacht et al., 2005; Maroli et al., 2007; Marcos et al., 2009; Coelho et al., 2010; da Silva et al., 2010; Vides et al., 2011).

## **5. Θεραπευτική αντιμετώπιση**

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία αντιλεϊσμνιακή αγωγή που να μπορεί να χαρακτηριστεί ως ικανοποιητική στη γάτα, ενδεχομένως εξαιτίας των πολύ λίγων ζώων στα οποία έχουν δοκιμαστεί τα διάφορα φάρμακα. Συνήθως επιλέγονται οι ίδιες δραστικές ουσίες και παρόμοια δοσολογικά σχήματα με εκείνα που χρησιμοποιούνται στο σκύλο. Περισσότερο αποτελεσματική φαίνεται να είναι η αλλοπουρινόλη (Pennisi et al., 2004; Leiva et al., 2005; Rüfenacht et al., 2005; Navarro et al., 2010; Pennisi et al., 2013) και η αντιμονιακή μεγλουμίνη, μόνη ή σε συνδυασμό με την κετοκοναζόλη (Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; Pennisi et al., 2013). Τέλος, σε γάτες που παρουσίαζαν μόνο δερματικά οζίδια επιχειρήθηκε η χειρουργική εξαίρεση, που ορισμένες φορές οδήγησε στην οριστική ίαση (Rüfenacht et al., 2005).

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ-ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ

### Α) ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Επειδή η συχνότητα μόλυνσης της γάτας από τη *L. infantum*, το παρασιτικό φορτίο των μολυσμένων γατών, η διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα των κυτταρολογικών και ορολογικών εξετάσεων και οι κλινικές επιπτώσεις της μόλυνσης παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστες, στη μελέτη αυτή εξετάστηκαν κλινικά υγιείς και ασθενείς (με δερματικές αλλοιώσεις, με συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή με συμπτώματα ενδεικτικά προσβολής των εσωτερικών οργάνων) γάτες με στόχο:

1) τον υπολογισμό της συχνότητας μόλυνσής τους από *Leishmania* spp. μέσω:  
α) της ανίχνευσης του DNA του παρασίτου με τη μέθοδο PCR σε δείγματα αίματος, ιστοτεμαχίων δέρματος, μυελού των οστών και επιπεφυκότα, β) της άμεσης ανίχνευσης του παρασίτου με την κυτταρολογική εξέταση των λεμφογαγγλίων, του δέρματος, του μυελού των οστών, του επιπεφυκότα, της στοιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη και του υλικού απόξεσης από το βλεννογόνο του απευθυσμένου, και γ) της ανίχνευσης ειδικών αντισωμάτων έναντι του παρασίτου με IFAT και ELISA καθώς και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο παραπάνω ορολογικών εξετάσεων,

2) την ταυτοποίηση του είδους της *Leishmania* στα δείγματα που ήταν θετικά με την PCR μέσω της *in silico* ανάλυσης ομολογίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και σύγκρισής της με εκείνη των διαφόρων ειδών του παρασίτου,

3) την εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου στα δείγματα που ήταν θετικά με την PCR μέσω της real-time PCR,

4) την εκτίμηση της διαγνωστικής ευαισθησίας και ειδικότητας των κυτταρολογικών και ορολογικών εξετάσεων σε σύγκριση με την PCR και τον έλεγχο για πιθανό συσχετισμό μεταξύ των αποτελεσμάτων των παραπάνω εξετάσεων,

5) τη διερεύνηση πιθανών συσχετισμών μεταξύ της μόλυνσής τους από *Leishmania* spp. και των στοιχείων ταυτότητας των γατών, των συνθηκών διαβίωσής τους, της περιόδου του έτους που εξετάστηκαν, της μόλυνσής τους από διάφορους άλλους λοιμογόνους παράγοντες και της παρουσίας συμπτωμάτων καθώς και παθολογικών ευρημάτων από την αιματολογική, τις βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος και την ανάλυση των ούρων.



## **B) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. Αριθμός γατών, τύπος και χρόνος πραγματοποίησης της μελέτης και άδεια πειραματισμού**

Στη μελέτη αυτή περιλήφθηκαν 100 γάτες που ζούσαν στη Θεσσαλία (77/100) και τη Μακεδονία (23/100), περιοχές όπου η λεισμανίωση του σκύλου από *L. infantum* είναι ενδημική (Leontides et al., 2002; Saridomichelakis et al., 2009; Athanasiou et al., 2012). Οι γάτες αυτές εξετάστηκαν μεταξύ του Ιανουαρίου 2009 και του Σεπτεμβρίου 2011 και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε έξι σημεία και συγκεκριμένα σε δύο Πανεπιστημιακές Κλινικές και σε τέσσερις ιδιωτικές Κλινικές ή Ιατρεία Ζώων Συντροφιάς.

Οι χειρισμοί των γατών της μελέτης έγιναν σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία 86/609/EEC και την Ελληνική νομοθεσία και το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την αρμόδια Νομοκτηνιατρική Υπηρεσία Καρδίτσας (αριθμός άδειας πειραματισμού: 3698/31-10-2008).

Εκτός από τις 100 γάτες της μελέτης, για να καθοριστούν τα όρια διαχωρισμού των ορολογικών εξετάσεων (IFAT και ELISA) προκειμένου να θεωρηθεί το αποτέλεσμα θετικό, χρησιμοποιήθηκαν οροί αίματος από 75 γάτες (25 κλινικά υγιείς και 50 ασθενείς) που ζούσαν στην πολιτεία Texas των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, όπου η λεισμανίωση από *L. infantum* δεν είναι ενδημική (Quinnell et al., 1997; Solano-Gallego et al., 2007).

### **2. Κριτήρια συμμετοχής των γατών στη μελέτη**

Όλες οι γάτες που προσκομίζονταν στις παραπάνω Κλινικές και Ιατρεία κατά τη χρονική περίοδο της μελέτης μπορούσαν να περιληφθούν σε αυτή, υπό τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- α) μετά από αναλυτική ενημέρωση του ιδιοκτήτη τους, ο τελευταίος συμφωνούσε να περιληφθεί η γάτα του στη μελέτη και υπέγραφε το σχετικό έντυπο (Παράρτημα-Έντυπο Π1),
- β) είχαν ηλικία τουλάχιστον 1 έτους,
- γ) δεν είχαν διαγνωστεί με λεισμανίωση και δεν είχαν λάβει ειδική αντιλειτουργική θεραπεία στο παρελθόν,

δ) δεν τους είχαν χορηγηθεί φάρμακα με αντιλεισμμανιακή δράση, όπως για παράδειγμα η αμφοτερικίνη-B τους τελευταίους 12 μήνες ή η κετοκοναζόλη, ο συνδυασμός μετρονιδαζόλης-σπειραμυκίνης και οι φθοριοκινολόνες τους τελευταίους 3 μήνες (Miró et al., 2008), για τη θεραπεία λοιμώξεων από μύκητες ή βακτήρια και  
ε) δεν τους είχαν χορηγηθεί ανοσορρυθμιστικά φάρμακα, όπως για παράδειγμα η ενέσιμη οξείκη μεθυλοπρεδνιζολόνη μακράς δράσης τις τελευταίες 6 εβδομάδες ή τα γλυκοκορτικοειδή βραχείας δράσης από το στόμα τις τελευταίες 2 εβδομάδες.

### 3. Λήψη του ιστορικού

Στα στοιχεία από το ιστορικό που καταγράφηκαν για όλες τις γάτες της μελέτης και χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, επειδή θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα μόλυνσης της γάτας από *Leishmania* spp. (στοιχεία α ως η) ή να είναι αποτέλεσμα της μόλυνσης (στοιχεία θ ως ια), περιλαμβάνονται:

- α) η φυλή: λόγω του μικρού τους αριθμού, όλες οι γάτες που ανήκαν σε καθαρόαιμες φυλές ομαδοποιήθηκαν πριν τη στατιστική επεξεργασία,
- β) το φύλο,
- γ) η ηλικία,
- δ) το μήκος του τριχώματος: βραχύτριχες ή μακρύτριχες,
- ε) οι συνθήκες διαβίωσης: μέσα σε σπίτι ή σε εξωτερικούς χώρους ή τόσο μέσα σε σπίτι όσο και σε εξωτερικούς χώρους,
- στ) η περιοχή διαβίωσης: αστική, ημιαστική ή αγροτική,
- ζ) η παρουσία πυκνής βλάστησης σε ακτίνα 100 μέτρων από το χώρο διαβίωσης,
- η) η ημερομηνία που εξετάστηκαν και έγινε η δειγματοληψία: για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της PCR και των κυτταρολογικών εξετάσεων οι γάτες χωρίστηκαν σε εκείνες που εξετάστηκαν τη συνήθη περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων στην Ελλάδα, δηλαδή μεταξύ Απριλίου και Νοεμβρίου (Chaniotis et al., 1994), και σε εκείνες που εξετάστηκαν τους υπόλοιπους μήνες του χρόνου. Λόγω του χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί από την έκθεση σε ένα λοιμογόνο παράγοντα μέχρι την παραγωγή αντισωμάτων, η παραπάνω περίοδος μετατοπίστηκε κατά ένα μήνα (Μάιος-Δεκέμβριος) για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των ορολογικών εξετάσεων IFAT και ELISA,
- θ) η διαπίστωση από τον ιδιοκτήτη ανορεξίας τις τελευταίες 24 ώρες πριν από την εξέταση,

ι) η διαπίστωση από τον ιδιοκτήτη διάρροιας τις τελευταίες 24 ώρες πριν από την εξέταση, και

ια) η διαπίστωση από τον ιδιοκτήτη εμετού τις τελευταίες 7 ημέρες πριν από την εξέταση.

Στα υπόλοιπα στοιχεία από το ιστορικό που καταγράφηκαν για όλες τις γάτες της μελέτης αλλά δε χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, επειδή δε θεωρήθηκε ότι θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα μόλυνσης της γάτας από *Leishmania* spp. ή να είναι αποτέλεσμα της μόλυνσης, περιλαμβάνονται:

α) το σωματικό βάρος,

β) η διατροφή: ξηρή ή κονσερβοποιημένη τροφή του εμπορίου ή μαγειρεμένη τροφή ή συνδυασμοί των παραπάνω,

γ) οι εμβολιασμοί: κάθε γάτα χαρακτηρίστηκε ως πλήρως εμβολιασμένη ή μερικώς εμβολιασμένη ή ανεμβολίαστη,

δ) η διαπίστωση από τον ιδιοκτήτη διάφορων συμπτωμάτων τον τελευταίο χρόνο πριν την εξέταση που δεν υπήρχαν πλέον, και

ε) η χορήγηση φαρμάκων τους τελευταίους 3 μήνες πριν την εξέταση.

#### **4. Κλινική εξέταση**

Μετά τη λήψη του ιστορικού, ακολουθούσε προσεκτική κλινική εξέταση και αναλυτική καταγραφή των συμπτωμάτων της κάθε γάτας. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις δερματικές αλλοιώσεις (κυρίως έλκη και οζίδια και κατά δεύτερο λόγο αλωπεκία-υποτρίχωση, βλατίδες, φολίδες, εφελκίδες, ονυχογρύπωση, κύστεις με αιμορραγικό περιεχόμενο, ποδοδερματίτιδα, βλεφαρίτιδα), στα συμπτώματα από τους οφθαλμούς (επιπεφυκίτιδα, ελκώδης ή μη κερατίτιδα, πρόσθια και οπίσθια ραγοειδίτιδα, χοριοαμφιβληστροειδίτιδα, πανοφθαλμίτιδα) και σε αυτά που είναι ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων (περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία, ικτερική χροιά των ορατών βλεννογόννων) που έχουν αναφερθεί σε γάτες με λείσμανίωση (Hervás et al., 1999; Hervás et al., 2001; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Pennisi et al., 2004; Savani et al., 2004; Simões-Mattos et al., 2004; Grevot et al., 2005; Leiva et al., 2005; Rüfenacht et al., 2005; Ayllon et al., 2008; Marcos et al., 2009; Coelho et al., 2010; da Silva et al., 2010; Hatam et al., 2010; Navarro et al., 2010; Vides et al., 2011; Sobrinho et al., 2012; Pennisi et al., 2013).

Στη συνέχεια οι γάτες της μελέτης χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: την ομάδα A (n=50) που περιλάμβανε γάτες που με βάση το ιστορικό και την κλινική εξέταση ήταν κλινικά υγιείς και την ομάδα B (n=50) που περιλάμβανε γάτες με δερματικές αλλοιώσεις, συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων, ανεξάρτητα από το αν αυτά έχουν αναφερθεί ή όχι σε γάτες με λεισμανίωση.

Στις γάτες της ομάδας B, εκτός από τις εργαστηριακές εξετάσεις που έγιναν στα πλαίσια της μελέτης, συστήθηκαν επιπρόσθετες εξετάσεις (απεικονιστικές, ιστοπαθολογικές κλπ) προκειμένου να επιτευχθεί η ακριβέστερη δυνατή αιτιολογική διάγνωση. Η πραγματοποίηση, εν μέρει ή εξολοκλήρου, των επιπρόσθετων αυτών εξετάσεων, καθορίστηκε από τις επιθυμίες και τις οικονομικές δυνατότητες των ιδιοκτητών τους.

## 5. Δειγματοληψίες

Πριν τη λήψη των διαφόρων βιολογικών υλικών που ήταν απαραίτητα για τη μελέτη εφαρμόστηκε χημική συγκράτηση των γατών. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκε ενδομυϊκά συνδυασμός κεταμίνης στη δόση των 5 mg/Kg σωματικού βάρους (Ketaset<sup>®</sup>, Fort Dodge Animal Health), μιδαζολάμης στη δόση των 0,2 mg/Kg σωματικού βάρους (Dormicum<sup>®</sup>, Roche Hellas) και δεξμεδετομιδίνης στη δόση των 20 μg/Kg σωματικού βάρους (Dexdomitor<sup>®</sup>, Zoetis), χωρίς να διαπιστωθούν παρενέργειες σε καμία από τις γάτες της μελέτης.

Ακολουθούσε η λήψη των παρακάτω βιολογικών υλικών:

**Αίμα:** η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε από τη σφαγίτιδα φλέβα με βελόνη 21G και σύριγγα Monovette<sup>®</sup> (Sarstedt). Λαμβάνονταν περίπου 10 ml αίματος από τα οποία τα 2 ml μεταφέρονταν σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό EDTA και το υπόλοιπο αφήνονταν να πήξει για 20 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν στις 3.000 rpm για 20 λεπτά προκειμένου να διαχωριστεί ο ορός που στη συνέχεια μεταφερόταν σε πλαστικά φιαλίδια. Το ολικό αίμα με EDTA χρησιμοποιήθηκε για την PCR, τη real-time PCR, την αιματολογική εξέταση και την κυτταρολογική εξέταση επιχρίσματος από τη στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη. Ο ορός του αίματος χρησιμοποιήθηκε για τις ορολογικές και τις βιοχημικές εξετάσεις.

**Ούρα:** σε όσες από τις γάτες υπήρχε αρκετή ποσότητα ούρων στην ουροδόχο κύστη, πραγματοποιήθηκε κυστοκέντηση με βελόνη 21G και σύριγγα των 5 ή 10 ml

και το ζώο σε ύπτια κατάκλιση. Το δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τη συνήθη ανάλυση των ούρων, τη μέτρηση του λόγου πρωτεΐνες/κρεατινίνη και την καλλιέργεια για αερόβια βακτήρια (εφόσον υπήρχε ένδειξη με βάση το ιστορικό, τα ευρήματα της κλινικής εξέτασης ή της ανάλυσης των ούρων).

**Κόπρανα:** από όλους τους ιδιοκτήτες των γατών της μελέτης ζητήθηκε να προσκομίσουν την ημέρα της εξέτασης δείγμα κοπράνων που θα είχαν συλλέξει την ίδια ή την προηγούμενη ημέρα. Εφόσον αυτό δεν ήταν εφικτό, γινόταν προσπάθεια απευθείας συλλογής κοπράνων από το απευθυσμένο της γάτας με ελαστικό γάντι μιας χρήσης και κατάλληλο λιπαντικό (K-Y jell®, Johnson & Johnson). Τέλος, στην περίπτωση που η ποσότητα του παραπάνω δείγματος δεν ήταν επαρκής, ζητούνταν από τον ιδιοκτήτη της γάτας να προσκομίσει δείγμα κοπράνων τις επόμενες 1-3 ημέρες. Από τα δείγματα των κοπράνων έγινε απλή παρασιτολογική εξέταση και εξέταση με τη μέθοδο Telean.

**Υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του απευθυσμένου:** χρησιμοποιήθηκε βαμβακοφόρος στειλούς που εισήλθε στην τελική μοίρα του απευθυσμένου το οποίο ήταν κενό κοπράνων και περιστράφηκε σε επαφή με το βλεννογόνο του. Το υλικό αυτό επιστρώθηκε με περιστροφική κίνηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα και χρησιμοποιήθηκε για κυτταρολογική εξέταση.

**Υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου:** πάρθηκε από ένα ιγνυακό ή προωμοπλατιαίο λεμφογάγγλιο που επιλέγονταν με βάση το μέγεθός του και την ευκολία με την οποία μπορούσε να σταθεροποιηθεί πριν την παρακέντηση. Πριν την παρακέντηση γινόταν κούρεμα και αντισηψία της περιοχής και στη συνέχεια χρησιμοποιούνταν βελόνη 21G χωρίς σύριγγα που οδηγούνταν στο κέντρο του λεμφογαγγλίου και στην συνέχεια μετακινούνταν προς 2-3 κατευθύνσεις χωρίς να βγει από αυτό (τεχνική παρακέντησης με λεπτή βελόνη χωρίς αναρρόφηση). Ακολούθως η βελόνη απομακρύνονταν, εφαρμόζονταν σε σύριγγα των 5 ή 10 ml στην οποία υπήρχαν ήδη περίπου 3 ml αέρα και ύστερα από απότομη πίεση του εμβόλου το υλικό από τη βελόνη μεταφέρονταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και επιστρώνονταν με τη βοήθεια δεύτερης αντικειμενοφόρου (Saridomichelakis et al., 2005; Hodges, 2013). Το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε για κυτταρολογική εξέταση

**Ιστοτεμάχια δέρματος:** επειδή δεν υπάρχουν δεδομένα για την κατανομή της *Leishmania* spp. στο δέρμα των μολυσμένων γατών και με βάση προηγούμενες παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες η κατανομή των παρασίτων δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών περιοχών του δέρματος του σκύλου

(Saridomichelakis et al., 2007), επιλέχθηκε να παρθεί από όλες τις γάτες της μελέτης ένα ιστοτεμάχιο από την περιοχή της λαγόνιας ακρολοφίας έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια το τραύμα του δέρματος για την είσοδο της βελόνας μυελοκέντησης. Επιπλέον, ένα (18/20) ή δύο (2/20) πρόσθετα ιστοτεμάχια πάρθηκαν από τις 20 γάτες της ομάδας Β που εμφάνιζαν δερματικές αλλοιώσεις (ανεξάρτητα από το αν οι αλλοιώσεις αυτές έχουν περιγραφεί ή όχι σε γάτες με λεισημανίωση), επιλέγοντας τις περισσότερο αντιπροσωπευτικές από αυτές. Για το σκοπό αυτό η περιοχή κουρεύονταν με ψαλίδι, σημαίνονταν με μαρκαδόρο το ακριβές σημείο της βιοψίας και γινόταν τοπική αναισθησία με υποδόρια χορήγηση διαλύματος λιδοκαΐνης 2% (Xylocaine<sup>®</sup>, AstraZeneca) στο οποίο είχε προστεθεί διττανθρακικό νάτριο 4% σε αναλογία 1/10. Η βιοψία πραγματοποιούνταν με διατηρητή δέρματος διαμέτρου 8mm (Biopsy punch 8mm, Kruse). Στη συνέχεια το ιστοτεμάχιο καθαρίζονταν από το αίμα με τη βοήθεια αποστειρωμένης γάτας, τοποθετούνταν πάνω σε γλωσσοπίεστρο με το χόριο προς τα κάτω και κοβόταν με νυστέρι στη μέση και με φορά κάθετη προς την επιδερμίδα. Από την επιφάνεια της κάθετης τομής του ενός από τα δύο κομμάτια του ιστοτεμαχίου γίνονταν επιχρίσματα αποτύπωσης που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρολογική εξέταση. Στη συνέχεια το ένα κομμάτι μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα και χρησιμοποιήθηκε για την PCR και τη real-time PCR ενώ το άλλο μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο με ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 4% και χρησιμοποιήθηκε για ιστοπαθολογική εξέταση όταν αυτή κρίθηκε απαραίτητη για την αιτιολογική διάγνωση (γάτες της ομάδας Β με δερματικές αλλοιώσεις).

**Μυελός των οστών:** η λήψη μυελού των οστών έγινε ύστερα από παρακέντηση της λαγόνιας ακρολοφίας (διαμέσου του τραύματος από τη βιοψία του δέρματος), με τη βοήθεια βελόνας τύπου Rosenthal μιας χρήσης και διαμέτρου 18G (Perfectus<sup>®</sup>, Medax Medical Devices) και σύριγγας 10 ml που περιείχε 0,2 ml αποστειρωμένου διαλύματος EDTA. Αμέσως μετά τη δειγματοληψία παρασκευάστηκαν επιχρίσματα για κυτταρολογική εξέταση (με την ίδια τεχνική επίστρωσης που χρησιμοποιήθηκε για το υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου) και στη συνέχεια ο μυελός των οστών μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο με EDTA και χρησιμοποιήθηκε για την PCR και τη real-time PCR.

**Υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα:** πάρθηκε από το δεξιό και τον αριστερό επιπεφυκότα του κάτω βλεφάρου με διαφορετικούς αποστειρωμένους στείλεους. Ο στείλεός από το δεξιό επιπεφυκότα μεταφέρθηκε σε

πλαστικό φιαλίδιο και χρησιμοποιήθηκε για την PCR και τη real-time PCR, ενώ εκείνος από τον αριστερό επιπεφυκότα χρησιμοποιήθηκε για την επίστρωση, με περιστροφική κίνηση, του υλικού απόξεσης σε αντικειμενοφόρο πλάκα που στη συνέχεια εξετάστηκε κυτταρολογικά.

Όσα από τα παραπάνω βιολογικά υλικά δεν εξετάστηκαν άμεσα, συντηρήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , με εξαίρεση βέβαια τα κυτταρολογικά επιχρίσματα και τα ιστοτεμάχια που είχαν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη.

## **6. PCR για την ανίχνευση του DNA και την ταυτοποίηση του είδους της *Leishmania***

Πραγματοποιήθηκε στο αίμα, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, το μυελό των οστών και το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα.

Αρχικά απομονώθηκε το DNA από τα παραπάνω δείγματα με το High Pure PCR Template Kit<sup>®</sup> (Roche), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε, αναφορικά με την καθαρότητα και την ακεραιότητά του, ελέγχθηκε με τη μέτρηση της OD στα 260/280 nm και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Για την ανίχνευση του DNA της *Leishmania* χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της PCR που περιγράφηκε αρχικά το 1995 (Piarroux et al., 1995) και στη συνέχεια τροποποιήθηκε και αξιολογήθηκε πλήρως στο Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γ.Π.Α. (Andreadou et al., 2012). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50  $\mu\text{l}$  που αποτελούνταν από 5  $\mu\text{l}$  γενωμικού DNA, 1X ρυθμιστικού διαλύματος της PCR [Tris-HCl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ], 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  μίγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs, Fermentas), 1.25 U Taq πολυμεράσης (Invitrogen) και 0,2  $\mu\text{M}$  από κάθε ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή (T2: 5'-CGGCTTCGCACCATGCGGTG-3', B4: 5'-ACATCCCTGCCCACATACGC-3'). Με τη μέθοδο αυτή πολλαπλασιάζεται ένα τμήμα 216 bp μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας του DNA της *L. infantum* (Genbank accession No L42486.1). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή MyCycler<sup>®</sup> (BioRad) και μετά το αρχικό στάδιο επώασης στους  $95^{\circ}\text{C}$  για 5 λεπτά ακολουθήθηκε το θερμοκρασιακό προφίλ 40 κύκλων στους  $95^{\circ}\text{C}$  για 30 sec, στους  $62^{\circ}\text{C}$  για 30 sec και στους  $72^{\circ}\text{C}$  για 20 sec, τέλος ένας κύκλος των 6 λεπτών στους  $72^{\circ}\text{C}$ .

Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ψευδώς-θετικών και ψευδώς-αρνητικών αποτελεσμάτων της PCR, το 20% των δειγμάτων σε κάθε αντίδραση ήταν αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες. Οι πρώτοι ήταν αρνητικά (με βάση το αποτέλεσμα της καλλιέργειας, της ορολογικής εξέτασης και της PCR) δείγματα από τα ίδια βιολογικά υλικά με αυτά που εξετάζονταν κάθε φορά, ενώ ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι αρνητικοί μάρτυρες που επιμολύνθηκαν με DNA από καθαρή καλλιέργεια προμαστογοφόρων της *L. infantum*. Η απομόνωση του DNA από τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες και η προετοιμασία του για την PCR έγινε με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα από τις γάτες της μελέτης. Για να αποκλειστεί η παρουσία αναστολέων της PCR χρησιμοποιήθηκε PCR όπου το DNA στόχος ήταν εκείνο του γονιδίου της ακτίνης (ενδογενές γονίδιο ελέγχου).

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% w/v πηκτή αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο και με δείκτες μοριακών βαρών (100-bp DNA ladder, Fermentas). Η ειδικότητα της αντίδρασης επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων που πραγματοποιήθηκε και στις δύο έλικες του DNA με τη βοήθεια του BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit και του PRISM<sup>®</sup> 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων συγκρίθηκε με τις αλληλουχίες που έχουν κατατεθεί στην βάση δεδομένων GenBank με τη βοήθεια του Basic Local Alignment Tool (BLAST) του National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Οι γάτες της μελέτης θεωρήθηκε ότι ήταν μολυσμένες από *Leishmania* spp. εφόσον το αποτέλεσμα της PCR ήταν θετικό σε ένα τουλάχιστον από τους τέσσερις ιστούς (αίμα, ιστοτεμάχια δέρματος, μυελός των οστών, υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα) που εξετάστηκαν.

## 7. Real-time PCR

Για την ποσοτικοποίηση του παρασιτικού φορτίου στο αίμα, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, το μυελό των οστών και το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα χρησιμοποιήθηκε η real-time PCR στα δείγματα εκείνα που ήταν θετικά με την PCR. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή Light Cycler 2.0 (Roche) χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές με την PCR, σε τελικό όγκο 20 μl που αποτελούνταν από 5 μl γενωμικού DNA, 2 μl master mix (Light Cycler Fast Start Master SYBR Green I-Roche), 3 mM MgCl<sub>2</sub> και 0,5 μM από κάθε εκκινητή.



Αναφορικά με τη θερμοκρασία της αντίδρασης, μετά το αρχικό στάδιο επώασης στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούσαν 45 κύκλοι των 10 sec στους 95°C, των 10 sec στους 62°C και των 10 sec στους 72°C. Για το σχηματισμό της τελικής καμπύλης αποδιάταξης αρχικά έγινε μετουσίωση του DNA στους 95°C για 60 sec, στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώθηκε στους 65°C για 60 sec και τέλος αυτή αυξάνονταν κατά 0,1 °C/sec μέχρι τους 95°C. Για την ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκε ο βαθμονομημένος θετικός δείκτης που περιλαμβάνεται στο Real Time PCR Detection Kit (GeneSig Primer Design) και είναι κατάλληλος για όλα τα είδη του γένους *Leishmania*. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράστηκε σε αριθμό παρασίτων/ml.

## 8. Κυτταρολογικές εξετάσεις

Τα επιχρίσματα από τη στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη, το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του απευθυσμένου, το υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, τις δερματικές αλλοιώσεις των γατών της ομάδας B (βλ. παρακάτω), το μυελό των οστών και το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα βάφτηκαν με Diff-Quik® (Merk) και, αφού επιλέχθηκαν οι κατάλληλες για τη μικροσκοπική εξέταση περιοχές, εξετάστηκαν σε μεγέθυνση 1.000x για την παρουσία αμαστιγοφόρων μορφών *Leishmania* spp. και ενδεχομένως άλλων μικροοργανισμών ή παθολογικών ευρημάτων. Η μικροσκοπική εξέταση διαρκούσε 10 λεπτά στον τέλος των οποίων καταγράφονταν ο αριθμός των αμαστιγοφόρων μορφών που είχαν βρεθεί, με μόνη εξαίρεση το μυελό των οστών η μικροσκοπική εξέταση του οποίου περιλάμβανε 1.000 οπτικά πεδία και το αποτέλεσμα εκφράζονταν σε λογαριθμική κλίμακα από 0 μέχρι +6 (Chulay and Bryceson, 1983; Saridomichelakis et al., 2005). Σε όλες τις περιπτώσεις ο εξεταστής δε γνώριζε το αποτέλεσμα της PCR.

## 9. Ορολογική εξέταση με τη μέθοδο IFAT για IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες έναντι της *Leishmania* spp.

Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες ανοσοφθορισμού των 15 βοθρίων στα οποία είχαν καθηλωθεί προμαστιγοφόρα του ελληνικού στελέχους της *L. infantum* MHOM/GR/78/L4A (Sideris et al., 1999) και σύζευγμα πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της IgG ή της IgM της γάτας (anti-feline IgG ή anti-feline IgM) που ήταν συνδεδεμένα με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (VMRD Inc.). Ο ορός του αίματος

των γατών της μελέτης αραιώθηκε σε απιονισμένο νερό με PBS (Sigma-Aldrich) και εξετάστηκε σε υποδιπλάσιες αραιώσεις, ξεκινώντας από την 1/10, μέχρι εξάντλησης του τίτλου των αντισωμάτων. Σε κάθε βοθρίο τοποθετούνταν 10 μl αραιωμένου ορού και στη συνέχεια οι πλάκες επωάζονταν στους 37°C και σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας για 30 λεπτά. Ακολουθούσαν τρεις εκπλύσεις των 5 λεπτών με εμβάπτιση και ανάδευση σε απιονισμένο νερό με PBS και μια τέταρτη έκπλυση σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια οι πλάκες αφήνονταν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου, σε κάθε βοθρίο τοποθετούνταν 10 μl συζεύγματος και ακολουθούσε η ίδια με την παραπάνω διαδικασία επώασης, εκπλύσεων και στεγνώματος. Τέλος, στις πλάκες τοποθετούνταν ειδικό διάλυμα γέλης (Fluorprep, Biomeriex) και καλυπτρίδα για να ακολουθήσει η εξέταση σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (BX-40, Olympus) σε σκοτεινό θάλαμο. Θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα που εμφάνιζαν φθορισμό στο κυτταρόπλασμα ή την κυτταρική μεμβράνη των προμαστιγοφόρων. Η μικροσκοπική εξέταση έγινε χωριστά από τον υποψήφιο διδάκτορα και από δεύτερο ερευνητή, χωρίς κανένας από τους δύο να γνωρίζει το αποτέλεσμα της PCR και για να χαρακτηριστεί το αποτέλεσμα ως θετικό ή αρνητικό χρειαζόταν η σύμφωνη γνώμη τους. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ορός σκύλου με λεισμανίωση και τίτλο IFAT 1/400 και ως αρνητικοί μάρτυρες οροί των γατών από τις Η.Π.Α.

Επειδή η εκτίμηση του αποτελέσματος του IFAT ενέχει στοιχεία υποκειμενικότητας, μετά την αρχική εξέταση των ορών από τις 100 γάτες της μελέτης και τις 75 γάτες αρνητικούς μάρτυρες, επιλέχθηκε με λογισμικό παραγωγής τυχαίων αριθμών (Excel, Microsoft) το 20% των παραπάνω δειγμάτων (n=35) που εξετάστηκαν για δεύτερη φορά, χωρίς όμως οι εξεταστές να γνωρίζουν την προέλευσή τους ούτε ότι είχαν εξεταστεί σε προηγούμενο χρόνο.

#### **10. Ορολογική εξέταση με τη μέθοδο ELISA για IgG έναντι της *Leishmania spp.***

Εφαρμόστηκε η μεθοδολογία που έχει ήδη περιγραφεί (Solano-Gallego et al., 2007), με μερικές τροποποιήσεις (Sherry et al., 2011). Για την ELISA χρησιμοποιήθηκε διαλυτό αντιγόνο από ίδιο, όπως για την IFAT, στέλεχος της *L. infantum* και πολυκλωνικά αντισώματα κατά της IgG της γάτας (goat anti-cat IgG) συνδεδεμένα με αλκαλική φωσφατάση (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης από πολυστερίνη των 96 βοθρίων, σε καθένα από τα οποία προσροφήθηκαν 100 μl αντιγόνου (2,5 μg/ml σε 0.1M ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών με pH 9,6), ύστερα από επώαση στους

4°C για μια νύχτα. Ακολουθούσαν τρεις εκπλύσεις με PBS Tween-20 και μια έκπλυση με PBS. Οι οροί αραιώνονταν 1/300 με PBS, σε κάθε βοθρίο τοποθετούνταν 100 µl αραιωμένου ορού και ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες και η ίδια, όπως παραπάνω διαδικασία έκπλυσης. Στη συνέχεια, σε κάθε βοθρίο προστίθενταν 100 µl συζεύγματος, αραιωμένου 1/50.000 σε PBS, και επαναλαμβανόταν η παραπάνω διαδικασία επώασης και εκπλύσεων. Μετά την τελευταία έκπλυση, τοποθετούνταν σε κάθε βοθρίο 100 µl διαλύματος φωσφορικού p-νιτροφαινυλίου (Sigma-Aldrich) με ανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH=9,8) και στη συνέχεια οι πλάκες επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Η αντίδραση σταματούσε με την προσθήκη 50 µl διαλύματος 1N NaOH σε κάθε βοθρίο. Η απορρόφηση μετρούνταν στα 405 nm στη συσκευή HumanReader (Human Diagnostic Systmes). Όλοι οι οροί των γατών της μελέτης εξετάστηκαν εις διπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος της OD για κάθε δείγμα.

## **11. Αιματολογική εξέταση**

Έγινε σε ολικό αίμα με EDTA, στον αιματολογικό αναλυτή QBC (IDEXX), χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή και την Τ.Δ.Α. LVMEDUTH-PRC-001, και περιλάμβανε τη μέτρηση του αιματοκρίτη (%), της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης (g/dl), και του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων (/µl) και των αιμοπεταλίων (/µl). Ο υπολογισμός του λευκοκυτταρικού τύπου γινόταν ύστερα από μικροσκοπική εξέταση επιχρίσματος από το αίμα και τη μορφολογική ταυτοποίηση 100 λευκών αιμοσφαιρίων για να ακολουθήσει στη συνέχεια ο υπολογισμός του απόλυτου αριθμού κάθε κυτταρικής σειράς, ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε για την παρουσίαση και τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

## **12. Βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος**

Στο βιοχημικό αναλυτή Vet Test Chemisrty Analyzer (IDEXX) μετρήθηκε η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών, των λευκωματινών, του BUN, της κρεατινίνης, της γλυκόζης, της χολοστερόλης, της ολικής χολερυθρίνης, του ασβεστίου και του ανόργανου φωσφόρου και η δραστηριότητα της ALP, της γ-GT, της ALT, της AST και της CK. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση των σφαιρινών, από τη διαφορά μεταξύ εκείνης των ολικών πρωτεϊνών και των λευκωματινών, και ο λόγος λευκωματίνες/σφαιρίνες. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις του καλίου, του νατρίου και

του χλωρίου, μετρήθηκαν στον αναλυτή Vet Stat (IDEXX). Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή ενώ οι εξετάσεις έγιναν σύμφωνα με τις Τ.Δ.Α. LVMEDUTH-PRC-004 και Τ.Δ.Α. LVMEDUTH-PRC-020.

### 13. Ανάλυση ούρων

Η ανάλυση των ούρων έγινε σύμφωνα με την Τ.Δ.Α. LVMEDUTH-PRC-003 περιλάμβανε τη μέτρηση του ειδικού βάρους με ιατρικό διαθλασίμετρο (American Optical), τον έλεγχο του pH, της παρουσίας γλυκόζης, κετονικών σωμάτων, χολερυθρίνης και αίματος ή αιμοσφαιρίνης με ειδικές χρωματομετρικές ταινίες εμφάνισης (Multistix<sup>®</sup> 10 SG, Bayer) και τη μέτρηση του λόγου πρωτεΐνες/κρεατινίνη.

Για τη μέτρηση του λόγου πρωτεΐνες/κρεατινίνη χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο ούρο, ύστερα από φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1.500 rpm για 5 λεπτά. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο του ερυθρού της πυρογαλλόλης στο φασματοφωτόμετρο SHIMACHU. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit Urinary Proteins LR<sup>®</sup> (Cesan) που περιλαμβάνει αντιδραστήριο ερυθρού της πυρογαλλόλης και νατριούχο μολυβδαίνιο και το πρότυπο διάλυμα που περιέχει λευκωματίνη και ρυθμιστικό διάλυμα. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τη χρήση του καθαρού διαλύματος (blank sample). Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το πρότυπο διάλυμα και στο τέλος το κάθε υπό εξέταση δείγμα. Η απορρόφηση του πρότυπου διαλύματος και του δείγματος μετρήθηκε στα 600 nm και σε θερμοκρασία 37°C έναντι του καθαρού διαλύματος. Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με βάση τον τύπο: Ολικές πρωτεΐνες ούρου (mg/dl)=απορρόφηση δείγματος/απορρόφηση του προτύπου διαλύματος x συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος.

Η συγκέντρωση της κρεατινίνης προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο σταθερού χρόνου χωρίς απολευκωμάτωση στο ίδιο φασματοφωτόμετρο. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit Creatinine Kinetic<sup>®</sup> (Flowcytogen Laboratories) που περιλαμβάνει αντιδραστήριο υδροξειδίου του νατρίου, πικρικό οξύ και το πρότυπο διάλυμα κρεατινίνης. Το φασματοφωτόμετρο μηδενίστηκε με τη χρήση απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το πρότυπο διάλυμα κρεατινίνης και στο τέλος το κάθε υπό εξέταση δείγμα. Η απορρόφηση του πρότυπου διαλύματος

και του δείγματος μετρήθηκε στα 492 nm και σε θερμοκρασία 37°C έναντι του απεσταγμένου νερού αμέσως και μετά από επώαση 30 sec. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η διαφορά των απορροφήσεων μεταξύ των δύο χρόνων. Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης έγινε με βάση τον τύπο: Κρεατινίνη ούρου (mg/dl)=100 x διαφορά απορρόφησης δείγματος στους δύο χρόνους/διαφορά απορρόφησης προτύπου διαλύματος στους δυο χρόνους. Ο λόγος πρωτεΐνες/κρεατινίνη δε μετρήθηκε στα δείγματα εκείνα όπου υπήρξε υποψία ουρολοίμωξης, η οποία στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε με την καλλιέργεια για αερόβια βακτήρια καθώς και σε περίπτωση μακροσκοπικής αιματοουρίας.

#### **14. Ορολογικές εξετάσεις για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *Bartonella henselae***

Για την ανίχνευση αντιγόνου του FeLV και αντισωμάτων έναντι του FIV χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη συσκευή SNAP FIV antibody/FeLV antigen (IDEXX) και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του παρασκευαστή και η Τ.Δ.Λ. LVMEDUTH-PRC-010.

Για τις υπόλοιπες ορολογικές εξετάσεις εφαρμόστηκε η IFAT και χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα αντιδραστήρια (Fuller Laboratories) για την ανίχνευση IgG ανοσοσφαιρινών έναντι του FCV, IgG και IgM έναντι του *T. gondii* και IgG έναντι της *B. henselae*. Η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή και υιοθετήθηκαν τα προτεινόμενα όρια διαχωρισμού (1/20, 1/16, 1/16 και 1/64, αντίστοιχα) για να θεωρηθεί θετικό το αποτέλεσμα.

#### **15. Παρασιτολογική εξέταση κοπράνων**

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η απλή παρασιτολογική εξέταση με την ανάμιξη, στην επιφάνεια αντικειμενοφόρου πλάκας, μικρής ποσότητας κοπράνων με 1-2 σταγόνες φυσιολογικού ορού. Μετά την ομογενοποίηση και την προσθήκη καλυπτρίδας, το παρασκεύασμα εξεταζόταν σε μεγέθυνση 100x (Τ.Δ.Λ. LVMEDUTH-PRC-018).

Στη συνέχεια, σε όλα τα δείγματα και ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα της απλής εξέτασης, γινόταν παρασιτολογική εξέταση με τη μέθοδο Telean, σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία: σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεντο περίπου 1 g κοπράνων και 5-6 ml διαλύματος HCl 16% που μετά την ομογενοποίησή τους διηθούνταν μέσω μεταλλικού πλέγματος και μεταφέρονταν σε καινούριο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθούσε η προσθήκη 5-6 ml αιθέρα, η έντονη ανάδευση του μίγματος

και η φυγοκέντρωση στις 1.500 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια απορριπτόταν το υπερκείμενο υγρό και λαμβανόταν μια σταγόνα από το ίζημα που μεταφερόταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και ύστερα από προσθήκη καλυπτρίδας εξετάζονταν μικροσκοπικά σε μεγέθυνση 100x (Τ.Δ.Λ. LVMEDUTH-PRC-019)

## **16. Διάφορες άλλες εργαστηριακές εξετάσεις στις γάτες της ομάδας Β**

Εκτός από τις παραπάνω εξετάσεις, στην προσπάθεια να επιτευχθεί η κατά το δυνατόν ακριβέστερη αιτιολογική διάγνωση στις γάτες της ομάδας Β πραγματοποιήθηκε πλήθος επιπρόσθετων εργαστηριακών εξετάσεων, ανάλογα βέβαια και με τις επιθυμίες και τις οικονομικές δυνατότητες του ιδιοκτήτη τους.

Σε όλες τις γάτες που εμφάνιζαν δερματικές αλλοιώσεις, εκτός από την ιστοπαθολογική (βλ. παραπάνω) έγινε κυτταρολογική εξέταση με τεχνική που διέφερε ανάλογα με τη μορφολογία των αλλοιώσεων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν:

- α) η τεχνική της συγκολλητικής ταινίας σε περιοχές με φολίδες ή ξηρές εφελκίδες κάτω από τις οποίες η επιδερμίδα δεν εμφάνιζε έλκη ή διαβρώσεις,
- β) η τεχνική του επιχρίσματος αποτύπωσης σε περιοχές με βλατίδες, πλάκες, φλύκταινες, άλλες αλλοιώσεις με υγρό περιεχόμενο (ύστερα από επιφανειακή νύξη της αλλοίωσης με βελόνη 21G), καθώς και σε περιοχές με διαβρώσεις, έλκη, συρίγγια ή εξίδρωση (ύστερα από άμεση επαφή της αντικειμενοφόρου πλάκας με την αλλοίωση),
- γ) η τεχνική του επιχρίσματος με απόξεση όταν τα επιχρίσματα αποτύπωσης ήταν υποκυτταρικά,
- δ) η τεχνική του επιχρίσματος ύστερα από παρακέντηση με λεπτή βελόνη (ίδια με εκείνη που εφαρμόστηκε για την παρακέντηση των λεμφογαγγλίων) σε περιοχές με οζίδια, όγκους, αποστήματα ή κύστες και,
- ε) η τεχνική του βαμβακοφόρου στείλεου για τη δειγματοληψία από τον έξω ακουστικό πόρο.

Σε γάτες με πολλαπλές και διαφορετικής μορφολογίας δερματικές αλλοιώσεις επιλέχθηκαν οι περισσότερο αντιπροσωπευτικές από αυτές και χρησιμοποιήθηκαν οι κατά περίπτωση κατάλληλοι συνδυασμοί των παραπάνω τεχνικών δειγματοληψίας.

Και στις 20 γάτες που εμφάνιζαν δερματικές αλλοιώσεις, πραγματοποιήθηκαν παρασιτολογικές εξετάσεις και συγκεκριμένα επιφανειακά και βαθιά ξέσματα από το δέρμα (17/20) και παρασιτολογική εξέταση του έξω ακουστικού πόρου ύστερα από

λήψη υλικού με βαμβακοφόρο στειλεό (10/20). Επιπλέον, σε 10 γάτες έγινε καλλιέργεια για δερματόφυτα σε υπόστρωμα DTM (Agrolabo). Τέλος σε 8 γάτες με δερματικές αλλοιώσεις η οριστική διάγνωση στηρίχθηκε ή υποβοηθήθηκε από την ιστοπαθολογική εξέταση βιοψιών από το δέρμα.

Σε 20 γάτες που εμφάνιζαν συμπτώματα από την κατώτερη ουροφόρο οδό (δυσουρία, στραγγουρία, μακροσκοπική αιματουρία) ή εργαστηριακά ευρήματα (αιματουρία, πυουρία, βακτηριουρία) ύποπτα για ουρολοίμωξη, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια ούρων για αερόβια βακτήρια.

Τέλος σε γάτες με συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων πραγματοποιήθηκαν απεικονιστικές (ακτινογραφήματα θώρακα και κοιλίας, υπερηχοτομογραφική εξέταση κοιλίας) και όπου χρειάστηκε, ιστοπαθολογικές εξετάσεις, προκειμένου να επιτευχθεί όσο το δυνατόν ακριβέστερη τελική διάγνωση.

## 17. Στατιστική ανάλυση

Τα στοιχεία από το ιστορικό που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα μόλυνσης της γάτας από *Leishmania* spp. συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων Α και Β με τη δοκιμή  $\chi^2$  του Pearson ή την ακριβή δοκιμή του Fisher (φυλή, φύλο, μήκος του τριχώματος, συνθήκες διαβίωσης, περιοχή διαβίωσης, παρουσία πυκνής βλάστησης σε ακτίνα 100 μέτρων από το χώρο διαβίωσης, εξέταση την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων ή μετά από αυτή) ή με τη δοκιμή t του Student (ηλικία). Επιπλέον τα αποτελέσματα της ορολογικής εξέτασης για το αντιγόνο του FeLV και τα αντισώματα έναντι του FIV, του FCV, του *T. gondii* και της *B. henselae* καθώς και τα αποτελέσματα της παρασιτολογικής εξέτασης των κοπράνων συγκρίθηκαν μεταξύ των δύο ομάδων με τη δοκιμή  $\chi^2$  του Pearson ή την ακριβή δοκιμή του Fisher.

Η συμφωνία των αποτελεσμάτων της PCR μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών ιστών (αίμα, ιστοτεμάχια δέρματος, μυελός των οστών, υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα) ελέγχθηκε με τη δοκιμή Q του Cochran για να ακολουθήσουν οι ανά δυο συγκρίσεις μεταξύ των ιστών με τη δοκιμή συμμετρίας του McNemar. Η τελευταία δοκιμή χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων της IFAT και της συμφωνίας των αποτελεσμάτων μεταξύ της PCR και της IFAT, της PCR και της ELISA και της IFAT με την ELISA.

Το ενδεχόμενο συσχετισμού μεταξύ της μόλυνσης από *Leishmania* spp. ή του αποτελέσματος της IFAT και των στοιχείων από το ιστορικό που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα μόλυνσης εξετάστηκε, συνολικά και για τις 100 γάτες των ομάδων Α και Β, με τη δοκιμή  $\chi^2$  του Pearson ή την ακριβή δοκιμή του Fisher (φυλή, φύλο, μήκος του τριχώματος, συνθήκες διαβίωσης, περιοχή διαβίωσης, παρουσία πυκνής βλάστησης σε ακτίνα 100 μέτρων από το χώρο διαβίωσης, εξέταση την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων ή μετά από αυτή) και με τη δοκιμή t του Student (ηλικία). Οι πιθανοί συσχετισμοί μεταξύ της μόλυνσης από *Leishmania* spp. ή του αποτελέσματος της IFAT και των στοιχείων από το ιστορικό ή των ευρημάτων από την κλινική εξέταση που θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα της μόλυνσης, δηλαδή την ομάδα στην οποία ανήκε η γάτα και, προκειμένου για τις γάτες της ομάδας Β, τη διαπίστωση δερματικών αλλοιώσεων, συμπτωμάτων από τους οφθαλμούς και συμπτωμάτων που είναι ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και έχουν συνδεθεί με τη λείσμανίωση της γάτας εξετάστηκαν με τη δοκιμή  $\chi^2$  του Pearson ή την ακριβή δοκιμή του Fisher.

Οι πιθανοί συσχετισμοί μεταξύ της μόλυνσης από *Leishmania* spp. και της διαπίστωσης παθολογικών ευρημάτων από την αιματολογική εξέταση, τις βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος και την ανάλυση των ούρων, εξετάστηκαν, χωριστά για τις ομάδες Α και Β, με το Pearson's  $\chi^2$  test ή το Fisher's exact test. Τέλος οι πιθανοί συσχετισμοί μεταξύ της μόλυνσης από *Leishmania* spp. ή του αποτελέσματος της IFAT και του αποτελέσματος της ορολογικής εξέτασης για το αντιγόνο του FeLV και τα αντισώματα έναντι του FIV, του FCV, του *T. gondii* και της *B. henselae* και των αποτελεσμάτων της παρασιτολογικής εξέτασης των κοπράνων εξετάστηκαν, συνολικά και για τις 100 γάτες των ομάδων Α και Β, με το Pearson's  $\chi^2$  test ή το Fisher's exact test.

Η διαγνωστική αξία της IFAT για όλα τα πιθανά όρια διαχωρισμού ώστε να θεωρηθεί θετικό το αποτέλεσμα εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της θετικής και της αρνητικής προγνωστικής αξίας και του δείκτη του Youden που ορίζεται ως ευαισθησία + ειδικότητα - 1. Η διαγνωστική αξία της ELISA για όλα τα πιθανά όρια διαχωρισμού που βρίσκονταν μεταξύ της μέγιστης OD των 100 γατών της μελέτης και της μέσης OD των 75 ορών αίματος των γατών από τις Η.Π.Α. εκτιμήθηκε με καμπύλη ROC, για την οποία υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη.



Οι ανάλυση έγινε με το λογισμικό Stata 13 (Stata Corp) και το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%.

## Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Στοιχεία ταυτότητας των γατών, συνθήκες διαβίωσης, διάφορα άλλα στοιχεία από το ιστορικό και χρόνος εξέτασης

Από τις 100 γάτες της μελέτης οι 92 ανήκαν στην κοινή Ευρωπαϊκή φυλή ενώ οι υπόλοιπες οκτώ σε καθαρόαιμες φυλές και συγκεκριμένα στις Siamese (6/8), Birman (1/8) και Persian (1/8). Οι 50 γάτες ήταν αρσενικού και οι υπόλοιπες 50 θηλυκού γένους, η ηλικία τους κυμαινόταν από 1 μέχρι 24 ετών (μέσος  $\pm$  SD: 4,92  $\pm$  4,43 χρόνια) και το σωματικό τους βάρος από 2,1 μέχρι 7,5 Kg (διάμεσος: 3,75 Kg). Τέλος οι 89 γάτες ήταν βραχύτριχες και οι υπόλοιπες 11 μακρύτριχες (Παράρτημα-Πίνακας Π1).

Οι 40 από τις γάτες ζούσαν μέσα σε σπίτι, οι 43 σε εξωτερικούς χώρους και οι υπόλοιπες 17 τόσο μέσα σε σπίτι όσο και σε εξωτερικούς χώρους. Οι περισσότερες από τις γάτες ζούσαν σε ημιαστικές περιοχές (57/100) και οι υπόλοιπες σε αστικές (40/100) και αγροτικές (3/100), ενώ παρουσία πυκνής βλάστησης σε ακτίνα 100 μέτρων από το χώρο διαβίωσής τους αναφέρθηκε από τους ιδιοκτήτες 15 γατών.

Οι 47 γάτες διατρέφονταν με ξηρή και οι τέσσερις με κονσερβοποιημένη τροφή του εμπορίου, οι πέντε με μαγειρεμένη τροφή και οι υπόλοιπες 44 με συνδυασμούς των παραπάνω. Οι 48 γάτες ήταν πλήρως εμβολιασμένες, οι 21 μερικώς εμβολιασμένες και οι υπόλοιπες 31 ανεμβολίαστες. Συμπτώματα που είχαν διαπιστωθεί τον τελευταίο χρόνο αλλά δεν υπήρχαν την ημέρα της εξέτασης αναφέρθηκαν από τους ιδιοκτήτες πέντε γατών και περιλάμβαναν το οφθαλμικό και ρινικό έκκριμα (2/5) πιθανότατα λόγω του συνδρόμου της λοίμωξης της ανώτερης αναπνευστικής οδού της γάτας, την υποτρίχωση στον τράχηλο και τον κορμό του σώματος (1/5), τις επιληπτικές κρίσεις (1/5) και συμπτώματα (πολλακιουρία, δυσουρία και αιματουρία) που είναι ενδεικτικά του συνδρόμου της κατώτερης ουροφόρου οδού της γάτας (1/5). Σε 21 γάτες είχαν χορηγηθεί φάρμακα τους τελευταίους 3 μήνες πριν από την εξέταση και συγκεκριμένα διάφορα αντιμικροβιακά (αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ, κεφουροξίμη, κεφοβεξίνη, κλινδαμυκίνη, δοξυκυκλίνη) σε 12/21 γάτες, εξωπαρασιτοκτόνα (σελαμεκτίνη, φιπρονίλη) σε 5/21 γάτες, ινσουλίνη Lente σε 2/21 γάτες, βουτορφανόλη σε 1/21 γάτες και ενέσιμη οξεϊκή μεθυλοπρεδνιζολόνη μακράς δράσης σε 1/21 γάτες (η τελευταία είχε χορηγηθεί 3 μήνες πριν από την εξέταση).

Οι 62 γάτες εξετάστηκαν μεταξύ Απριλίου και Νοεμβρίου, δηλαδή την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων στη χώρα μας (Chaniotis et al., 1994) και οι 38 τους υπόλοιπους μήνες του έτους. Επιπλέον, προκειμένου για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των ορολογικών εξετάσεων IFAT και ELISA, οι 64 γάτες εξετάστηκαν από το Μάιο μέχρι και το Δεκέμβριο (περίοδος δραστηριότητας των φλεβοτόμων μετατοπισμένη κατά ένα μήνα) και οι 36 τους υπόλοιπους μήνες του έτους.

Η σύγκριση των στοιχείων από το ιστορικό που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα μόλυνσης από *Leishmania* spp. μεταξύ των δύο ομάδων των γατών της μελέτης (Πίνακας 1) έδειξε ότι οι ασθενείς γάτες (ομάδα Β) είχαν μεγαλύτερη ηλικία ( $P<0,001$ ), ζούσαν λιγότερο συχνά σε εξωτερικούς χώρους ( $P=0,001$ ) και ζούσαν συχνότερα σε αστικές από ότι σε ημιαστικές περιοχές ( $P=0,01$ ), σε σύγκριση με τις κλινικά υγιείς γάτες (ομάδα Α).

**Πίνακας 1.** Σύγκριση των στοιχείων από το ιστορικό που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα μόλυνσης της γάτας από *Leishmania* spp. μεταξύ των κλινικά υγιών (ομάδα Α) και των ασθενών (ομάδα Β) γατών

	<b>Ομάδα Α</b>	<b>Ομάδα Β</b>	<b>Τιμή P</b>
Φυλή			0,059
Κοινή Ευρωπαϊκή	49/50 (98%)	43/50 (86%)	
Καθαρόαιμη	1/50 (2%)	7/50 (14%)	
Γένος			0,23
Αρσενικό	28/50 (56%)	22/50 (44%)	
Θηλυκό	22/50 (44%)	28/50 (56%)	
Ηλικία σε έτη (μέσος ± SD)	3,18 ± 2,25	6,65 ± 5,33	<0,001
Μήκος τριχώματος			0,338
Βραχύτριχες	46/50 (92%)	43/50 (86%)	
Μακρύτριχες	4/50 (8%)	7/50 (14%)	
Συνθήκες διαβίωσης			<0,001
Σπίτι	15/50 (30%)	25/50 (50%)	
Εξωτερικοί χώροι	32/50 (64%)	11/50 (22%)	
Σπίτι και εξωτερικοί χώροι	3/50 (6%)	14/50 (28%)	
Περιοχή διαβίωσης			0,019
Αστική	14/50 (28%)	26/50 (52%)	
Ημιαστική	35/50 (70%)	22/50 (44%)	
Αγροτική	1/50 (2%)	2/20 (4%)	
Πυκνή βλάστηση σε ακτίνα 100 μέτρων από το χώρο διαβίωσης			0,161
Ναι	5/50 (10%)	10/50 (20%)	
Όχι	45/50 (90%)	40/50 (80%)	
Εξέταση μεταξύ Απριλίου και Νοεμβρίου			0,216
Ναι	28/50 (56%)	34/50 (68%)	
Όχι	22/50 (44%)	16/50 (32%)	
Εξέταση μεταξύ Μαΐου και Δεκεμβρίου			1
Ναι	32/50 (64%)	32/50 (64%)	
Όχι	18/50 (36%)	18/50 (36%)	

## 2. Συμπτώματα και διαγνώσεις στις γάτες της ομάδας B

Δερματικές αλλοιώσεις που έχουν αναφερθεί σε γάτες με λεισμανίωση, βρέθηκαν σε 18/50 (36%) γάτες και ήταν, κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας, η αλωπεκία-υποτρίχωση (13/50-26%), οι εφελκίδες (8/20-16%), τα έλκη (7/50-14%), οι βλατίδες (6/50-12%), η βλεφαρίτιδα (3/50-6%) και οι φολίδες (2/50-4%), ενώ δε διαπιστώθηκαν οζίδια, ονχογρύπωση, κύστεις με αιμορραγικό περιεχόμενο ή ποδοδερματίτιδα. Στις υπόλοιπες δερματικές αλλοιώσεις που βρέθηκαν στις γάτες της ομάδας B περιλαμβάνονται οι μάζες (7/50-14%), το ερύθημα (5/50-10%), οι δρυφάδες (5/50-10%) και η υπερκεράτωση του ακρορρινίου (1/50-2%).

Από τα συμπτώματα από τους οφθαλμούς που έχουν αναφερθεί σε γάτες με λεισμανίωση, βρέθηκε μόνο η επιπεφυκίτιδα σε 1/50 (2%) γάτες.

Με βάση το ιστορικό και την κλινική εξέταση, συμπτώματα που είναι ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και έχουν συνδεθεί με τη λεισμανίωση της γάτας, βρέθηκαν σε 28/50 (56%) γάτες και ήταν, κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας, η ανορεξία (18/50-36%), οι έμετοι (10/50-20%), η διάρροια (6/50-12%), η περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία (5/50-10%), η ηπατομεγαλία (4/50-8%), η ικτερική χροιά των ορατών βλεννογόνων (3/50-6%) και η σπληνομεγαλία (1/50-2%). Από τα υπόλοιπα συμπτώματα που είναι ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και ορισμένα από τα οποία έχουν αναφερθεί σε γάτες με λεισμανίωση, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να οφείλονται σε αυτή, διαπιστώθηκαν, κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας, κατάπτωση (14/50-28%), αντίδραση πόνου κατά την ψηλάφηση της κοιλίας (7/50-14%), κακή θρεπτική κατάσταση (5/50-10%), δύσπνοια (5/50-10%), δυσουρία-στραγγουρία (4/50-8%), ψηλαφητή ενδοκοιλιακή μάζα (3/50-6%), αταξία (3/50-6%), παρουσία ελεύθερου υγρού στην κοιλιακή κοιλότητα (2/50-4%), μακροσκοπική αιματουρία (2/50-4%), σιελόρροια (1/50-2%), ρινικό έκκριμα (1/50-2%), υγροί ρόγχοι (1/50-2%), αρρυθμίες (1/50-2%), νεφρομεγαλία (1/50-2%), πυοαιμορραγικό κοιλιακό έκκριμα (1/50), μυϊκός τρόμος (1/50-2%), πτώση του άνω βλεφάρου (1/50-2%), μύση (1/50-2%) και τετραπληγία (1/50-2%).

Συνολικά οι 40/50 (80%) γάτες της ομάδας B εμφάνιζαν μια τουλάχιστον δερματική αλλοίωση ή ένα τουλάχιστον σύμπτωμα από τους οφθαλμούς ή ένα τουλάχιστον σύμπτωμα ενδεικτικό της προσβολής των εσωτερικών οργάνων που θα μπορούσε να οφείλεται στη λεισμανίωση.

Στις κατά το δυνατόν ακριβέστερες τελικές διαγνώσεις των γατών της ομάδας Β περιλαμβάνονται, κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας, οι αλλεργικές δερματίτιδες (13/50-26%), οι ουρολοιμώξεις (7/50-14%), οι ηπατοπάθειες (6/50-12%) στις οποίες περιλαμβάνεται η χολαγγειοηπατίτιδα και η λιποείδωση του ήπατος, η λοίμωξη από FIV (6/50-12%), τα νεοπλάσματα του δέρματος (5/50-10%), ο σακχαρώδης διαβήτης (4/50-8%), η βακτηριακή δερματίτιδα (3/50-6%), η δερματοφυτίωση από το *Microsporium canis* (3/50-6%), η ιδιοπαθής μορφή του συνδρόμου της κατώτερης ουροφόρου οδού της γάτας (3/50-8%), η παρασίτωση από ψύλλους (2/50-4%), η έξω ή μέση ωτίτιδα (2/50-4%), οι υπεζωκοτικές συλλογές (2/50-4%), η παρασίτωση από *Toxocara cati* (2/50-4%), η οξεία νεφρική ανεπάρκεια (2/50-4%), το πολυκεντρικό λέμφωμα (2/50-4%) σε FeLV-αρνητικές γάτες, η λοίμωξη από FeLV (2/50-4%), η αγνώστου αιτιολογίας απώλεια βάρους (2/50-4%), η ωτοδηκτική ψώρα (1/50-2%), η φαρμακευτική δερματίτιδα (1/50-2%), οι οργανοειδείς σπίλοι του δέρματος (1/50-2%), τα εγκαύματα (1/50-2%), η περιοδοντική νόσος (1/50-2%), το σύνδρομο της ανώτερης αναπνευστικής οδού της γάτας (1/50-2%), το μη καρδιογενές πνευμονικό οίδημα (1/50-2%), το νεόπλασμα του πρόσθιου μεσοπνευμονίου (1/50-2%), το σύνδρομο Horner (1/50-2%), η έμφραξη του λεπτού εντέρου από γραμμοειδές ξένο σώμα (1/50-2%), ο ασκίτης (1/50-2%), η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (1/50-2%), τα νεοπλάσματα των μαστών (1/50-2%) και η πυομήτρα (1/50-2%),

### **3. Ταυτοποίηση του είδους της *Leishmania***

Η *in silico* ανάλυση ομολογίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR και η σύγκρισή της με εκείνη των διαφόρων ειδών του παρασίτου που έχουν κατατεθεί στην βάση δεδομένων GenBank έδειξε ότι τα πρώτα είχαν >99% ομολογία με εκείνα της *L. infantum*. Με βάση το αποτέλεσμα αυτό, όλες οι γάτες της μελέτης που ήταν θετικές στην PCR θεωρήθηκε ότι ήταν μολυσμένες από τη *L. infantum*.

### **4. Συχνότητα μόλυνσης από *L. infantum* με βάση το αποτέλεσμα της PCR**

Κατά τη μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο χάθηκαν ένα ιστοτεμάχιο δέρματος από την περιοχή της λαγόνιας ακρολοφίας (γάτα B-8) και τέσσερα δείγματα υλικού απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα (γάτες B-6, B-26, B-46 και B-48). Στα υπόλοιπα δείγματα το αποτέλεσμα της PCR ήταν θετικό (Πίνακας 2 και Παράρτημα-Πίνακας Π2) σε ποσοστό που κυμαίνονταν από 2,2% (υλικό απόξεσης

επιπεφυκότητα από τις γάτες της ομάδας Β) μέχρι και 26,5% (ιστοτεμάχια από το δέρμα της λαγόνιας ακρολοφίας και των δερματικών αλλοιώσεων στις γάτες της ομάδας Β) και στις περισσότερες περιπτώσεις (80,5%) μολυσμένων γατών η PCR ήταν θετική σε ένα μόνο από τους τέσσερις ιστούς που εξετάστηκαν (Πίνακας 3 και Παράρτημα-Πίνακας Π2). Συνολικά, με βάση το αποτέλεσμα της PCR το 41% των γατών της μελέτης και συγκεκριμένα οι 21/50 (42%) γάτες της ομάδας Α και οι 20/50 (40%) γάτες της ομάδας Β ήταν μολυσμένες από τη *L. infantum* (Πίνακας 2 και Παράρτημα-Πίνακας Π2).

**Πίνακας 2.** Συχνότητα ανίχνευσης του DNA της *L. infantum* σε τέσσερις διαφορετικούς ιστούς από τις γάτες των ομάδων Α και Β

<b>Ιστοί</b>	<b>Ομάδα Α</b>	<b>Ομάδα Β</b>	<b>Ομάδα Α+Β</b>
Αίμα	10/50 (20%)	3/50 (6%)	13/100 (13%)
Δέρμα (ΛΑ)	5/50 (10%)	10/49 (20,4%)	15/99 (15,2%)
Δέρμα (ΑΛ)	-	3/20 (15%)	3/20 (15%)
Δέρμα (ΛΑ + ΑΛ)	5/50 (10%)	13/49 (26,5%)	18/99 (18,2%)
Μυελός των οστών	9/50 (18%)	7/50 (14%)	16/100 (16%)
Επιπεφυκότητας	2/50 (4%)	1/46 (2,2%)	3/96 (3,1%)
Όλοι οι ιστοί	21/50 (42%)	20/50 (40%)	41/100 (41%)

Συντημήσεις:

ΑΛ: ιστοτεμάχια από σημεία με δερματικές αλλοιώσεις στις γάτες της ομάδας Β, ΛΑ: ιστοτεμάχια από το δέρμα της λαγόνιας ακρολοφίας

**Πίνακας 3.** Συχνότητα ανίχνευσης του DNA της *L. infantum* σε ένα ή περισσότερους από τους τέσσερεις διαφορετικούς ιστούς που εξετάστηκαν στις μολυσμένες γάτες των ομάδων A και B

<b>Ιστοί</b>	<b>Ομάδα A</b>	<b>Ομάδα B</b>	<b>Ομάδα A+B</b>
<b>Θετικό αποτέλεσμα της PCR σε ένα μόνο ιστό</b>			
Αίμα	8/21 (38,1%)	1/20 (5%)	9/41 (22%)
Δέρμα	2/21 (9,5%)	11/20 (55%)	13/41 (31,7%)
Μυελός των οστών	5/21 (23,8%)	4/20 (20%)	9/41 (22%)
Επιπεφυκότας	1/21 (4,8%)	1/20 (5%)	2/41 (4,9%)
<b>Θετικό αποτέλεσμα της PCR σε δύο ιστούς</b>			
Αίμα + δέρμα	1/21 (4,8%)	-	1/41 (2,4%)
Αίμα + μυελός των οστών	1/21 (4,8%)	1/20 (5%)	2/41 (4,9%)
Δέρμα + μυελός των οστών	2/21 (9,5%)	1/20 (5%)	3/41 (7,3%)
Μυελός των οστών + επιπεφυκότας	1/21 (4,8%)	-	1/41 (2,4%)
<b>Θετικό αποτέλεσμα της PCR σε τρεις ιστούς</b>			
Αίμα + δέρμα + μυελός των οστών	-	1/20 (5%)	1/41 (2,4%)

Το αποτέλεσμα της PCR διέφερε ( $P=0,014$ ) μεταξύ των τεσσάρων ιστών (αίμα, ιστοτεμάχια δέρματος, μυελός των οστών, υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα) που εξετάστηκαν. Στις ανά δύο μεταξύ των ιστών συγκρίσεις βρέθηκε ότι το αποτέλεσμα της PCR ήταν συχνότερα θετικό στα ιστοτεμάχια του δέρματος ( $P=0,007$ ) και το μυελό των οστών ( $P=0,007$ ) σε σύγκριση με το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα.

Ο μόνος συσχετισμός που βρέθηκε μεταξύ του αποτελέσματος της PCR και των στοιχείων από το ιστορικό που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα μόλυνσης από *L. infantum* αφορούσε την περίοδο του χρόνου που εξετάστηκαν οι γάτες (Πίνακας 4). Συγκεκριμένα, η πιθανότητα μόλυνσης ήταν μεγαλύτερη για τις γάτες εκείνες που εξετάστηκαν την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων (από τον Απρίλιο μέχρι και το Νοέμβριο) σε σύγκριση με τις γάτες που εξετάστηκαν μετά από αυτή ( $P=0,022$ ) με  $OR=2,44$  και  $95\% CI=1,014-5,881$ .



**Πίνακας 4.** Ανάλυση των συσχετισμών μεταξύ της μόλυνσης από *L. infantum* και των στοιχείων από το ιστορικό που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα της μόλυνσης

	<b>Μολυσμένες</b>	<b>Μη μολυσμένες</b>	<b>Τιμή P</b>
Φυλή			0,713
Κοινή Ευρωπαϊκή	37/92 (40,2%)	55/92 (59,8%)	
Καθαρόαιμη	4/8 (50%)	4/8 (50%)	
Γένος			0,222
Αρσενικό	17/50 (34%)	33/50 (66%)	
Θηλυκό	24/50 (48%)	26/50 (52%)	
Ηλικία σε έτη (μέσος ± SD)	4,9 ± 4,9	4,9 ± 4,1	0,981
Μήκος τριχώματος			1
Βραχύτριχες	37/89 (41,6%)	52/89 (58,4%)	
Μακρύτριχες	4/11 (36,4%)	7/11 (63,6%)	
Συνθήκες διαβίωσης			0,327
Σπίτι	15/40 (37,5%)	25/40 (62,5%)	
Εξωτερικοί χώροι	21/43 (48,8%)	22/43 (51,2%)	
Σπίτι και εξωτερικοί χώροι	5/17 (29,4%)	12/17 (70,6%)	
Περιοχή διαβίωσης			0,942
Αστική	17/40 (42,5%)	23/40 (57,5%)	
Ημιαστική	23/57 (40,4%)	34/57 (59,6%)	
Αγροτική	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	
Πυκνή βλάστηση σε ακτίνα 100 μέτρων από το χώρο διαβίωσης			0,777
Ναι	7/15 (46,7%)	8/15 (53,3%)	
Όχι	34/85 (40%)	51/85 (60%)	
Εξέταση μεταξύ Απριλίου και Νοεμβρίου			0,022
Ναι	31/62 (50%)	31/62 (50%)	
Όχι	10/38 (26,3%)	28/38 (73,7%)	

Η πιθανότητα μόλυνσης από τη *L. infantum* δε διέφερε μεταξύ των γατών των ομάδων Α και Β ( $P=0,839$ ) και ο μόνος συσχετισμός που διαπιστώθηκε μεταξύ της μόλυνσης και των στοιχείων από το ιστορικό ή των ευρημάτων από την κλινική εξέταση που θα μπορούσαν να είναι το αποτέλεσμα της μόλυνσης, ήταν η αυξημένη

πιθανότητα διαπίστωσης στις μολυσμένες γάτες ενός τουλάχιστον από τα συμπτώματα που είναι ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και έχουν συνδεθεί με τη λείσμανίωση της γάτας ( $P=0,042$ ) με  $OR=3,93$  και  $95\% CI=1,132-13,602$  (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5.** Ανάλυση των συσχετισμών μεταξύ της μόλυνσης από *L. infantum* και της διαπίστωσης δερματικών αλλοιώσεων, συμπτωμάτων από τους οφθαλμούς και συμπτωμάτων που είναι ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και έχουν συνδεθεί με τη λείσμανίωση της γάτας

	<b>Μολυσμένες</b>	<b>Μη μολυσμένες</b>	<b>Τιμή P</b>
<b>Δερματικές αλλοιώσεις</b>			
Αλωπεκία-υποτρίχωση	5/13 (38,5%)	8/13 (61,5%)	1
Εφελκίδες	2/8 (25%)	6/8 (75%)	0,45
Έλκη	3/7 (42,9%)	4/7 (57,1%)	1
Βλατίδες	2/6 (33,3%)	4/6 (66,7%)	1
Βλεφαρίτιδα	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	1
Φολίδες	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0.51
Τουλάχιστον μια	6/18 (33.3%)	12/18 (66.7%)	0.556
<b>Συμπτώματα από τους οφθαλμούς</b>			
Επιπεφυκίτιδα	0/1 (0%)	1/1 (100%)	1
<b>Συμπτώματα ενδεικτικά προσβολής των εσωτερικών οργάνων</b>			
Ανορεξία	10/18 (55,6%)	8/18 (44,4%)	0,134
Έμετοι	6/10 (60%)	4/10 (40%)	0,171
Διάρροια	3/6 (50%)	3/6 (30%)	0,672
Περιφερική λεμφαδενομεγαλία	2/5 (40%)	3/5 (60%)	1
Ηπατομεγαλία	3/4 (75%)	1/4 (25%)	0,289
Ικτερική χροιά ορατών βλεννογόνων	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0,058
Σπληνομεγαλία	0/1 (0%)	1/1 (100%)	1
Τουλάχιστον ένα	15/28 (53,6%)	13/28 (46,4%)	0,042
<b>Δερματικές αλλοιώσεις ή συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά προσβολής των εσωτερικών οργάνων</b>			
Τουλάχιστον μία/ένα	18/40 (45%)	22/40 (55%)	0,279

## 5. Παρασιτικό φορτίο με βάση το αποτέλεσμα της real-time PCR

Το παρασιτικό φορτίο ήταν μικρότερο από το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της real-time PCR σε 19/50 (38%) από τα δείγματα που ήταν θετικά με την PCR και συγκεκριμένα σε 1/13 (7,7%) δείγματα αίματος, σε 7/15 (46,7%) ιστοτεμάχια δέρματος από τη λαγόνια ακρολοφία, σε 0/3 (0%) ιστοτεμάχια από δερματικές αλλοιώσεις των γατών της ομάδας B, σε 10/16 (62,5%) δείγματα μυελού των οστών και σε 1/3 (33,3%) δείγματα υλικού απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα (Παράρτημα-Πίνακας Π3). Στα υπόλοιπα δείγματα, ο αριθμός των *L. infantum*/ml κυμαινόταν από 28-238 (διάμεσος: 87) για το αίμα, από 29-325 (διάμεσος: 96) για τα ιστοτεμάχια του δέρματος (τόσο αυτά που πάρθηκαν από τη λαγόνια ακρολοφία όσο και εκείνα από τις δερματικές αλλοιώσεις των γατών της ομάδας B), από 26-352 (διάμεσος: 131) για το μυελό των οστών και από 198-283 (διάμεσος: 241) για τον επιπεφυκότα. Λόγω του πολύ μικρού αριθμού των γατών (n=8, Πίνακας 3) όπου η PCR ήταν θετική σε περισσότερους από ένα ιστούς οι οποίοι στη συνέχεια εξετάστηκαν με τη real-time PCR, δεν επιχειρήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της τελευταίας.

## 6. Κυτταρολογικές εξετάσεις

Συνολικά 19/100 (19%) επιχρίσματα υλικού παρακέντησης λεμφογαγγλίου (10 από τις γάτες της ομάδας A και 9 από τις γάτες της ομάδας B) εκτιμήθηκαν ως υποκυτταρικά και σε ορισμένα μάλιστα από αυτά δεν υπήρχαν καθόλου λεμφοκύτταρα. Αντίθετα η ποιότητα όλων των υπόλοιπων επιχρισμάτων εκτιμήθηκε ως ικανοποιητική για το σκοπό της μελέτης.

Σε κανένα από τα επιχρίσματα από τη στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη, το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνου του απευθυσμένου, το υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, τις δερματικές αλλοιώσεις των γατών της ομάδας B, το μυελό των οστών και το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα δε βρέθηκαν αμαστιγιφόρες *Leishmania* spp. ή άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί (στα επιχρίσματα του υλικού απόξεσης από το βλεννογόνου του απευθυσμένου υπήρχαν άφθονοι ελεύθεροι μικροοργανισμοί χωρίς όμως να συνοδεύονται από φλεγμονικά κύτταρα).

## 7. Ορολογικές εξετάσεις για IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες έναντι της *Leishmania spp.*

Επειδή κανένας από τους 75 ορούς αίματος των γατών από τις Η.Π.Α. δεν αντέδρασε στη μικρότερη αραιώση (1/10), ως όριο διαχωρισμού για να θεωρηθεί θετικό το αποτέλεσμα της IFAT, τόσο για την IgG όσο και για την IgM έναντι της *Leishmania spp.*, ορίστηκε η αραιώση 1/10. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της IFAT για την ανίχνευση IgG έναντι της *Leishmania spp.* ήταν ικανοποιητική, αφού διαπιστώθηκε σημαντική συμφωνία ( $P=0.689$ ) μεταξύ των αποτελεσμάτων της πρώτης και της δεύτερης εξέτασης των ίδιων ορών. Συγκεκριμένα, στην πρώτη εξέταση οι 34 οροί ήταν αρνητικοί και ο ένας θετικός ενώ στη δεύτερη εξέταση και οι 35 ήταν αρνητικοί.

Αναφορικά με την ELISA, η μέση OD και η SD των 75 ορών αίματος των γατών από τις Η.Π.Α. ήταν 0,089 και 0,014, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, το όριο διαχωρισμού για να θεωρηθεί θετικό το αποτέλεσμα ορίστηκε στην OD 0,145 (μέση OD των αρνητικών μαρτύρων + 4 SD) ενώ τα δείγματα με OD μεταξύ 0,117 (μέση OD των αρνητικών μαρτύρων + 2 SD) και 0,144 θεωρήθηκαν ύποπτα (Solano-Gallego et al., 2007).

Με βάση τα αποτελέσματα της IFAT το 10% των γατών της μελέτης είχαν μικρούς τίτλους (1/20 σε δύο γάτες και 1/40 σε οκτώ γάτες) IgG ανοσοσφαιρινών έναντι της *Leishmania spp.* Συγκεκριμένα, το αποτέλεσμα της εξέτασης ήταν θετικό σε 5/50 (10%) γάτες της ομάδας A και 5/50 (10%) γάτες της ομάδας B (Παράρτημα-Πίνακας Π4). Αντίθετα η ELISA ήταν θετική μόνο σε μια γάτα της ομάδας A, όπου η OD (0,154) ήταν μόλις 5,9% μεγαλύτερη από το όριο διαχωρισμού (0,145), ενώ η ίδια γάτα ήταν αρνητική με την IFAT (Παράρτημα-Πίνακας Π4). Επιπλέον, το αποτέλεσμα της ELISA ήταν αμφίβολο (OD: 0.125) σε μια ακόμα γάτα της ομάδας A που επίσης ήταν αρνητική με την IFAT.

Με βάση τα αποτελέσματα της IFAT, μια μόνο γάτα από την ομάδα A είχε μικρό τίτλο (1/20) IgM ανοσοσφαιρινών έναντι της *Leishmania spp.* Η ίδια γάτα ήταν θετική με την IFAT για IgG ανοσοσφαιρίνες έναντι της *Leishmania spp.* (τίτλος 1/40) αλλά αρνητική με την ELISA (Παράρτημα-Πίνακας Π4) και εξετάστηκε στα μέσα Ιανουαρίου του 2009.

Τα αποτελέσματα της IFAT για IgG ( $P<0,001$ ), της ELISA ( $P<0,001$ ) και της IFAT για IgM ( $P<0,001$ ) διέφεραν σημαντικά σε σύγκριση με εκείνα της PCR και τα αποτελέσματα της IFAT για IgG και της ELISA διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους

( $P=0,039$ ). Η διαγνωστική ευαισθησία όλων των παραπάνω ορολογικών εξετάσεων ήταν πάρα πολύ μικρή, αλλά η ειδικότητα της ELISA και της IFAT για IgM ήταν 100% (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6.** Ευαισθησία και ειδικότητα της IFAT για IgG και IgM και της ELISA για IgG για τη διάγνωση της μόλυνσης από *L. infantum* στις γάτες της μελέτης

	<b>Ευαισθησία</b>	<b>Ειδικότητα</b>
	<b>IFAT για IgG</b>	
Ομάδα A	3/21 (14,3%)	27/29 (93,1%)
Ομάδα B	2/20 (10%)	27/30 (90%)
Ομάδα A + B	5/41 (12,2%)	54/59 (91,5%)
	<b>ELISA για IgG</b>	
Ομάδα A	1/21 (4,8%)	29/29 (100%)
Ομάδα B	0/20 (0%)	30/30 (100%)
Ομάδα A + B	1/41 (2,4%)	59/59 (100%)
	<b>IFAT για IgM</b>	
Ομάδα A	1/21 (4,8%)	29/29 (100%)
Ομάδα B	0/20 (0%)	30/30 (100%)
Ομάδα A + B	1/41 (2,4%)	59/59 (100%)

Δε βρέθηκε κανένας συσχετισμός μεταξύ του αποτελέσματος της IFAT για IgG έναντι της *Leishmania* spp. και των στοιχείων από το ιστορικό που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα μόλυνσης από *L. infantum* (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7.** Συσχετισμοί μεταξύ του αποτελέσματος της IFAT για IgG έναντι της *Leishmania* spp. και των στοιχείων από το ιστορικό που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πιθανότητα της μόλυνσης

	<b>Θετική IFAT</b>	<b>Αρνητική IFAT</b>	<b>Τιμή P</b>
<b>Φυλή</b>			1
Κοινή Ευρωπαϊκή	10/92 (10,9%)	82/92 (89,1%)	
Καθαρόαιμη	0/8 (0%)	8/8 (100%)	
<b>Γένος</b>			1
Αρσενικό	5/50 (10%)	45/50 (90%)	
Θηλυκό	5/50 (10%)	45/50 (90%)	
Ηλικία σε έτη (μέσος ± SD)	4,95 ± 3,8	4,91 ± 4,5	0,979
<b>Μήκος τριχώματος</b>			0,596
Βραχύτριχες	10/89 (11,2%)	79/89 (88,8%)	
Μακρύτριχες	0/11 (0%)	11/11 (100%)	
<b>Συνθήκες διαβίωσης</b>			0,393
Σπίτι	6/40 (15%)	34/40 (85%)	
Εξωτερικοί χώροι	3/43 (7%)	40/43 (93%)	
Σπίτι και εξωτερικοί χώροι	1/17 (5,9%)	16/17 (94,1%)	
<b>Περιοχή διαβίωσης</b>			0,348
Αστική	3/40 (7,5%)	37/40 (92,5%)	
Ημιαστική	6/57 (10,5%)	51/57 (89,5%)	
Αγροτική	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	
<b>Πυκνή βλάστηση σε ακτίνα 100 μέτρων από το χώρο διαβίωσης</b>			0,643
Ναι	2/15 (13,3%)	13/15 (86,7%)	
Όχι	8/85 (9,4%)	77/85 (90,6%)	
<b>Εξέταση μεταξύ Μαΐου και Δεκεμβρίου</b>			0,744
Ναι	6/64 (9,4%)	58/64 (90,6%)	
Όχι	4/36 (11,1%)	32/36 (88,9%)	

Η πιθανότητα θετικού αποτελέσματος της IFAT για IgG έναντι της *Leishmania* spp. δε διέφερε μεταξύ των γατών των ομάδων Α και Β ( $P=1$ ) και δε σχετίζονταν με κανένα από τα στοιχεία του ιστορικού ή τα ευρήματα της κλινικής εξέτασης των γατών της ομάδας Β που θα μπορούσαν να είναι το αποτέλεσμα της

μόλυνσης από *L. infantum* (Πίνακας 8). Μάλιστα η πιθανότητα διαπίστωσης τουλάχιστον ενός συμπτώματος ενδεικτικού της προσβολής των εσωτερικών οργάνων που έχει συνδεθεί με τη λείσμανίωση της γάτας, οριακά ( $P=0,058$ ) δεν ήταν μεγαλύτερη στις ορολογικά αρνητικές γάτες.

**Πίνακας 8.** Συσχετισμοί μεταξύ του αποτελέσματος της IFAT για IgG έναντι της *Leishmania* spp. και της διαπίστωσης δερματικών αλλοιώσεων, συμπτωμάτων από τους οφθαλμούς και συμπτωμάτων που είναι ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και έχουν συνδεθεί με τη λείσμανίωση της γάτας

	<b>Θετική IFAT</b>	<b>Αρνητική IFAT</b>	<b>Τιμή P</b>
<b>Δερματικές αλλοιώσεις</b>			
Αλωπεκία-υποτρίχωση	3/13 (23,1%)	10/13 (76,9%)	0,12
Εφελκίδες	1/8 (12,5%)	7/8 (87,5%)	0,583
Έλκη	0/7 (0%)	7/7 (100%)	1
Βλατίδες	2/6 (33,3%)	4/6 (66,7%)	0,109
Βλεφαρίτιδα	0/3 (0%)	3/3 (100%)	1
Φολίδες	0/2 (0%)	2/2 (100%)	1
Τουλάχιστον μια	3/18 (16,7%)	15/18 (83,3%)	0,38
<b>Συμπτώματα από τους οφθαλμούς</b>			
Επιπεφυκίτιδα	0/1 (0%)	1/1 (100%)	1
<b>Συμπτώματα ενδεικτικά προσβολής των εσωτερικών οργάνων</b>			
Ανορεξία	0/18 (0%)	18/18 (100%)	0,201
Έμετοι	0/10 (0%)	10/10 (100%)	0,592
Διάρροια	0/6 (0%)	6/6 (100%)	1
Περιφερική λεμφαδενομεγαλία	0/5 (0%)	5/5 (100%)	1
Ηπατομεγαλία	0/4 (0%)	4/4 (100%)	1
Ικτερική χροιά ορατών βλεννογόνων	0/3 (0%)	3/3 (100%)	1
Σπληνομεγαλία	0/1 (0%)	1/1 (100%)	1
Τουλάχιστον ένα	0/28 (0%)	28/28 (100%)	0,058
<b>Δερματικές αλλοιώσεις ή συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά προσβολής των εσωτερικών οργάνων</b>			
Τουλάχιστον μία/ένα	3/40 (7,5%)	37/40 (92,5%)	0,736

Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί κατά πόσο το όριο διαχωρισμού που επιλέχθηκε μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη μικρή διαγνωστική αξία των ορολογικών εξετάσεων, υπολογίστηκε η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία και ο δείκτης του Youden για όλα τα υπόλοιπα πιθανά όρια διαχωρισμού της IFAT. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 9, ο μεγαλύτερος δείκτης του Youden της IFAT για IgG επιτυγχάνεται όταν ως όριο διαχωρισμού επιλεγεί το 1/40, αφού η ευαισθησία δε μειώνεται (12,2%) ενώ αυξάνει λίγο η ειδικότητα (από 91,5% σε 94,9%) της εξέτασης. Αντίθετα, το όριο διαχωρισμού που επιλέχθηκε ( $\geq 1/10$ ) όπως άλλωστε και το αμέσως επόμενο ( $\geq 1/20$ ) επιτυγχάνουν τον μεγαλύτερο δείκτη του Youden της IFAT για IgM (Πίνακας 10). Για την ELISA για IgG, η περιοχή κάτω από την καμπύλη ήταν μόλις 0,519 (Παράρτημα-Εικόνα 1).

**Πίνακας 9.** Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία (ΘΠΑ), αρνητική προγνωστική αξία (ΑΠΑ) και δείκτης του Youden της IFAT για IgG ανάλογα με το όριο διαχωρισμού για να θεωρηθεί θετικό το αποτέλεσμα

Όριο διαχωρισμού	Ευαισθησία	Ειδικότητα	ΘΠΑ	ΑΠΑ	Δείκτης Youden
$\geq 1/10$	0,122	0,915	0,5	0,6	0,037
$\geq 1/20$	0,122	0,915	0,5	0,6	0,037
$\geq 1/40$	0,122	0,949	0,625	0,609	0,071
$\geq 1/80$	0	1	0		0

**Πίνακας 10.** Ευαισθησία ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία (ΘΠΑ), αρνητική προγνωστική αξία (ΑΠΑ) και δείκτης του Youden της IFAT για IgM ανάλογα με το όριο διαχωρισμού για να θεωρηθεί θετικό το αποτέλεσμα

Όριο διαχωρισμού	Ευαισθησία	Ειδικότητα	ΘΠΑ	ΑΠΑ	Δείκτης Youden
$\geq 1/10$	0,024	1	1	0,596	0,024
$\geq 1/20$	0,024	1	1	0,596	0,024
$\geq 1/40$	0	1	0	0,59	0

## 8. Αιματολογική εξέταση

Σε σχετικά μικρό αριθμό γατών της ομάδας Α διαπιστώθηκαν αποτελέσματα εκτός των τιμών αναφοράς από την αιματολογική εξέταση (Πίνακας 11) που συνήθως



απείχαν λίγο από το ανώτερο ή το κατώτερο όριο των τιμών αναφοράς. Για παράδειγμα η μικρότερη τιμή αιματοκρίτη που καταγράφηκε ήταν 19% (τιμές αναφοράς: 24-45%), η μικρότερη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ήταν 5,6 g/dl (τιμές αναφοράς: 8-15 g/dl), ο μικρότερος και ο μεγαλύτερος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων ήταν 4.500/μl και 29.600/μl (τιμές αναφοράς: 5.000-18.900/μl), ο μεγαλύτερος αριθμός ουδετερόφιλων ήταν 20.128/μl (τιμές αναφοράς: 2.500-12.500/μl), ο μεγαλύτερος αριθμός άωρων ουδετερόφιλων ήταν 724/μl (τιμές αναφοράς: 0-300/μl), ο μικρότερος και ο μεγαλύτερος αριθμός λεμφοκυττάρων ήταν 900/μl και 7.400/μl, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 1.500-7.000/μl), ο μεγαλύτερος αριθμός μονοκυττάρων ήταν 1.810/μl (τιμές αναφοράς: 0-850/μl) και ο μικρότερος αριθμός αιμοπεταλίων ήταν 123.000/μl (τιμές αναφοράς: 175.000-500.000/μl). Επιπλέον, η μόνη διαφορά που διαπιστώθηκε μεταξύ των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας A ήταν η μεγαλύτερη συχνότητα αυξημένου αριθμού άωρων ουδετερόφιλων στις μη μολυσμένες γάτες (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11.** Συχνότητα παθολογικών ευρημάτων από την αιματολογική εξέταση των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας Α

	<b>Μολυσμένες</b>	<b>Μη μολυσμένες</b>	<b>Τιμή P</b>
<b><i>Ερυθρά αιμοσφαίρια</i></b>			
Μειωμένος αιματοκρίτης	2/21 (9,5%)	5/29 (17,2%)	0,684
Μειωμένη αιμοσφαιρίνη	3/21 (14,3%)	7/29 (24,1%)	0,488
Μειωμένος αιματοκρίτης ή αιμοσφαιρίνη	3/21 (14,3%)	7/29 (24,1%)	0,488
<b><i>Λευκά αιμοσφαίρια</i></b>			
Ολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων			0,129
Μειωμένος	0/21 (0%)	1/29 (3,4%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	21/21 (100%)	24/29 (82,8%)	
Αυξημένος	0/21 (0%)	4/29 (13,8%)	
Αυξημένα ουδετερόφιλα	1/21 (4,8%)	4/29 (13,8%)	0,383
Αυξημένα άωρα ουδετερόφιλα	2/21 (9,5%)	10/29 (34,5%)	0,041
Αριθμός λεμφοκυττάρων			1
Μειωμένος	3/21 (14,3%)	3/29 (10,3%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	18/21 (85,7)	25/29 (86,2%)	
Αυξημένος	0/21 (0%)	1/29 (3,4%)	
Αυξημένα μονοκύτταρα	1/21 (4,8%)	4/29 (13,8%)	0,383
<b><i>Αιμοπετάλια</i></b>			
Μειωμένα	0/21 (0%)	2/29 (6,9%)	0,503

Όπως ήταν αναμενόμενο, η συχνότητα ευρημάτων της αιματολογικής εξέτασης που βρίσκονταν εκτός των τιμών αναφοράς ήταν, στις περισσότερες περιπτώσεις, μεγαλύτερη στις γάτες της ομάδας Β σε σύγκριση με εκείνες της ομάδας Α (Πίνακας 12) και οι αποκλίσεις από τις τιμές αναφοράς ήταν μεγαλύτερες. Έτσι, η μικρότερη τιμή αιματοκρίτη που καταγράφηκε ήταν 12% (τιμές αναφοράς: 24-45%), η μικρότερη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ήταν 3,6 g/dl (τιμές αναφοράς: 8-15 g/dl), ο μικρότερος και ο μεγαλύτερος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων ήταν 4.600/μl και 50.900/μl (τιμές αναφοράς: 5.000-18.900/μl), ο μεγαλύτερος αριθμός ουδετερόφιλων ήταν 46.530/μl (τιμές αναφοράς: 2.500-12.500/μl), ο μεγαλύτερος αριθμός άωρων ουδετερόφιλων ήταν 5.346/μl (τιμές αναφοράς: 0-300/μl), ο μικρότερος και ο μεγαλύτερος αριθμός λεμφοκυττάρων ήταν 159/μl και 10.062/μl, αντίστοιχα (τιμές

αναφοράς: 1.500-7.000/μl), ο μεγαλύτερος αριθμός μονοκυττάρων ήταν 1.900/μl (τιμές αναφοράς: 0-850/μl) και ο μικρότερος αριθμός αιμοπεταλίων ήταν 108.000/μl (τιμές αναφοράς: 175.000-500.000/μl). Δε διαπιστώθηκε καμία διαφορά μεταξύ των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας B αναφορικά με τη συχνότητα αποτελεσμάτων της αιματολογικής εξέτασης που βρίσκονταν εκτός των τιμών αναφοράς (Πίνακας 12)

**Πίνακας 12.** Συχνότητα παθολογικών ευρημάτων από την αιματολογική εξέταση των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας B

	<b>Μολυσμένες</b>	<b>Μη μολυσμένες</b>	<b>Τιμή P</b>
<b>Ερυθρά αιμοσφαίρια</b>			
Μειωμένος αιματοκρίτης	4/20 (20%)	7/30 (23,3%)	1
Μειωμένη αιμοσφαιρίνη	4/20 (20%)	7/30 (23,3%)	1
Μειωμένος αιματοκρίτης ή αιμοσφαιρίνη	4/20 (20%)	8/30 (26,7%)	0,74
<b>Λευκά αιμοσφαίρια</b>			
Ολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων			0,372
Μειωμένος	0/20 (0%)	2/30 (6,7%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	13/20 (65%)	22/30 (73,3%)	
Αυξημένος	7/20 (35%)	6/30 (20%)	
Αυξημένα ουδετερόφιλα	7/20 (35%)	8/30 (26,7%)	0,529
Αυξημένα άωρα ουδετερόφιλα	6/20 (30%)	4/30 (13,3%)	0,17
Αριθμός λεμφοκυττάρων			0,606
Μειωμένος	6/20 (30%)	12/30 (40%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	13/20 (65%)	15/30 (50%)	
Αυξημένος	1/20 (5%)	3/30 (10%)	
Αυξημένα μεγάλα μονοπύρηνα	2/20 (10%)	2/30 (6,7%)	1
<b>Αιμοπετάλια</b>			
Μειωμένα	2/20 (10%)	1/30 (3,3%)	0,556

## 9. Βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος

Σε σχετικά μικρό αριθμό γατών της ομάδας A διαπιστώθηκαν αποτελέσματα εκτός των τιμών αναφοράς από τις βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος (Πίνακας 13) που συνήθως απείχαν λίγο από το ανώτερο ή το κατώτερο όριο των

τιμών αναφοράς. Για παράδειγμα η μικρότερη συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών ήταν 4,7 g/dl (τιμές αναφοράς: 5,7-8,9 g/dl), η μικρότερη συγκέντρωση λευκωματινών ήταν 1,5 g/dl (τιμές αναφοράς: 2,4-4 g/dl), η μικρότερη και η μεγαλύτερη συγκέντρωση σφαιρινών ήταν 2,1 g/dl και 5,6 g/dl, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 2,8-5,1 g/dl), η μικρότερη και η μεγαλύτερη τιμή του λόγου λευκωματίνες/σφαιρίνες ήταν 0,48 και 1,81, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 0,5-1,5), η μεγαλύτερη συγκέντρωση κρεατινίνης ήταν 2,5 mg/dl (τιμές αναφοράς: 0,8-2,4 mg/dl), η μικρότερη συγκέντρωση της χολοστερόλης ήταν 61 mg/dl (τιμές αναφοράς: 65-225 mg/dl), η μεγαλύτερη δραστηριότητα της γ-GT ήταν 2 U/l (τιμές αναφοράς: 0-1 U/l), η μεγαλύτερη δραστηριότητα της ALT ήταν 324 U/l (τιμές αναφοράς: 12-130 U/l), η μεγαλύτερη δραστηριότητα της AST ήταν 197 U/l (τιμές αναφοράς: 0-48 U/l), η μικρότερη και η μεγαλύτερη συγκέντρωση του ασβεστίου ήταν 5,2 mg/dl και 14,3 mg/dl, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 7,8-11,3 mg/dl), η μεγαλύτερη συγκέντρωση του καλίου ήταν 6,1 mmol/l (τιμές αναφοράς: 3,5-5,8 mmol/l), η μεγαλύτερη συγκέντρωση του νατρίου ήταν 168 mmol/l (τιμές αναφοράς: 150-165 mmol/l) και η μεγαλύτερη συγκέντρωση του χλωρίου ήταν 130 mmol/l (τιμές αναφοράς: 112-129 mmol/l). Μόνη εξαίρεση στα παραπάνω ήταν η μεγάλη συχνότητα αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης (28/50-56%) με μέγιστη τιμή τα 288 mg/dl (τιμές αναφοράς: 74-159 mg/dl) και η μεγάλη συχνότητα αυξημένης δραστηριότητα της CK (34/50-68%) με μέγιστη τιμή τις 2.036 U/l (τιμές αναφοράς: 0-314 U/l) και που πρέπει να αποδοθούν στο σύνδρομο καταπόνησης λόγω των χειρισμών (γλυκόζη), την ενδομυϊκή χορήγηση (CK) και την επίδραση των φαρμάκων (γλυκόζη) που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημική συγκράτηση. Το τελευταίο επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι καμία από τις γάτες της ομάδας A δεν είχε γλυκοζουρία (βλ. παρακάτω).

Δε διαπιστώθηκε καμία διαφορά μεταξύ των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας A αναφορικά με τη συχνότητα των αποτελεσμάτων των βιοχημικών εξετάσεων που βρίσκονταν εκτός των τιμών αναφοράς (Πίνακας 13).

**Πίνακας 13.** Συχνότητα παθολογικών ευρημάτων από τις βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας Α

	<b>Μολυσμένες</b>	<b>Μη μολυσμένες</b>	<b>Τιμή P</b>
Μειωμένες ολικές πρωτεΐνες	1/21 (4,8%)	1/29 (3,4%)	1
Μειωμένες λευκωματίνες	1/21 (4,8%)	1/29 (3,4%)	1
Σφαιρίνες			0,668
Μειωμένες	1/21 (4,8%)	0/29 (0%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	20/21 (95,2%)	28/29 (96,6%)	
Αυξημένες	0/21 (0%)	1/29 (3,4%)	
Λόγος λευκωματίνες/σφαιρίνες			0,71
Μειωμένος	1/21 (4,8%)	1/29 (3,4%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	19/21 (90,5%)	28/29 (96,6%)	
Αυξημένος	1/21 (4,8%)	0/29 (0%)	
Αυξημένη κρεατινίνη	0/21 (0%)	1/29 (3,4%)	1
Αυξημένη γλυκόζη	12/21 (57,1%)	16/29 (55,2%)	0,98
Μειωμένη χολοστερόλη	0/21 (0%)	2/29 (6,9%)	0,503
Αυξημένη γ-GT	0/21 (0%)	1/29 (3,4%)	1
Αυξημένη ALT	1/21 (4,8%)	1/29 (3,4%)	1
Αυξημένη AST	3/21 (14,3%)	4/29 (13,8%)	1
Αυξημένη CK	14/21 (66,7%)	20/29 (69%)	0,863
Ασβέστιο			0,79
Μειωμένο	3/21 (14,3%)	2/29 (6,9%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	18/21 (85,7%)	26/29 (89,7%)	
Αυξημένο	0/21 (0%)	1/29 (3,4%)	
Αυξημένο κάλιο	1/21 (4,8%)	1/29 (3,4%)	1
Αυξημένο νάτριο	1/21 (4,8%)	0/29 (0%)	0,42
Αυξημένο χλώριο	2/21 (9,5%)	1/29 (3,4%)	0,565

Όπως ήταν αναμενόμενο, η συχνότητα ευρημάτων των βιοχημικών εξετάσεων που βρίσκονταν εκτός των τιμών αναφοράς ήταν, στις περισσότερες περιπτώσεις, μεγαλύτερη στις γάτες της ομάδας Β σε σύγκριση με εκείνες της ομάδας Α (Πίνακας 14) και οι αποκλίσεις από τις τιμές αναφοράς ήταν μεγαλύτερες. Για παράδειγμα η

μικρότερη συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών ήταν 3,9 g/dl (τιμές αναφοράς: 5,7-8,9 g/dl), η μικρότερη συγκέντρωση λευκωματινών ήταν 1,3 g/dl (τιμές αναφοράς: 2,4-4 g/dl), η μικρότερη και η μεγαλύτερη συγκέντρωση σφαιρινών ήταν 2,5 g/dl και 6 g/dl, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 2,8-5,1 g/dl), η μικρότερη και η μεγαλύτερη τιμή του λόγου λευκωματίνες/σφαιρίνες ήταν 0,38 και 1,6, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 0,5-1,5), η μεγαλύτερη συγκέντρωση BUN ήταν 130 mg/dl (τιμές αναφοράς: 16-36 mg/dl), η μεγαλύτερη συγκέντρωση κρεατινίνης ήταν 15 mg/dl (τιμές αναφοράς: 0,8-2,4 mg/dl), η μικρότερη συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 47 mg/dl (τιμές αναφοράς: 74-159 mg/dl), η μικρότερη και η μεγαλύτερη συγκέντρωση της χολοστερόλης ήταν 56 mg/dl και 313 mg/dl, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 65-225 mg/dl), η μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικής χολερυθρίνης ήταν 6,5 mg/dl (τιμές αναφοράς: 0-0,9 mg/dl), η μεγαλύτερη δραστηριότητα της ALP ήταν 262 U/l (τιμές αναφοράς: 14-111 U/l), η μεγαλύτερη δραστηριότητα της γ-GT ήταν 4 U/l (τιμές αναφοράς: 0-1 U/l), η μεγαλύτερη δραστηριότητα της ALT ήταν 600 U/l (τιμές αναφοράς: 12-130 U/l), η μεγαλύτερη δραστηριότητα της AST ήταν 260 U/l (τιμές αναφοράς: 0-48 U/l), η μικρότερη συγκέντρωση του ασβεστίου ήταν 5,4 mg/dl (τιμές αναφοράς: 7,8-11,3 mg/dl), η μικρότερη και η μεγαλύτερη συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου ήταν 2,9 mg/dl και 16,1 mg/dl, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 3,1-7,5 mg/dl), η μικρότερη και η μεγαλύτερη συγκέντρωση του καλίου ήταν 1,5 mmol/l και 9 mmol/l, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 3,5-5,8 mmol/l), η μικρότερη και η μεγαλύτερη συγκέντρωση του νατρίου ήταν 140 mmol/l και 166 mmol/l, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 150-165 mmol/l) και η μικρότερη και μεγαλύτερη συγκέντρωση του χλωρίου ήταν 108 mmol/l και 160 mmol/l, αντίστοιχα (τιμές αναφοράς: 112-129 mmol/l). Μόνη εξαίρεση στα παραπάνω ήταν η παρόμοια συχνότητα αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης (56% στην ομάδα A και 48% στην ομάδα B) με παρόμοιες μέγιστες τιμές (288 mg/dl για την ομάδα A και 526 mg/dl για την ομάδα B) και η παρόμοια συχνότητα αυξημένης δραστηριότητα της CK (68% στην ομάδα A και 60% στην ομάδα B) με παρόμοιες μέγιστες τιμές (2.036 U/l στην ομάδα A και 1.531 U/l στην ομάδα B) και, όπως και προηγουμένως, πρέπει να αποδοθούν στο σύνδρομο καταπόνησης λόγω των χειρισμών (γλυκόζη), την ενδομυϊκή χορήγηση (CK) και την επίδραση των φαρμάκων (γλυκόζη) που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημική συγκράτηση.

Στις βιοχημικές εκείνες παραμέτρους που ήταν συχνότερα αυξημένες στις μολυσμένες σε σύγκριση με τις μη μολυσμένες γάτες της ομάδας B περιλαμβάνονται

η ολική χολερυθρίνη, η ALP και ο ανόργανος φωσφόρος, ενώ οι διαφορές για την κρεατινίνη και τη γ-GT πλησίασαν το όριο σημαντικότητας (Πίνακας 14)

**Πίνακας 14.** Συχνότητα παθολογικών ευρημάτων από τις βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας Β

	<b>Μολυσμένες</b>	<b>Μη μολυσμένες</b>	<b>Τιμή P</b>
Μειωμένες ολικές πρωτεΐνες	3/20 (15%)	5/30 (16,7%)	1
Μειωμένες λευκωματίνες	2/20 (10%)	3/30 (10%)	1
Σφαιρίνες			0,626
Μειωμένες	2/20 (10%)	1/30 (3,3%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	17/20 (85%)	28/30 (93,3%)	
Αυξημένες	1/20 (5%)	1/30 (3,3%)	
Λόγος λευκωματίνες/σφαιρίνες			0,632
Μειωμένος	3/20 (15%)	2/30 (6,7%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	17/20 (85%)	27/30 (90%)	
Αυξημένος	0/20 (0%)	1/30 (3,3%)	
Αυξημένο BUN	5/20 (25%)	4/30 (13,3%)	0,454
Αυξημένη κρεατινίνη	3/20 (15%)	0/30 (0%)	0,058
Γλυκόζη			0,898
Μειωμένη	1/20 (5%)	2/30 (6,7%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	10/20 (50%)	13/30 (43,3%)	
Αυξημένη	9/20 (45%)	15/30 (50%)	
Χολοστερόλη			0,496
Μειωμένη	1/20 (5%)	1/30 (3,3%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	18/20 (90%)	29/30 (96,7%)	
Αυξημένη	1/20 (5%)	0/30 (0%)	
Αυξημένη ολική χολερυθρίνη	5/20 (25%)	1/30 (3,3%)	0,032
Αυξημένη ALP	5/20 (25%)	1/30 (3,3%)	0,032
Αυξημένη γ-GT	3/20 (15%)	0/30 (0%)	0,058
Αυξημένη ALT	4/20 (20%)	2/30 (6,7%)	0,202
Αυξημένη AST	5/20 (25%)	4/30 (13,3%)	0,454

Αυξημένη CK	12/20 (60%)	18/31 (58,1%)	1
Μειωμένο ασβέστιο	3/20 (15%)	2/30 (6,7%)	0,377
Ανόργανος φωσφόρος			0,03
Μειωμένος	0/20 (0%)	2/30 (6,7%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	17/20 (85%)	28/30 (93,3%)	
Αυξημένος	3/20 (15%)	0/30 (0%)	
Κάλιο			0,563
Μειωμένο	1/20 (5%)	1/30 (3,3%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	16/20 (80%)	27/30 (90%)	
Αυξημένο	3/20 (15%)	2/30 (6,7%)	
Νάτριο			0,632
Μειωμένο	3/20 (15%)	2/30 (6,7%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	17/20 (85%)	27/30 (90%)	
Αυξημένο	0/20 (0%)	1/30 (3,3%)	
Χλώριο			0,825
Μειωμένο	1/20 (5%)	1/30 (3,3%)	
Εντός των τιμών αναφοράς	17/20 (85%)	27/30 (90%)	
Αυξημένο	2/20 (10%)	2/30 (6,7%)	

## 10. Ανάλυση ούρων

Σε τέσσερεις (8%) από τις γάτες της ομάδας A δεν υπήρχε επαρκής ποσότητα ούρων στην ουροδόχο κύστη για να γίνει η δειγματοληψία. Στις υπόλοιπες 46 γάτες το ειδικό βάρος και το pH των ούρων κυμαίνονταν από 1015 μέχρι 1040 (διάμεσος: 1040) και από 5 μέχρι 8 (διάμεσος: 7), αντίστοιχα. Σε καμία γάτα δε διαπιστώθηκαν γλυκοζουρία, κετονουρία, χολερυθρινουρία ή αιματουρία-αιμοσφαιρινουρία (τουλάχιστον σε ποσότητα μεγαλύτερη από τα ίχνη αίματος που μπορούν να οφείλονται στη διαδικασία της κυστοκέντησης). Ο λόγος πρωτεΐνης/κρεατινίνη κυμαινόταν από 0,02 ως 0,94 (διάμεσος: 0,14) και ήταν μεγαλύτερος από τις τιμές αναφοράς ( $\leq 0,4$ ) σε δύο γάτες που δεν ήταν μολυσμένες από *L. infantum*. Η διαφορά στη συχνότητα της πρωτεϊνουρίας μεταξύ των μολυσμένων και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας A δεν ήταν σημαντική ( $P=0,513$ ).

Σε οκτώ (16%) γάτες της ομάδας B δεν υπήρχε επαρκής ποσότητα ούρων στην ουροδόχο κύστη για να γίνει η κυστοκέντηση. Στις υπόλοιπες 42 γάτες το ειδικό βάρος και το pH των ούρων κυμαίνονταν από 1001 μέχρι 1040 (διάμεσος: 1031) και



από 6 μέχρι 8 (διάμεσος: 6), αντίστοιχα. Γλυκοζουρία διαπιστώθηκε σε 7/42 (16,7%) γάτες, από τις οποίες στις έξι (85,7%) ήταν έντονη (+2 ή +3) και συνοδευόταν από υπεργλυκαιμία (συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα: 178-459 mg/dl, διάμεσος: 315,5 mg/dl) που οφειλόταν σε σακχαρώδη διαβήτη στις 4/6 (οι δύο από αυτές ήταν ήδη σε θεραπεία με ινσουλίνη Lente) ή στο σύνδρομο καταπόνησης και τη χορήγηση των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημική συγκράτηση στις υπόλοιπες 2/6. Στην έβδομη γάτα διαπιστώθηκε ήπια (+1) γλυκοζουρία που δε συνοδευόταν από υπεργλυκαιμία (συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα: 76 mg/dl) και αποδόθηκε στην έντονη (+3) αιματουρία (Feldman and Nelson, 2004). Κετονουρία (+3) διαπιστώθηκε σε 1/42 (2,4%) γάτα με γλυκοζουρία λόγω σακχαρώδη διαβήτη, παρά το γεγονός ότι βρισκόταν σε θεραπεία με ινσουλίνη Lente. Χολερυθρινουρία βρέθηκε σε 2/42 (4,8%) γάτες που εμφάνιζαν και αυξημένη συγκέντρωση ολικής χολερυθρίνης στο αίμα (1,8 mg/dl και 6,5 mg/dl, αντίστοιχα). Τέλος, αιματουρία σε ποσότητα μεγαλύτερη από τα ίχνη αίματος που μπορούν να οφείλονται στη διαδικασία της κυστοκέντησης διαπιστώθηκε σε 5/42 (11,9%) γάτες και οφειλόταν στο σύνδρομο της κατώτερης ουροφόρου οδού της γάτας (5/5) που ήταν ιδιοπαθούς αιτιολογίας (2/5) ή οφειλόταν σε ουρολοιμώξη (3/5). Ο λόγος πρωτεΐνες/κρεατινίνη μετρήθηκε σε 34/42 γάτες από τις οποίες πάρθηκε δείγμα ούρων, επειδή σε επτά περιπτώσεις διαπιστώθηκε ουρολοιμώξη ή μακροσκοπική αιματουρία και σε μια άλλη η ποσότητα του δείγματος των ούρων δεν επαρκούσε για την εξέταση αυτή. Ο λόγος κυμαινόταν από 0,09 ως 1,5 (διάμεσος: 0,23) και ήταν μεγαλύτερος από τις τιμές αναφοράς ( $\leq 0,4$ ) σε 8/35 (22,9%) γάτες από τις οποίες οι 3/8 ήταν μολυσμένες από *L. infantum* και οι υπόλοιπες 5/8 δεν ήταν μολυσμένες. Η διαφορά αυτή στη συχνότητα της πρωτεϊνουρίας μεταξύ των μολυσμένων και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας B δεν ήταν σημαντική ( $P=1$ ).

#### **11. Ορολογικές εξετάσεις για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *B. henselae***

Από τις 100 γάτες της μελέτης οι 3 ήταν θετικές για το FeLV, οι 8 για το FIV, καμία για το FCV, οι 21 για IgG έναντι του *T. gondii*, οι 4 για IgM έναντι του *T. gondii* και οι 4 για αντισώματα έναντι της *B. henselae* (Πίνακας 15). Οι τίτλοι των IgG έναντι του *T. gondii* ήταν 1/16 σε 4/23 (17,4%) γάτες, 1/32 σε 3 (13%), 1/64 σε 3 (13%), 1/128 σε 5 (8,7%), 1/256 σε 2 (8,7%), 1/2048 σε μια (4,3%) και 1/4.096 σε 3 (13%) από τις γάτες της μελέτης. Η ορολογική εξέταση για IgM έναντι του *T. gondii* ήταν θετική μόνο σε γάτες που είχαν και IgG έναντι του πρωτόζωου και οι τίτλοι των

IgM ήταν 1/32 σε 2/4 (50%), 1/128 σε μια (25%) και 1/256 σε άλλη μια (25%) γάτα. Τέλος οι τίτλοι των IgG έναντι της *B. henselae* ήταν 1/64 σε 3/4 (75%) γάτες και 1/256 σε μια (25%) γάτα.

Τα αποτελέσματα των ορολογικών αυτών εξετάσεων δε διέφεραν μεταξύ των γατών των ομάδων Α και Β (Πίνακας 15), μεταξύ των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών (Πίνακας 16), ούτε μεταξύ των γατών που ήταν θετικές στην IFAT για IgG έναντι της *Leishmania* spp. και εκείνων που ήταν αρνητικές (Πίνακας 17).

**Πίνακας 15.** Σύγκριση της συχνότητας του θετικού αποτελέσματος των ορολογικών εξετάσεων για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *B. henselae* μεταξύ των ομάδων Α και Β

	<b>Ομάδα Α</b>	<b>Ομάδα Β</b>	<b>Τιμή P</b>
FeLV	1/50 (2%)	2/50 (4%)	1
FIV	2/50 (4%)	6/50 (12%)	0,268
IgG για FCV	0/50 (0%)	0/50 (0%)	1
IgG για <i>T. gondii</i>	14/50 (32%)	7/50 (14%)	0,086
IgM για <i>T. gondii</i>	4/50 (8%)	0/50 (0%)	0,117
IgG για <i>B. henselae</i>	4/50 (8%)	0/50 (0%)	0,117

**Πίνακας 16.** Σύγκριση της συχνότητας του θετικού αποτελέσματος των ορολογικών εξετάσεων για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *B. henselae* μεταξύ των μολυσμένων και των μη μολυσμένων από *L. infantum* γατών της μελέτης

	<b>Μολυσμένες</b>	<b>Μη μολυσμένες</b>	<b>Τιμή P</b>
FeLV	1/41 (2,4%)	2/59 (3,4%)	1
FIV	4/41 (9,8%)	4/59 (6,8%)	0,713
IgG για FCV	0/41 (0%)	0/59 (0%)	1
IgG για <i>T. gondii</i>	8/41 (19,5%)	13/59 (22%)	0,761
IgM για <i>T. gondii</i>	2/41 (4,9%)	2/59 (3,4%)	1
IgG για <i>B. henselae</i>	2/41 (4,9%)	2/59 (3,4%)	1

**Πίνακας 17.** Σύγκριση της συχνότητας του θετικού αποτελέσματος των ορολογικών εξετάσεων για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *B. henselae* μεταξύ των γατών που ήταν θετικές και εκείνων που ήταν αρνητικές στην IFAT για IgG έναντι της *Leishmania* spp.

	Θετική IFAT	Αρνητική IFAT	Τιμή P
FeLV	0/10 (0%)	3/90 (3,3%)	1
FIV	2/10 (20%)	6/90 (6,7%)	0,182
IgG για FCV	0/10 (0%)	0/90 (0%)	1
IgG για <i>T. gondii</i>	1/10 (10%)	20/90 (22,2%)	0,684
IgM για <i>T. gondii</i>	0/10 (0%)	4/90 (4,4%)	1
IgG για <i>B. hensellae</i>	1/10 (10%)	3/90 (3,3%)	0,348

### 11. Παρασιτολογική εξέταση κοπράνων

Πραγματοποιήθηκε σε 58 γάτες (27/50-54% της ομάδας A και 31/50-62% της ομάδας B) για τις οποίες μπόρεσε να συλλεχθεί ικανή για το σκοπό αυτό ποσότητα κοπράνων.

Με το συνδυασμό της απλής και της εξέτασης με τη μέθοδο Teleman διαπιστώθηκε ότι οι 6/58 (10,3%) γάτες (τρεις από την ομάδα A και τρεις από την ομάδα B) παρασιτούνταν από *Toxocara cati* και η 1 (1,7%) από την ομάδα A παρασιτούνταν από *Dipylidium caninum*. Η συχνότητα παρασίτωσης τόσο από την *T. cati* όσο και από το *D. caninum* δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων ( $P=1$  και  $P=0,465$ , αντίστοιχα), μεταξύ των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών ( $P=1$  και  $P=1$ , αντίστοιχα) ούτε μεταξύ των γατών με θετική ή αρνητική IFAT για IgG έναντι της *L. infantum* ( $P=0,581$  και  $P=1$ , αντίστοιχα).

### 12. Αποτελέσματα των υπόλοιπων εργαστηριακών εξετάσεων στις γάτες της ομάδας B

Τα αποτελέσματα της κυτταρολογικής εξέτασης του δέρματος διέφεραν ανάλογα με τη μορφολογία και την αιτιολογία των δερματικών αλλοιώσεων και ήταν διαγνωστικά της αιτιολογίας τους σε τρεις γάτες όπου διαπιστώθηκαν εκφυλισμένα ουδετερόφιλα και φαγοκυτταρωμένοι κόκκοι, ευρήματα διαγνωστικά της βακτηριακής δερματίτιδας.

Τα επιφανειακά και βαθιά ξέσματα από το δέρμα ήταν αρνητικά και στις 17 γάτες όπου πραγματοποιήθηκαν, ενώ σε 1/10 γάτες βρέθηκε *Otodectes cynotis* στην παρασιτολογική εξέταση του έξω ακουστικού πόρου. Η καλλιέργεια στο υπόστρωμα DTM ήταν θετική σε 3/10 γάτες οι οποίες με βάση τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των αποικιών εμφάνιζαν δερματοφυτίαση από το *Microsporum canis*. Η ιστοπαθολογική εξέταση των βιοψιών από το δέρμα έδειξε ότι σε τρεις γάτες οι αλλοιώσεις ήταν εωσινοφιλικές πλάκες (που με βάση το ιστορικό, την κλινική εικόνα και τα αποτελέσματα των υπόλοιπων εξετάσεων οφείλονταν σε αλλεργική δερματίτιδα), σε άλλες περιπτώσεις ήταν σαρκώματα (n=3), σε μια γάτα ήταν ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα και σε μια άλλη γάτα ήταν οργανοειδής σπίλος.

Η καλλιέργεια των ούρων ήταν θετική σε 7 γάτες και τα βακτήρια που απομονώθηκαν ήταν η *Escherichia coli* (5/7), ο *Staphylococcus* spp. (1/7) και ο *Streptococcus* spp. (1/7).

## Δ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1. Γενικά σχόλια για το σχεδιασμό της μελέτης

Όλες οι γάτες που περιλήφθηκαν στη μελέτη ζούσαν στη Θεσσαλία και τη Μακεδονία, δηλαδή σε περιοχές της Ελλάδας όπου η λεισμανίωση του σκύλου από *L. infantum* είναι ενδημική. Για παράδειγμα, με βάση τα αποτελέσματα σχετικά πρόσφατων μελετών, το ποσοστό προσβολής από τη νόσο μεταξύ των σκύλων που προσκομίζονται σε Κλινικές και Ιατρεία Ζώων Συντροφιάς ανέρχεται σε 2,66% (0,8-5,97%) για τη Μακεδονία και σε 3,69% (0,97-7,41%) για τη Θεσσαλία (Saridomichelakis et al., 2009), το ποσοστό των σκύλων που έχουν αντισώματα έναντι της *Leishmania* spp. κυμαίνεται από 2,05% ως 20,45% (Leontides et al., 2002; Athanasiou, 2004; Athanasiou et al., 2012) και η συχνότητα της μόλυνσης από *L. infantum* σε κλινικά υγιείς σκύλους που ζουν σε εξωτερικούς χώρους είναι 61,9% (Leontides et al., 2002). Με το δεδομένο ότι ο σκύλος είναι η κύρια δεξαμενή της *L. infantum* στη φύση (Baneth et al., 2008), είναι προφανές ότι οι γάτες της μελέτης ζούσαν σε περιοχές όπου δυνητικά μπορούσαν να μολυνθούν από το παράσιτο αυτό.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μια χρονική περίοδο (Ιανουάριος 2009-Σεπτέμβριος 2011) όπου στη χώρα μας χρησιμοποιούνταν διάφορα σκευάσματα (περιλαίμια, διαλύματα επίχυσης) με εντομοαπωθητική δράση που αποδεδειγμένα μειώνουν τη μετάδοση της *L. infantum* από τους μολυσμένους σκύλους στους φλεβοτόμους (Gavvani et al., 2002; Giffoni et al., 2002; Mencke et al., 2003; Reithinger et al., 2004; Noli and Auxilia, 2005; Miró et al., 2007; Ferroglio et al., 2008) αλλά δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμο το εμβόλιο CaniLeish® (Virbac) κατά της λεισμανίωσης του σκύλου. Επειδή υπάρχουν ενδείξεις ότι το τελευταίο μειώνει τη μολυσματικότητα των σκύλων για τους φλεβοτόμους (Bongiorno et al., 2013), ενδέχεται στο μέλλον η γενικευμένη χρήση του να μειώσει και τη συχνότητα της μόλυνσης άλλων ειδών ζώων, μεταξύ των οποίων και οι γάτες.

Η επιλογή των έξι σημείων εξέτασης και δειγματοληψίας, στα οποία συμπεριλαμβάνονταν όχι μόνο οι δύο Πανεπιστημιακές Κλινικές αλλά και τέσσερις ιδιωτικές Κλινικές ή Ιατρεία Ζώων Συντροφιάς, έγινε προκειμένου να αυξηθεί το εύρος της γεωγραφικής διασποράς των περιοχών διαβίωσης των γατών αλλά και για να είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά τα αποτελέσματα, ιδιαίτερα σε ότι αφορά της γάτες της ομάδας Β, αφού οι ασθενείς γάτες που προσκομίζονται σε

Πανεπιστημιακές Κλινικές πάσχουν συχνότερα από νοσήματα που είναι περισσότερο δύσκολα στη διάγνωση και τη θεραπευτική τους αντιμετώπιση σε σύγκριση με εκείνες που προσκομίζονται σε ιδιωτικές Κλινικές ή Ιατρεία Ζώων Συντροφιάς.

Όλες οι γάτες της μελέτης έπρεπε να έχουν ηλικία 12 μηνών ή μεγαλύτερη προκειμένου να διασφαλιστεί ότι μπορούσαν να έχουν εκτεθεί στη *Leishmania spp.* κατά τη διάρκεια μιας τουλάχιστον πλήρους περιόδου δραστηριότητας των φλεβοτόμων (Leontides et al., 2002) και κατά δεύτερο λόγο για να αποφευχθεί το ενδεχόμενο ψευδώς-θετικών αποτελεσμάτων των ορολογικών εξετάσεων εξαιτίας της παρουσίας μητρικών αντισωμάτων έναντι του παρασίτου (Cardia et al., 2013). Επιπλέον, στις γάτες αυτές δεν έπρεπε, για εύλογο χρονικό διάστημα, να έχουν χορηγηθεί αντιμικροβιακά και αντιμυκητιακά φάρμακα που στο σκύλο και τον άνθρωπο είναι περισσότερο (π.χ. αμφοτερικίνη-B) ή λιγότερο (π.χ. κετοконаζόλη, συνδυασμός μετρονιδαζόλης-σπυραμυκίνης, φθοριοκινολόνες) δραστικά κατά της *L. infantum* (Miró et al., 2008; Saridomichelakis, 2012), προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα ψευδώς-αρνητικών αποτελεσμάτων των μοριακών, κυτταρολογικών και ορολογικών εξετάσεων. Τέλος, η διακοπή της χορήγησης των ανοσορυθμιστικών φαρμάκων, όπως είναι για παράδειγμα τα γλυκοκορτικοειδή, αποσκοπούσε κυρίως στην αποφυγή αλλοίωσης των αποτελεσμάτων των παραπάνω εξετάσεων από την επίδραση των ουσιών αυτών στην κυτταρική και τη χυμική ανοσία, ενώ με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε και η αλλοίωση των αποτελεσμάτων των υπόλοιπων εργαστηριακών εξετάσεων (π.χ. αιματολογική, βιοχημικές εξετάσεις στον ορό του αίματος) που συνεπάγεται η χορήγηση των ουσιών αυτών.

Παρά το γεγονός ότι όλες οι γάτες που προσκομίζονταν στα έξι σημεία εξέτασης και δειγματοληψίας και πληρούσαν τα κριτήρια συμμετοχής μπορούσαν να περιληφθούν στη μελέτη, οι δύο ομάδες διέφεραν αναφορικά με την ηλικία (μεγαλύτερη στην ομάδα B), τις συνθήκες διαβίωσης (λιγότερο συχνά σε εξωτερικούς χώρους στην ομάδα B) και την περιοχή διαβίωσης (συχνότερα σε αστικές περιοχές στην ομάδα B). Οι διαφορές αυτές ήταν σε μεγάλο βαθμό αναμενόμενες, αφού η συχνότητα εμφάνισης πολλών από τα νοσήματα και τις παθολογικές καταστάσεις που διαπιστώθηκαν στις γάτες της ομάδας B μεγαλώνει με την πάροδο της ηλικίας, οι ιδιοκτήτες των γατών που ζουν πλήρως ή μερικώς μέσα στο σπίτι έχουν αυξημένη πιθανότητα να παρατηρήσουν τα συμπτώματα του ζώου τους και να το προσκομίσουν για εξέταση και το αίσθημα της φιλοζωίας, που καθορίζει την πιθανότητα προσκόμισης μιας ασθενούς γάτας για εξέταση, είναι μάλλον περισσότερο

αναπτυγμένο στους κατοίκους των αστικών περιοχών. Σε κάθε πάντως περίπτωση οι διαφορές αυτές μεταξύ των ομάδων Α και Β δεν επηρέασαν τα αποτελέσματα της μελέτης αφού η πιθανότητα της μόλυνσης ή του θετικού αποτελέσματος των ορολογικών εξετάσεων δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων των γατών και δε σχετιζόνταν με την ηλικία, τις συνθήκες και την περιοχή διαβίωσής τους.

## **2. Είδος *Leishmania* που ευθύνεται για τη μόλυνση της γάτας στη Θεσσαλία και τη Μακεδονία**

Μέχρι σήμερα έχει αποδειχθεί η φυσική μόλυνση της γάτας από οκτώ είδη του γένους *Leishmania* και συγκεκριμένα από τη *L. infantum* (συν. *L. chagasi*), τη *L. tropica*, τη *L. major*, τη *L. amazonensis*, τη *L. mexicana*, τη *L. venezuelensis*, τη *L. braziliensis* και τη *L. panamensis*, που συνήθως είναι ίδια με εκείνα που ευθύνονται για τη μόλυνση του ανθρώπου και του σκύλου σε κάθε γεωγραφική περιοχή (Craig et al., 1986; Morsy and Abou el Seoud, 1994; Bonfante-Garrido et al., 1996; Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Schubach et al., 2004; Grevot et al., 2005; Ayllon et al., 2008; da Silva et al., 2008; Sarkari et al., 2009; Souza et al., 2009; Coelho et al., 2010; Hatam et al., 2010; Trainor et al., 2010; Coelho et al., 2011b; Sherry et al., 2011; Vides et al., 2011; Ayllón et al., 2012; Pennisi et al., 2013). Στη μελέτη αυτή και οι 41 γάτες των ομάδων Α και Β είχαν μολυνθεί από τη *L. infantum* που άλλωστε είναι το μόνο είδος του γένους *Leishmania* που έχει βρεθεί σε σκύλους στην Ελλάδα (Tzamouranis et al., 1984; Kontos, 1986; Diakou, 2000; Ntais and Antoniou, 2010; Ntais et al., 2013).

Σε αντίθεση με τη γάτα και το σκύλο, εκτός από τη *L. infantum* (Pratlong et al., 1995; Minodier et al., 1997; Antoniou et al., 2004; Spanakos et al., 2008; Ntais et al., 2013), έχουν περιγραφεί στη χώρα μας και περιπτώσεις μόλυνσης του ανθρώπου από τις *L. tropica* και *L. major* (Garifallou et al., 1984; Minodier et al., 1997; Spanakos et al., 2008; Ntais et al., 2013). Τα τελευταία δύο είδη έχουν απομονωθεί από φυσικά μολυσμένες γάτες που εμφάνιζαν μόνο δερματικές αλλοιώσεις στο Ιράκ και την Αίγυπτο, αντίστοιχα (Machattie et al., 1931; Morsy and Abou el Seoud, 1994). Με βάση τα παραπάνω, αλλά και το γεγονός ότι η *L. tropica* και η *L. major* θεωρούνται, στον άνθρωπο και το σκύλο, κατεξοχήν δερμοτρόπα είδη (Dereure et al., 1991; Berman, 1997; Jacobson et al., 2003; Bañuls et al., 2007), δε θα ήταν ιδιαίτερα πιθανό να απομονωθούν από το αίμα, το μυελό των οστών ή το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα των γατών της μελέτης αυτής, θα μπορούσαν όμως

να βρεθούν στα ιστοτεμάχια του δέρματος και ιδιαίτερα εκείνα που πάρθηκαν από τις δερματικές αλλοιώσεις των γατών της ομάδας Β. Ωστόσο, το αρνητικό αποτέλεσμα δε μπορεί να αποκλείσει την πιθανότητα μόλυνσης των γατών και από τα είδη αυτά, δεδομένου του σχετικά μικρού αριθμού γατών με θετική PCR στο δέρμα (n=18) και της περιοχής προέλευσης τους (Θεσσαλία και Μακεδονία) όπου δεν είναι συχνή η δερματική λεισμανίωση του ανθρώπου από *L. tropica* και *L. major*, σε αντίθεση με τις νοτιότερες περιοχές και τη νησιωτική Ελλάδα (Garifallou et al., 1984; Minodier et al., 1997; Spanakos et al., 2008; Ntais et al., 2013).

### **3. Συχνότητα μόλυνσης της γάτας από *L. infantum* και παράγοντες που την επηρεάζουν**

Στη μελέτη αυτή, η συχνότητα μόλυνσης των γατών από τη *L. infantum* καθορίστηκε, αποκλειστικά και μόνο, με βάση το αποτέλεσμα της PCR. Προκειμένου όμως να χρησιμοποιηθεί η εξέταση αυτή, είτε για διαγνωστικούς σκοπούς σε γάτες με συμπτώματα ύποπτα της νόσου ή στα πλαίσια επιδημιολογικών μελετών, είναι απαραίτητος ο προσεκτικός έλεγχος όλων των τεχνικών λεπτομερειών της μεθόδου. Για το σκοπό αυτό πρέπει να εξεταστεί πλήθος παραγόντων που συχνά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, γεγονός που καθιστά αναγκαία την προηγούμενη βελτιστοποίηση των δημοσιευμένων πρωτοκόλλων της PCR (Saiki et al., 1988; Erlich, 1989). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη είχε προηγουμένως αξιολογηθεί σε ότι αφορά τη μικρότερη ποσότητα DNA που μπορεί να ανιχνευτεί, την ευαισθησία, την ειδικότητα και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων (Andreadou et al., 2012). Επιπλέον, η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε ήταν σε πλήρη συμφωνία με το ISO 17025 που περιλαμβάνει τον ποιοτικό έλεγχο του πρωτοκόλλου, των αναλώσιμων και της όλης διαδικασίας, την περιοδική πραγματοποίηση τυποποιημένης διαδικασίας συγκριτικής αξιολόγησης (ring-trial testing), τη διαπίστευση του εξοπλισμού και τη συνεχή αξιολόγηση του τεχνικού προσωπικού. Επιπλέον, προκειμένου να διασφαλιστεί η αξιοπιστία του αποτελέσματος, πάρθηκαν όλα τα αναγκαία μέτρα για να αποκλειστεί η επιμόλυνση των δειγμάτων από τα προϊόντα προηγούμενων αντιδράσεων και όλα τα θετικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μέσω της μέσω της *in silico* ανάλυσης ομολογίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Τέλος αποκλείστηκαν τα ψευδώς-αρνητικά αποτελέσματα χάρη στον προκαταρκτικό έλεγχο για τυχόν κατακερματισμό του DNA και για παρουσία αναστολέων της αντίδρασης.



Με την ενδεχόμενη εξαίρεση των ιστοτεμαχίων από το δέρμα, που θεωρητικά μπορεί να είναι θετικά ύστερα από νύγμα μολυσμένου φλεβοτόμου και ενοφθαλμισμό του παρασίτου στο σημείο της βιοψίας (Leontides et al., 2002), το θετικό αποτέλεσμα της PCR στους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν (αίμα, μυελός των οστών, υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα) αποδεικνύει τη συστηματική διασπορά της *L. infantum* στο σώμα των μολυσμένων γατών. Με το δεδομένο αυτό, οι μόνες πιθανές εξηγήσεις για τη σημαντική διαφορά ( $P=0,014$ ) του αποτελέσματος της PCR μεταξύ των τεσσάρων ιστών είναι η διαμερισματοποίηση της μόλυνσης ή η παρουσία DNA του παρασίτου σε ποσότητα μικρότερη από εκείνη που μπορεί να ανιχνεύσει η PCR που χρησιμοποιήθηκε. Τουλάχιστον στο σκύλο, είναι γνωστό ότι το παρασιτικό φορτίο διαφέρει μεταξύ των ιστών και των οργάνων, όχι μόνο λόγω του τροπισμού της *L. infantum* αλλά και λόγω της διαφορετικής για κάθε όργανο ανοσολογικής αντίδρασης του ξενιστή (Solano-Gallego et al., 2001; Reithinger et al., 2002; Sanchez et al., 2004; Saridomichelakis, 2009). Στη μελέτη αυτή, με το δεδομένο ότι πάρθηκαν όλα τα απαραίτητα μέτρα για να αποφευχθούν τα ψευδώς-αρνητικά αποτελέσματα της PCR, το μικρότερο από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου παρασιτικό φορτίο αποτελεί τη μόνη λογική εξήγηση για τις γάτες εκείνες όπου το αποτέλεσμα της εξέτασης ήταν θετικό στο αίμα και αρνητικό στο μυελό των οστών, μια και ο τελευταίος αναγκαστικά επιμολύνεται από μια ποσότητα αίματος κατά την αναρρόφησή του. Το ενδεχόμενο αυτό ισχυροποιείται ακόμα περισσότερο και από το σχετικά μικρό παρασιτικό φορτίο που διαπιστώθηκε στα δείγματα εκείνα που ήταν θετικά με τη real-time PCR. Σε κάθε πάντως περίπτωση τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η εξέταση δειγμάτων από πολλαπλούς ιστούς είναι απαραίτητη προκειμένου να μην υποεκτιμηθεί η συχνότητα μόλυνσης της γάτας από τη *L. infantum*, όπως άλλωστε φαίνεται και από τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Pennisi et al., 2012).

Τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών σε σκύλους μολυσμένους από τη *L. infantum* αναφορικά με τη σχετική ευαισθησία της PCR στους τέσσερις ιστούς που εξετάστηκαν στις γάτες της μελέτης είναι συχνά αντιφατικά. Για παράδειγμα, η ευαισθησία των μοριακών εξετάσεων στο αίμα έχει αναφερθεί ως μεγαλύτερη, ίση ή μικρότερη σε σύγκριση με το δέρμα (Manna et al., 2004; Manna et al., 2006; Manna et al., 2008; de Amorim et al., 2010; Leite et al., 2010; Chitimia et al., 2011), ίση ή μικρότερη σε σύγκριση με το μυελό των οστών (Reithinger et al., 2000; Lachaud et al., 2001; Francino et al., 2006; Martínez et al., 2011) και μικρότερη σε σύγκριση με

τον επιπεφυκότα (Strauss-Ayali et al., 2004; Ferreira et al., 2008; Leite et al., 2010; de Almeida Ferreira et al., 2012; Lombardo et al., 2012). Επιπλέον, η ευαισθησία των μοριακών εξετάσεων στο δέρμα ενδέχεται να είναι μικρότερη σε σύγκριση με το μυελό των οστών (Solano-Gallego et al., 2001; Michalsky et al., 2007) και μεγαλύτερη ή μικρότερη σε σύγκριση με τον επιπεφυκότα (Solano-Gallego et al., 2001; Strauss-Ayali et al., 2004; Leite et al., 2010), ενώ εκείνη του μυελού των οστών ίσως είναι μικρότερη σε σύγκριση με τον επιπεφυκότα (Solano-Gallego et al., 2001; de Almeida Ferreira et al., 2012). Στη μοναδική μελέτη όπου εφαρμόστηκαν μοριακές εξετάσεις σε πολλαπλούς ιστούς από γάτες (Pennisi et al., 2012), η συχνότητα θετικού αποτελέσματος της real-time PCR ήταν μεγαλύτερη στον επιπεφυκότα (11/66-16,7%) σε σύγκριση με το αίμα (16/203-7,8%) και τα λεμφογάγγλια (18/154-11,7%). Αντίθετα, στη μελέτη αυτή, το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα ήταν ο λιγότερο συχνά θετικός ιστός με ευαισθησία που ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με εκείνη των ιστοτεμαχίων του δέρματος και του μυελού των οστών. Το εύρημα αυτό δεν είναι ενθαρρυντικό αφού η διαδικασία λήψης του υλικού απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα ήταν η λιγότερο επεμβατική σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν. Για το λόγο αυτό καλό είναι να ελεγχθεί μελλοντικά το ενδεχόμενο αύξησης της διαγνωστικής ευαισθησίας της εξέτασης αυτής με την PCR από υλικό που θα λαμβάνεται και από τους δύο επιπεφυκότες, όπως άλλωστε έχει αποδειχθεί ότι ισχύει στο σκύλο (Lombardo et al., 2012). Τέλος η ανίχνευση του DNA της *L. infantum* στο αίμα (13% των γατών) και το δέρμα (18,2%) ισχυροποιεί το ενδεχόμενο ότι μπορούν οι μολυσμένες γάτες να μεταδίδουν το πρωτόζωο στους φλεβοτόμους (Maroli et al., 2007; Saridomichelakis et al., 2007; Saridomichelakis, 2009).

Στις προηγούμενες επιδημιολογικές έρευνες που στηρίχθηκαν στην PCR, δε βρέθηκαν σταθεροί και επαναλαμβανόμενοι παράγοντες επικινδυνότητας για τη μόλυνση από *L. infantum* που να σχετίζονται με τα στοιχεία ταυτότητας των γατών ή τις συνθήκες διαβίωσής τους (Pennisi, 2002; Tabar et al., 2008; Sherry et al., 2011; Pennisi et al., 2012). Ιδιαίτερα σε ότι αφορά την ηλικία έχει υποστηριχθεί πως η πιθανότητα της μόλυνσης είναι μικρότερη σε γάτες νεαρότερες του ενός έτους συγκριτικά με εκείνες που έχουν ηλικία 2-15 ετών (Pennisi, 2002), ότι είναι μικρότερη σε γάτες κάτω των 3 ετών (Pennisi et al., 2012) ή ότι είναι μικρότερη σε γάτες μεγαλύτερες των 5 ετών (Tabar et al., 2008). Στην παρούσα μελέτη, όπου εξετάστηκαν δείγματα από τέσσερις διαφορετικούς ιστούς και όλες οι γάτες είχαν

ηλικία τουλάχιστον ενός έτους (άρα μπορούσαν να έχουν εκτεθεί στη *L. infantum* κατά τη διάρκεια μιας ή περισσότερων περιόδων δραστηριότητας των φλεβοτόμων), δε διαπιστώθηκε συσχετισμός μεταξύ της ηλικίας και της μόλυνσης. Μάλιστα η συχνότητα της τελευταίας στις γάτες της μελέτης που είχαν ηλικία μεταξύ 12 και 24 μηνών ήταν 44,1% (15/34). Το εύρημα αυτό είναι αντίστοιχο με παλαιότερες παρατηρήσεις σε κλινικά υγιείς σκύλους από την περιοχή της Θεσσαλίας (Leontides et al., 2002) και δείχνει ότι και οι γάτες που ζουν στις περιοχές όπου η λεισμανίωση του σκύλου είναι ενδημική μολύνονται συχνά σε νεαρή ηλικία.

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα της μελέτης είναι η αυξημένη συχνότητα μόλυνσης από *L. infantum* όταν η δειγματοληψία έγινε την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων (Απρίλιος-Νοέμβριος). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι ορισμένες γάτες εμφανίζουν παροδική μόλυνση ή ότι μετά το τέλος της παραπάνω χρονικής περιόδου το παρασιτικό τους φορτίο μειώνεται και γίνεται μικρότερο από το όριο ανίχνευσης της PCR (Maia et al., 2010; Maia and Campino, 2011; Pennisi et al., 2013).

Τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών δείχνουν ότι η πιθανότητα μόλυνσης από *L. infantum* δε διαφέρει μεταξύ των γατών που είναι ορολογικά θετικές ή αρνητικές για το *T. gondii* (Sherry et al., 2011; Sobrinho et al., 2012), αλλά είναι αντιφατικά αναφορικά με τη λοίμωξη από FeLV ή FIV, αφού άλλοτε αυτές συνδέονται (Sobrinho et al., 2012) και άλλοτε όχι (Pennisi, 2002; Martín-Sánchez et al., 2007; Tabar et al., 2008; Sherry et al., 2011) με την πιθανότητα μόλυνσης από τη *L. infantum*. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δεν έδειξαν κανένα συσχετισμό μεταξύ της μόλυνσης από *L. infantum* και της μόλυνσης από FeLV ή της οροθετικότητας έναντι των FIV, FCV, *T. gondii* και *B. henselae*, γεγονός που πρέπει να αποδοθεί στο ότι κανένας από τους τελευταίους μολυσματικούς παράγοντες δε μεταδίδεται μέσω των φλεβοτόμων (Greene, 2006). Με το σκεπτικό αυτό άλλωστε, ο μόνος λογικός συσχετισμός μεταξύ της μόλυνσης από τη *L. infantum* και εκείνης από τους υπόλοιπους μολυσματικούς παράγοντες που ελέγχθηκαν θα μπορούσε να είναι η υποθετική προδιάθεση που θα είχαν οι γάτες που είναι μολυσμένες από έναν ή περισσότερους από τους δεύτερους να εμφανίσουν μόνιμη και γενικευμένη μόλυνση από *L. infantum* εφόσον βέβαια εκτεθούν στην τελευταία. Όμως ο υποθετικός αυτός συσχετισμός δεν επαληθεύτηκε από τα αποτελέσματα της μελέτης.

#### 4. Παρασιτικό φορτίο στις μολυσμένες γάτες και ο ρόλος τους ως δεξαμενή της *L. infantum*

Το αρνητικό αποτέλεσμα της real-time PCR στο 38% των δειγμάτων στα οποία είχε ανιχνευτεί το DNA της *L. infantum* με την PCR είναι σύμφωνο με προηγούμενη μελέτη σε δείγματα από σκύλους, που έγινε στο ίδιο εργαστήριο και έδειξε ότι η διαγνωστική ευαισθησία της τελευταίας είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με εκείνη της πρώτης (Andreadou et al., 2012). Αυτός άλλωστε ήταν και ο λόγος που επιλέχθηκε να ελεγχθούν τα δείγματα της μελέτης αρχικά με την PCR και να εξεταστούν με τη real-time PCR μόνο τα θετικά δείγματα.

Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη όπου ποσοτικοποιήθηκε το παρασιτικό φορτίο στο δέρμα (29-325 παράσιτα/ml) και το μυελό των οστών (26-352 παράσιτα/ml) γατών που ήταν φυσικά μολυσμένες από τη *L. infantum*. Αντίθετα, το μέσο παρασιτικό φορτίο στο αίμα μολυσμένων, κλινικά υγιών και αδέσποτων γατών από τη Βραζιλία εκτιμήθηκε με τη real-time PCR σε 31,93 fg (de Moraes et al., 2012), ενώ σε μελέτη που έγινε στην Ιταλία το παρασιτικό φορτίο στο αίμα κυμαινόταν από 10-770 παράσιτα/ml (διάμεσος: 70,5 παράσιτα/ml) και στον επιπεφυκότα από 1-14 παράσιτα/δείγμα (διάμεσος: 2 παράσιτα/δείγμα) (Pennisi et al., 2012). Η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής με εκείνα των δύο παραπάνω δεν είναι εφικτή, αφού στην πρώτη από αυτές το παρασιτικό φορτίο εκφράστηκε με διαφορετικό τρόπο και για τη δεύτερη δεν υπάρχει δημοσιευμένη πλήρης εργασία ώστε να είναι γνωστή η μεθοδολογία της real-time PCR που ακολουθήθηκε. Σε κάθε πάντως περίπτωση, προκαλεί εντύπωση η ομοιότητα των αποτελεσμάτων σε ότι αφορά τον αριθμό των παρασίτων/ml αίματος μεταξύ της μελέτης αυτής (28-238, διάμεσος: 87) και εκείνης από την Ιταλία (10-770, διάμεσος: 70,5).

Η παρουσία και η πυκνότητα των παρασίτων στο δέρμα και το αίμα των μολυσμένων γατών έχει σημασία για την εκτίμηση του ρόλου τους ως δεξαμενής της *L. infantum* στη φύση, αφού είναι γνωστό ότι όταν οι φλεβοτόμοι νύσσουν το δέρμα, δημιουργούν, χάρη στα ένζυμα που εκκρίνουν, μια «τροφική δεξαμενή» στο επιπολής χόριο, από όπου μυζούν αίμα και ιστικά ράκη (Lewis, 1987; Rutledge and Gupta, 2002; Bowman, 2005; Saridomichelakis et al., 2007; Saridomichelakis, 2009). Κατά συνέπεια, απαραίτητη προϋπόθεση για να μολυνθούν τα έντομα αυτά από τη *L. infantum* είναι η παρουσία ζωντανών αμαστιγοφόρων στο αίμα ή το δέρμα του ξενιστή (Quinnell and Courtenay, 2009; Saridomichelakis, 2009). Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, το θετικό

αποτέλεσμα των μοριακών εξετάσεων, όπως η PCR και η real-time PCR, προϋποθέτει την παρουσία ζωντανών παρασίτων, αφού το DNA των τελευταίων καταστρέφεται και γίνεται μη ανιχνεύσιμο λίγο μετά το θάνατό τους (Lombardo et al., 2012)

Βέβαια, εκτός από την παρουσία και την πυκνότητα των παρασίτων στο αίμα και το δέρμα, η σημασία ενός ζωικού είδους ως δεξαμενής της *L. infantum* εξαρτάται από πλήθος επιπρόσθετων παραγόντων, όπως είναι: α) ο αριθμός των μολυσμένων ζώων που υπάρχουν σε μια περιοχή, β) η προτίμηση των θηλυκών φλεβοτόμων των ειδών εκείνων που ευθύνονται για τη μετάδοση του πρωτόζωου να νύσσουν το συγκεκριμένο ζωικό είδος, γ) η ποσότητα του αίματος που λαμβάνουν σε κάθε γεύμα, δ) η ακριβής εντόπιση της *L. infantum* στο χόριο του δέρματος, ε) η ευκολία με την οποία μεταδίνεται το παράσιτο από τον ξενιστή στο φλεβοτόμο, και στ) η ικανότητα της *L. infantum* να ολοκληρώσει την εξέλιξή της στο μολυσμένο φλεβοτόμο, να φτάσει στο στάδιο του μετακυκλικού προμαστιγοφόρου και στη συνέχεια να μεταδοθεί σε καινούριο ξενιστή (Ashford, 2000; González-Salazar and Stephens, 2012).

Δυστυχώς, δεν υπάρχουν επίσημα στοιχεία για το συνολικό πληθυσμό των γατών στη χώρα μας, στον οποίο βέβαια περιλαμβάνονται και οι αδέσποτες γάτες. Πάντως δεν είναι υπερβολή να θεωρηθεί ότι ο πληθυσμός αυτός είναι τουλάχιστον ίσος και πιθανότατα μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον αριθμό των σκύλων (μη δημοσιευμένα στοιχεία). Λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη ότι η συχνότητα μόλυνσης από τη *L. infantum* στις γάτες της μελέτης ήταν περίπου 40% και το αντίστοιχο ποσοστό για τους κλινικά υγιείς σκύλους που ζούσαν στην ίδια περιοχή ήταν περίπου 60% (Leontides et al., 2002) ενώ γενικά για τις μεσογειακές χώρες κυμαίνεται από 30-85% (Tabar et al., 2009; Chitimia et al., 2011; Millán et al., 2011; Di Muccio et al., 2012; Lombardo et al., 2012), μπορεί να υποτεθεί ότι ο συνολικός πληθυσμός των γατών που είναι μολυσμένες από τη *L. infantum* είναι πιθανότατα παρόμοιος με εκείνο των μολυσμένων σκύλων.

Από μελέτες που έχουν γίνει σε διαφορετικές χώρες και ποικίλα οικοσυστήματα έχει διαπιστωθεί ότι αρκετά είδη φλεβοτόμων νύσσουν τις γάτες (π.χ. *P. langeroni*, *P. rapatasi*, *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *Lutzomyia spp.*, *L. longipalpis*), ότι ορισμένα από αυτά δείχνουν αυξημένη προτίμηση στο συγκεκριμένο ζωικό είδος, όπως για παράδειγμα οι *P. rapatasi* και *P. sergenti* στη Συρία, ενώ άλλα (*P. langeroni*, *P. perniciosus*, *L. longipalpis*) είναι αποδεδειγμένοι μεταδότες της *L.*

*infantum* (el Sawaf et al., 1989; Ogusuku et al., 1994; De Colmenares et al., 1995; da Silva et al., 2008; Nasereddin et al., 2008; Maroli et al., 2009; Jiménez et al., 2013; Maia et al., 2013). Βέβαια τα δεδομένα αυτά πρέπει να εκτιμηθούν με προσοχή αφού οι προτιμήσεις ενός είδους φλεβοτόμου ποικίλλουν ανάλογα με την παρουσία ή όχι των ξενιστών στην περιοχή, διαφέρουν από χώρα σε χώρα και μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου (Baker et al., 1999; Rutledge and Gupta, 2002; Bongiorno et al., 2003; Maia et al., 2013). Στην Ελλάδα, από τα είδη φλεβοτόμων που νύσσουν τις γάτες έχουν βρεθεί τα *P. papatasi* και *P. sergenti* (Chaniotis et al., 1994; Papadopoulos and Tselentis, 1994; Chaniotis and Tselentis, 1996; Aransay et al., 2000; Ivovic and Tselentis, 2005; Boutsini, 2010), ενώ δεν έχει αποδειχθεί ότι το ζωικό αυτό είδος δέχεται νύγματα από τους φλεβοτόμους που αποτελούν αποδεδειγμένους (*P. neglectus*) ή πιθανούς (*P. alexandri*, *P. perfiliewi*, *P. simici*, *P. tobbi*) μεταδότες της *L. infantum* (Léger et al., 1988; Papadopoulos and Tselentis, 1994; Tselentis et al., 1994; Killick-Kendrick and Killick-Kendrick, 1999; Aransay et al., 2000; Chaniotis et al., 2000; Bongiorno et al., 2003; Velo et al., 2005). Για το λόγο αυτό θα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να πραγματοποιηθούν μελέτες στη φύση όπου θα διερευνηθεί ταυτόχρονα η παρουσία της *L. infantum* στους φλεβοτόμους και το ζωικό είδος στο οποίο έχουν τραφεί τα μολυσμένα έντομα (Jiménez et al., 2013).

Η ποσότητα του αίματος που λαμβάνουν οι φλεβοτόμοι σε κάθε νύγμα είναι συνήθως 0,3-0,5 μl (Alvar et al., 1997) που στην περίπτωση των γατών της μελέτης αυτής αντιστοιχεί σε λιγότερο από ένα παράσιτο, ακόμα και για τη γάτα με το μεγαλύτερο παρασιτικό φορτίο στο αίμα (238 παράσιτα/ml = 0.238 παράσιτα/μl = 0.07-0.119 παράσιτα/γεύμα), γεγονός που φαινομενικά μειώνει την πιθανότητα να αποτελούν οι γάτες δεξαμενή της *L. infantum*. Μάλιστα, η άποψη αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα μελέτης σε κλινικά υγιή, αδέσποτα ζώα από τη Βραζιλία, όπου το παρασιτικό φορτίο ήταν μεγαλύτερο στο αίμα των σκύλων (795,17 fg) σε σύγκριση με των γατών (31,93 fg) (de Moraes et al., 2012) και από το μεγάλο (>1.000 παράσιτα/ml) παρασιτικό φορτίο που έχει διαπιστωθεί στο αίμα ορισμένων σκύλων που εμφανίζουν ή πρόκειται να εμφανίσουν τη νόσο (Martínez et al., 2011). Από την άλλη όμως πλευρά, έχει αναφερθεί η περίπτωση γάτας με πολύ μεγάλο (2.968/ml) παρασιτικό φορτίο στο αίμα (Tabar et al., 2008), αρκετοί σκύλοι με λεισμανίωση έχουν μικρό παρασιτικό φορτίο, όπως για παράδειγμα 0,16-69,67 παράσιτα/ml αίματος (Manna et al., 2009), ενώ όταν ελέγχθηκαν τόσο κλινικά υγιείς όσο και συμπτωματικοί σκύλοι το παρασιτικό φορτίο στο αίμα τους κυμαινόταν από 2-14

παράσιτα/ml με διάμεσο τα 7 παράσιτα/ml (Lombardo et al., 2012). Αν και η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων της real-time PCR όταν αυτή γίνεται σε διαφορετικά εργαστήρια δεν είναι επιστημονικά αποδεκτή, τα τελευταία δεδομένα φαίνεται να δείχνουν ότι το παρασιτικό φορτίο στο αίμα των μολυσμένων γατών δεν είναι απαραίτητα μικρότερο σε σύγκριση με εκείνο των σκύλων.

Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι οι γάτες με λεισμανίωση από *L. infantum* έχουν σχετικά μεγάλο παρασιτικό φορτίο στο δέρμα (Navarro et al., 2010) αλλά η μελέτη αυτή είναι η πρώτη όπου αυτό εκτιμήθηκε ποσοτικά με τη real-time PCR σε μολυσμένες γάτες που δεν εμφάνιζαν τη νόσο. Δυστυχώς όμως το παρασιτικό φορτίο στα ιστοτεμάχια του δέρματος δεν αρκεί για να εκτιμηθεί η σημασία του οργάνου αυτού στη μετάδοση της *L. infantum* από τις γάτες στους φλεβοτόμους, επειδή πρέπει να ληφθεί υπόψη και η ακριβής εντόπιση του παρασίτου στο δέρμα. Κατά τη διάρκεια του νύγματος των θηλυκών φλεβοτόμων, τα στοματικά τους μόρια διαπερνούν την επιδερμίδα και φθάνουν σε βάθος 0,26-0,32 mm που αντιστοιχεί στο επιπολής χόριο (Lewis, 1987; Rutledge and Gupta, 2002). Κατά συνέπεια, για τη μετάδοση του παρασίτου έχει σημασία όχι τόσο το συνολικό παρασιτικό φορτίο του δέρματος αλλά εκείνο στο επιπολής χόριο το οποίο είναι αδύνατο να μετρηθεί με τη real-time PCR, θα μπορούσε όμως να εκτιμηθεί με την ανοσοϊστοχημική εξέταση ή τον άμεσο ανοσοφθορισμό σε ιστοτεμάχια δέρματος (Travi et al., 2001; Saridomichelakis et al., 2007).

Σε πειραματικές συνθήκες διαπιστώθηκε ότι μια γάτα που ήταν μολυσμένη από *L. infantum* και εμφάνιζε στοματίτιδα και περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία μετέδωσε το παράσιτο στο 21% των *P. perniciosus* (Maroli et al., 2007), ενώ μια άλλη με αποφολιδωτική δερματίτιδα, ονυχογρύπωση, ανορεξία, κακή θρεπτική κατάσταση, μυϊκή ατροφία και περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία στο 13,1% των *L. longipalpis* (da Silva et al., 2010). Δεν υπάρχουν όμως δεδομένα για την ευκολία με την οποία το παράσιτο μπορεί να μεταδοθεί στη φύση, ιδιαίτερα μάλιστα όταν οι γάτες δεν εμφανίζουν συμπτώματα λεισμανίωσης αλλά το DNA του παρασίτου ανιχνεύεται στο αίμα ή το δέρμα τους.

Τέλος, δεν υπάρχουν ισχυρά επιστημονικά δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι η *L. infantum* όταν μεταδίδεται από τις γάτες στους φλεβοτόμους μπορεί να εξελιχθεί στο στάδιο του μετακυκλικού προμαστιγοφόρου και στη συνέχεια να μεταδοθεί σε άλλους ξενιστές. Η μόνη ίσως εξαίρεση είναι η διαπίστωση κοινών στελεχών του παρασίτου στους σκύλους και τις γάτες που ζούσαν στην ίδια περιοχή, γεγονός που

θα μπορούσε να αποδοθεί στη μέσω των φλεβοτόμων ανταλλαγή των παρασίτων μεταξύ των δύο αυτών ζωικών ειδών (Millán et al., 2011).

Συμπερασματικά, πολλά ερωτηματικά παραμένουν αναπάντητα αναφορικά με τον πραγματικό ρόλο που έχουν οι μολυσμένες γάτες για τη μετάδοση της *L. infantum* στους φλεβοτόμους. Πάντως τα αποτελέσματα της μελέτης, ιδιαίτερα η μεγάλη συχνότητα θετικής PCR στο αίμα και το δέρμα και το σχετικά μεγάλο παρασιτικό φορτίο στο αίμα (28-238/ml), μάλλον ενισχύουν την υπόθεση ότι οι γάτες αποτελούν δεξαμενή και όχι τυχαίο ξενιστή του παρασίτου. Τέλος, τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν απαραίτητο τον έλεγχο με PCR των αιμοδοτών ή των μονάδων αίματος γάτας, προκειμένου να αποφευχθεί η άμεση μετάδοση της *L. infantum* μέσω των μεταγίσεων.

## **5. Αρνητικό αποτέλεσμα των κυτταρολογικών εξετάσεων**

Με την κυτταρολογική εξέταση διάφορων βιολογικών υλικών και ιστών, όπως για παράδειγμα η στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη, τα λεμφογάγγλια, το δέρμα και ο μυελός των οστών, έχουν βρεθεί οι αμαστιγοφόρες μορφές του παρασίτου σε γάτες με συμπτώματα λεισμανίωσης, επιτρέποντας έτσι την οριστική διάγνωση της μόλυνσης (Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Savani et al., 2004; Leiva et al., 2005; Rüfenacht et al., 2005; Martín-Sánchez et al., 2007; Serrano et al., 2008; Marcos et al., 2009; Coelho et al., 2010; Vides et al., 2011). Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκαν ως διαγνωστικά μέσα στα πλαίσια επιδημιολογικών ερευνών, το αποτέλεσμα των εξετάσεων αυτών ήταν συνήθως αρνητικό, υποεκτιμώντας έτσι τη συχνότητα της μόλυνσης (Simões-Mattos et al., 2004; Bresciani et al., 2010; Costa et al., 2010; Sobrinho et al., 2012), όπως άλλωστε διαπιστώθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Γενικά, η ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης για την ανίχνευση των αμαστιγοφόρων μορφών εξαρτάται από το παρασιτικό φορτίο στον ιστό που εξετάζεται, την εμπειρία του εξεταστή και τον αριθμό των οπτικών πεδίων που εξετάζονται (Saridomichelakis et al., 2005). Στη μελέτη αυτή η κακή ποιότητα των παρασκευασμάτων ευθύνεται για το αρνητικό αποτέλεσμα σε ορισμένα μόνο από τα επιχρίσματα υλικού παρακέντησης λεμφογαγγλίου. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις και ιδιαίτερα προκειμένου για το μυελό των οστών, όπου εξετάστηκαν 1.000 οπτικά πεδία, η μηδενική ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης πρέπει να αποδοθεί στο παρασιτικό φορτίο που προφανώς ήταν αρκετό για να είναι θετικό το αποτέλεσμα της



PCR (16/100 γάτες) και της real-time PCR (6/100 γάτες), όχι όμως και της συγκριτικά λιγότερο ευαίσθητης κυτταρολογικής εξέτασης. Κατά ανάλογο τρόπο, η διαγνωστική ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης των λεμφογαγγλίων και του μυελού των οστών είναι κατά πολύ μικρότερη σε σκύλους ασυμπτωματικά μολυσμένους από τη *L. infantum* σε σύγκριση με εκείνους που πάσχουν από λεισμανίωση, αφού το παρασιτικό φορτίο των πρώτων είναι συνήθως μικρό ενώ εκείνο των δεύτερων μεγάλο (Saridomichelakis et al., 2005; Saridomichelakis, 2009).

Συμπερασματικά, λόγω της μικρής διαγνωστικής τους ευαισθησίας, η κυτταρολογική εξέταση επιχρισμάτων από τη στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη, το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του απευθυσμένου, το υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, τις δερματικές αλλοιώσεις, το μυελό των οστών και το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα δε συνιστάται για τον έλεγχο της συχνότητας μόλυνσης της γάτας από *L. infantum*.

## **6. Αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων για IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες έναντι της *Leishmania spp.***

Στους σκύλους, οι επιδημιολογικές μελέτες που στηρίζονται στις ορολογικές εξετάσεις οδηγούν σε εκτιμήσεις για τη συχνότητα της οροθετικότητας που είναι μικρότερη από τη συχνότητα της μόλυνσης αλλά μεγαλύτερη από τη συχνότητα της νόσου, μιας και πολλοί ασυμπτωματικά μολυσμένοι σκύλοι είναι ορολογικά αρνητικοί ενώ σχεδόν όλοι οι σκύλοι που εμφανίζουν τη νόσο είναι ορολογικά θετικοί και μάλιστα με μεγάλη συγκέντρωση ειδικών αντισωμάτων (Leontides et al., 2002; Saridomichelakis, 2009). Με βάση τις κλινικές παρατηρήσεις (Mancianti, 2004; Solano-Gallego et al., 2007) και τα ευρήματα από τις πειραματικές μολύνσεις (Kirkpatrick et al., 1984) που δείχνουν ότι οι γάτες είναι περισσότερο ανθεκτικές στη *L. infantum* σε σύγκριση με τους σκύλους, είναι αναμενόμενο ότι λίγες μολυσμένες γάτες θα παράγουν αντισώματα σε μεγάλες συγκεντρώσεις ή θα εμφανίσουν τη νόσο (Vita et al., 2005). Το γεγονός αυτό εξηγεί την πολύ μικρή ευαισθησία των ορολογικών εξετάσεων για τη διάγνωση των γατών που ήταν μολυσμένες από τη *L. infantum*, όπως επίσης και το σχετικά μικρό τίτλο IgG αντισωμάτων (1/40) ή OD (5,9% μεγαλύτερη από το όριο διαχωρισμού) που βρέθηκαν με την IFAT και την ELISA σε πέντε και μια μολυσμένες γάτες, αντίστοιχα.

Τα θετικά αποτελέσματα της IFAT για IgG σε 5 γάτες στις οποίες η PCR σε τέσσερεις διαφορετικούς ιστούς ήταν αρνητική πρέπει να θεωρηθούν ψευδώς-θετικά. Σε αυτό άλλωστε συναινεί και η έλλειψη σημαντικής συσχέτισης μεταξύ των αποτελεσμάτων της IFAT και της ELISA, που έχει παρατηρηθεί και παλαιότερα (Sobrinho et al., 2012) και η οποία επιπλέον δείχνει ότι κατά πάσα πιθανότητα αυτά τα ψευδώς-θετικά αποτελέσματα οφείλονται σε τεχνικά και όχι σε βιολογικά αίτια, μια που τα τελευταία δε θα μπορούσαν να επηρεάσουν μόνο την IFAT και όχι την ELISA. Άλλωστε στη χώρα μας δεν υπάρχουν μικροοργανισμοί του γένους *Trypanosoma* οι οποίοι είναι οι συχνότερα υπεύθυνοι για την εμφάνιση ψευδώς-θετικών αποτελεσμάτων των ορολογικών εξετάσεων λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων. Παρά το γεγονός ότι η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της IFAT, όπως εφαρμόστηκε στη μελέτη, ήταν ικανοποιητική, η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της εξέτασης αυτής, σε αντίθεση με την ELISA, είναι υποκειμενική. Επιπλέον, στις μικρές αραιώσεις των ορών όπου καταγράφηκαν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (1/10, 1/20 και 1/40), είναι πιθανό υπολείμματα της φθορίζουσας χρωστικής να εκτιμήθηκαν ως κυτταροπλασματικός φωσφορισμός και να ευθύνονται για αυτά τα ψευδώς-θετικά αποτελέσματα.

Οι επιδημιολογικές μελέτες της λεισμανίωσης της γάτας με βάση τις ορολογικές εξετάσεις που έγιναν σε περιοχές όπου η λεισμανίωση του σκύλου είναι ενδημική, έχουν καταλήξει σε αντιφατικά αποτελέσματα αναφορικά με τη συχνότητα της οροθετικότητας, όχι μόνο μεταξύ των χωρών αλλά και μεταξύ διαφορετικών περιοχών της ίδια χώρας (Vita et al., 2005). Για παράδειγμα η συχνότητα οροθετικότητας ποικίλλει από 0,6% μέχρι 17,4% στην Πορτογαλία (Maia et al., 2008; Duarte et al., 2010), από 1,3% μέχρι 60% στην Ισπανία (Martín-Sánchez et al., 2007; Ayllon et al., 2008), από 0,9% μέχρι 68% στην Ιταλία (Pennisi, 2002; Poli et al., 2002) και από 0,7% μέχρι 50,5% στη Βραζιλία (Simões-Mattos et al., 2004; Bresciani et al., 2010). Οι εντυπωσιακές αυτές διαφορές έχουν αποδοθεί σε πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων το είδος της ορολογικής εξέτασης που κάθε φορά χρησιμοποιείται (Solano-Gallego et al., 2007; Ayllón et al., 2012), το όριο διαχωρισμού για την εκτίμηση του θετικού αποτελέσματος που μάλιστα μερικές φορές επιλέγεται αυθαίρετα (da Silva et al., 2008; Coelho et al., 2011a) και ενδεχομένως τα πληθυσμιακά χαρακτηριστικά των γατών που περιλαμβάνονται σε κάθε μελέτη (Poli et al., 2002; Ayllón et al., 2012). Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν τη σημασία των δύο πρώτων από τους παραπάνω παράγοντες.

Αν δεν είχαν ελεγχθεί οι γάτες με την PCR σε τέσσερις διαφορετικούς ιστούς, ώστε να φανούν τα ψευδώς-θετικά αποτελέσματα της IFAT, η συχνότητα της οροθετικότητας θα είχε υπολογιστεί σε 10% με βάση την εξέταση αυτή και μόλις σε 1% με βάση την ELISA.

Σε αντίθεση με την ELISA για την οποία έχει τεκμηριωθεί η μεθοδολογία καθορισμού των ορίων διαχωρισμού για τα θετικά και τα αμφίβολα αποτελέσματα με τη χρήση ορών από γάτες που ζουν σε περιοχές όπου η *L. infantum* δεν είναι ενδημική (Solano-Gallego et al., 2007), δεν υπάρχουν αντίστοιχες πληροφορίες για την IFAT. Όταν η τελευταία χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες της λείσμανίωσης του σκύλου το όριο διαχωρισμού μπορεί να καθοριστεί είτε με βάση τους τίτλους σκύλων που ζουν σε μη ενδημικές περιοχές ή με τη βοήθεια γνωστών θετικών και αρνητικών ορών από σκύλους που ζουν στην ίδια ενδημική περιοχή (Quinnell et al., 1997). Στην παρούσα μελέτη το τελευταίο δεν ήταν εφικτό αφού δεν υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα από γνωστές οροθετικές γάτες, οπότε το όριο διαχωρισμού για το αποτέλεσμα της IFAT καθορίστηκε με βάση τα αποτελέσματα των ορών 75 γατών από τις Η.Π.Α. Στη συνέχεια, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως αν είχε επιλεγεί μεγαλύτερο όριο διαχωρισμού (1/40) θα αυξανόταν λίγο η ειδικότητα της εξέτασης σε περίπτωση όμως που αυτό επιλεγόταν να είναι ακόμα μεγαλύτερο (π.χ. 1/50-1/160) θα μειωνόταν η ευαισθησία της. Επιπλέον, η ανάλυση με την καμπύλη ROC των αποτελεσμάτων της ELISA έδειξε ότι ο τρόπος καθορισμού του ορίου διαφοροποίησης που έχει προταθεί (Solano-Gallego et al., 2007) και υιοθετήθηκε στη μελέτη αυτή είναι ιδανικός ώστε να αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Στη μελέτη η πιθανότητα θετικού αποτελέσματος της IFAT για IgG έναντι της *L. infantum* δε συνδεόταν με τα στοιχεία ταυτότητας των γατών ή τις συνθήκες διαβίωσής τους, όπως άλλωστε βρέθηκε και στις περισσότερες από τις προηγούμενες ανάλογες μελέτες (Solano-Gallego et al., 2007; Ayllon et al., 2008; Nasereddin et al., 2008; Diakou et al., 2009; Sarkari et al., 2009; Coelho et al., 2011a) με μόνη εξαίρεση μια δημοσίευση από την Πορτογαλία όπου η συχνότητα της οροθετικότητας ήταν μεγαλύτερη στις αρσενικές, τις μεγαλύτερες των 2 ετών και τις γάτες που ζούσαν σε αγροτικές περιοχές (Cardoso et al., 2010).

Τα αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων στην ίδια γάτα μπορεί να μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου (Vita et al., 2005) και τουλάχιστον στο σκύλο η συχνότητα της οροθετικότητας συνήθως αυξάνει την περίοδο

δραστηριότητας των φλεβοτόμων για να μειωθεί στη συνέχεια (Acedo-Sánchez et al., 1998). Με το δεδομένο ότι χρειάζεται κάποιο χρονικό διάστημα από την έκθεση στα μολυσματικά νύγματα των φλεβοτόμων μέχρι την παραγωγή ειδικών για το πρωτόζωο αντισωμάτων, επιλέχθηκε να συγκριθεί η συχνότητα της οροθετικότητας μεταξύ των γατών που εξετάστηκαν μεταξύ Μαΐου και Δεκεμβρίου με εκείνη των γατών που εξετάστηκαν τους υπόλοιπους μήνες του χρόνου. Σε αντίθεση με την PCR που ήταν συχνότερα θετική στις γάτες που εξετάστηκαν την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων, το αποτέλεσμα της IFAT δε διέφερε μεταξύ των δύο παραπάνω ομάδων, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην αλλοίωση των αποτελεσμάτων από τις ψευδώς-θετικές αντιδράσεις.

Σε προηγούμενες μελέτες δε βρέθηκε διαφορά στη συχνότητα της οροθετικότητας μεταξύ των κλινικά υγιών και των ασθενών γατών (Solano-Gallego et al., 2007; Ayllón et al., 2008; Cardoso et al., 2010; Ayllón et al., 2012), με μόνη εξαίρεση μια δημοσίευση από την Ισπανία, όπου οι γάτες με δερματικές αλλοιώσεις συμβατές με τη λεισμανίωση ήταν συχνότερα οροθετικές (Sherry et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη, η έλλειψη διαφοράς μεταξύ των ομάδων Α και Β και η έλλειψη συσχετισμού μεταξύ του αποτελέσματος της IFAT και της κλινικής εικόνας των γατών της ομάδας Β θα μπορούσαν να αποδοθούν στη φυσική ανθεκτικότητα της γάτας απέναντι στη *L. infantum* ή στα ψευδώς-θετικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα μάλιστα αν ληφθεί υπόψη ο συσχετισμός μεταξύ του αποτελέσματος της PCR και της διαπίστωσης ενός τουλάχιστον συμπτώματος που είναι ενδεικτικό της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και έχει συνδεθεί με τη λεισμανίωση της γάτας (βλ. παρακάτω).

Η χορήγηση φαρμάκων που προκαλούν ανοσοκαταστολή και η μόλυνση από τους ρετροϊούς της γάτας ενδέχεται να μειώσουν την ανθεκτικότητα των γατών που είναι μολυσμένες από τη *L. infantum* αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα να εμφανίσουν τη νόσο (Leiva et al., 2005; Maroli et al., 2007; Vides et al., 2011) και ενδεχομένως την πιθανότητα να γίνουν ορολογικά θετικές (Pennisi, 2002; Sherry et al., 2011). Αν και καμία από τις γάτες της μελέτης δε λάμβανε ανοσορυθμιστική αγωγή για εύλογο χρονικό διάστημα πριν τη δειγματοληψία, οι τρεις και οι οκτώ από τις 100 γάτες ήταν μολυσμένες από τους ιούς FeLV και FIV, αντίστοιχα. Η έλλειψη συσχετισμού μεταξύ των ιογενών αυτών λοιμώξεων και της οροθετικότητας για τη *Leishmania* spp. είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα αρκετών προηγούμενων μελετών (Vita et al., 2005; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007; Ayllón et al., 2008; Coelho et al., 2011a; Ayllón et al., 2012), όπως άλλωστε ισχύει και για τους υπόλοιπους

μολυσματικούς παράγοντες που εξετάστηκαν και συγκεκριμένα το FCV και το *T. gondii* (Solano-Gallego et al., 2007; Nasereddin et al., 2008; Cardoso et al., 2010; Coelho et al., 2011a). Αντίθετα, η μελέτη αυτή είναι η πρώτη όπου μελετήθηκε και αποδείχθηκε η έλλειψη συσχετισμού μεταξύ της οροθετικότητας των γατών έναντι της *L. infantum* και της *B. hensellae*.

Συνολικά λοιπόν σε ότι αφορά την IFAT και την ELISA για την ανίχνευση IgG έναντι της *L. infantum* συμπεραίνεται ότι οι ορολογικές αυτές εξετάσεις χαρακτηρίζονται από μικρή ευαισθησία αλλά σχετικά μεγάλη ειδικότητα και ότι η διαγνωστική τους αξιοπιστία δε μπορεί να βελτιωθεί ιδιαίτερα μεταβάλλοντας προς τη μια ή την άλλη κατεύθυνση το όριο διαχωρισμού για το χαρακτηρισμό του αποτελέσματος ως θετικού. Φαίνεται λοιπόν ότι, ενώ οι εξετάσεις αυτές εξακολουθούν να έχουν διαγνωστική αξία όταν το αποτέλεσμα είναι θετικό (μεγάλη ειδικότητα, ιδιαίτερα για την ELISA) δεν είναι κατάλληλες για επιδημιολογικές μελέτες της μόλυνσης της γάτας από *L. infantum*.

Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η παραγωγή IgM αντισωμάτων έναντι της *L. infantum* στις μολυσμένες γάτες. Σε σκύλους με φυσική ή πειραματική νόσο τα αντισώματα αυτά μπορεί να ανιχνευτούν, αν και λιγότερο συχνά σε σύγκριση με τις IgG (Rodríguez et al., 2003; Reis et al., 2006; Rodríguez et al., 2006; Rodríguez-Cortés et al., 2007a; Rodríguez-Cortés et al., 2007b; de Freitas et al., 2012) και δε θεωρούνται δείκτες του αρχικού σταδίου της νόσου (Rodríguez-Cortés et al., 2007b). Το ίδιο ενδέχεται να ισχύει και στις γάτες δεδομένου ότι η μόνη γάτα της μελέτης που ήταν θετική στην IFAT για IgM ήταν μολυσμένη και εξετάστηκε στα μέσα του Ιανουαρίου του 2009, δηλαδή αρκετά μετά το τέλος της περιόδου δραστηριότητας των φλεβοτόμων.

## **7. Επιπτώσεις της μόλυνσης της γάτας από *L. infantum***

Οι γάτες θεωρούνται γενικά ανθεκτικές έναντι της *L. infantum* (Kirkpatrick et al., 1984; Mancianti, 2004; Pennisi et al., 2013) γεγονός που εξηγεί την έλλειψη διαφοράς σε ότι αφορά τη συχνότητα της μόλυνσης μεταξύ των κλινικά υγίων και των ασθενών γατών, τόσο σε αυτή όσο και σε προηγούμενες μελέτες (Sherry et al., 2011). Ωστόσο η φυσική αυτή ανθεκτικότητα δε διαπιστώνεται σε όλες τις γάτες αφού ορισμένες από αυτές εμφανίζουν τα συμπτώματα και τα εργαστηριακά ευρήματα της νόσου (Pennisi et al., 2013). Ο συσχετισμός μεταξύ της μόλυνσης και της διαπίστωσης ενός τουλάχιστον συμπτώματος που είναι ενδεικτικό της προσβολής

των εσωτερικών οργάνων και έχει συνδεθεί με τη λειψμανίωση της γάτας, ενδέχεται να σημαίνει ότι η *L. infantum* είχε παθογόνο δράση σε ορισμένες από τις γάτες της ομάδας Β. Ωστόσο η πραγματική συμβολή ή όχι του παρασίτου στη συμπτωματολογία των γατών αυτών παραμένει αδιευκρίνιστη, αφού οι κλινικές τους εκδηλώσεις μπορούν να αποδοθούν σε διάφορα άλλα νοσήματα ή παθολογικές καταστάσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, ο μόνος τρόπος για να αποδειχθεί ο παθογενετικός ρόλος της *L. infantum* είναι να διαπιστωθεί το παράσιτο στα προσβεβλημένα όργανα και ιστούς, να συνυπάρχει κοκκιωματώδης ή πυοκοκκιωματώδης φλεγμονή και τα συμπτώματα να υποχωρήσουν με την ειδική αντιλειτουργική θεραπεία (Saridomichelakis, 2009), αφού οι κλινικές εκδηλώσεις της λειψμανίωσης της γάτας δεν είναι χαρακτηριστικές και μοιάζουν με εκείνες άλλων συχνότερων παθολογικών καταστάσεων (Martín-Sánchez et al., 2007).

Η μη διαπίστωση διαφορών στη συχνότητα των αποτελεσμάτων της αιματολογικής εξέτασης που βρίσκονταν εκτός των τιμών αναφοράς μεταξύ των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών της ομάδας Β, είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Paludo et al., 2008) και υποδηλώνει ότι η μόλυνση δεν συνδέεται με τις αιματολογικές εκείνες διαταραχές που έχουν περιγραφεί σε γάτες με λειψμανίωση και στις οποίες περιλαμβάνονται η αναιμία, η λευκοπενία, η λευκοκυττάρωση, η ουδετεροπενία, η ουδετεροφιλία, η λεμφοπενία, η θρομβοκυτταροπενία και η παγκυτταροπενία (Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Rüfenacht et al., 2005; Marcos et al., 2009; da Silva et al., 2010; Pennisi et al., 2013). Από την άλλη όμως πλευρά, δε μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η μόλυνση από *L. infantum* να συνέβαλλε, μαζί με τα υπόλοιπα νοσήματα και παθολογικές καταστάσεις, στην εμφάνιση των παραπάνω αιματολογικών διαταραχών σε μικρό αριθμό των γατών της ομάδας Β. Όπως και στην περίπτωση των συμπτωμάτων, η υπόθεση αυτή είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αποδειχθεί και ο μόνος τρόπος για να γίνει αυτό είναι να παραμείνουν τα αιματολογικά ευρήματα μετά την οριστική θεραπευτική αντιμετώπιση των νοσημάτων που συνυπάρχουν και στη συνέχεια να υποχωρήσουν με την ειδική αντιλειτουργική θεραπεία (Saridomichelakis, 2009).

Η δραστηριότητα της ALP ήταν αυξημένη σε 0/50 γάτες της ομάδας Α, σε 5/20 (25%) γάτες της ομάδας Β που ήταν μολυσμένες από *L. infantum* και σε 1/30 (3,3%) από τις μη μολυσμένες γάτες της ίδιας ομάδας με τη διαφορά μεταξύ των τελευταίων να είναι σημαντική ( $P=0,032$ ). Η τελική διάγνωση για τις μολυσμένες

γάτες της ομάδας Β που είχαν αυξημένη δραστηριότητα της ALP ήταν: α) σε δύο γάτες η πρωτογενής ηπατοπάθεια που θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε χολαγγειοηπατίτιδα ή σε λιποείδωση του ήπατος, με ταυτόχρονη ουρολοίμωξη από *E. coli* σε μια από αυτές, β) σε δύο γάτες το πολυκεντρικό λέμφωμα, και γ) σε μια γάτα η ηπατική λιποείδωση που ο σακχαρώδης διαβήτης, πιθανότατα τύπου ΙΙ, προκαλεί. (Feldman and Nelson, 2004). Στη γάτα η ALP υπάρχει στη μεμβράνη των κυττάρων διαφόρων ιστών και οργάνων, όπως για παράδειγμα τα ενδοθηλιακά κύτταρα των χολαγγείων, τα οστά, το έντερο, οι νεφροί και ο πλακούντας, από όπου απελευθερώνεται, μέσω της δράσης πρωτεασών, σε περίπτωση κυτταρικής βλάβης για να ανιχνευτεί στη συνέχεια στον ορό του αίματος (Everett et al., 1977a; Everett et al., 1977b; Hoffman et al., 1977; Hoffmann et al., 1977; Horney et al., 1992; Ghosh and Mullins, 1995; Foster and Thoday, 2000; Hoffman and Solter, 2008). Τα χολαγγεία είναι η συχνότερη πηγή προέλευσης της ALP όταν η δραστηριότητά της στον ορό του αίματος της γάτας είναι αυξημένη, γεγονός που εν μέρει οφείλεται στο μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής του ηπατικού (περίπου 6 ώρες) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ισόενζυμα (περίπου 2 λεπτά) της ALP (Everett et al., 1977b; Hoffman et al., 1977; Hoffmann et al., 1977; Center et al., 1986; Hoffman and Solter, 2008; Washabau and Day, 2012; Chapman and Hostutler, 2013). Συγκεκριμένα, τα συχνότερα αίτια αυξημένης δραστηριότητας της ALP στις ενήλικες γάτες είναι η λιποείδωση του ήπατος, η χολαγγειοηπατίτιδα, η τριαδίτιδα, η ηπατοπάθεια λόγω τοξίκωσης από φάρμακα (ιδιαίτερα από μεθειμαζόλη ή καρβιμαζόλη), οι εξωηπατικές παθήσεις της χοληφόρου οδού (χολοκυστίτιδα, χολολιθίαση, ρήξη χοληδόχου κύστης, έμφραξη χοληφόρου πόρου), η λοιμώδης περιτονίτιδα, τα νεοπλάσματα του ήπατος (όπως για παράδειγμα το λέμφωμα) και οι δευτερογενείς ηπατοπάθειες που οφείλονται στον υπερθυρεοειδισμό και το σακχαρώδη διαβήτη (Peterson et al., 1983; Peterson et al., 1988; Hubbard and Vulgamott, 1992; Thoday and Mooney, 1992; Broussard et al., 1995; Archer and Taylor, 1996; Bruner et al., 1997; Gagne et al., 1999; Brown et al., 2000; Foster and Thoday, 2000; Carreras et al., 2003; Ferreri et al., 2003; Center, 2005, 2009; Callahan Clark et al., 2011; Washabau and Day, 2012; Chapman and Hostutler, 2013; Caney, 2013). Τα παραπάνω εύκολα εξηγούν την αυξημένη δραστηριότητα της ALP στις δύο γάτες με το πολυκεντρικό λέμφωμα καθώς και σε εκείνη με το σακχαρώδη διαβήτη, παθολογικές καταστάσεις που θα ήταν απίθανο να συνδέονται αιτιοπαθογενετικά με τη λειψμανίωση. Όμως οι άλλες δύο γάτες είχαν πρωτογενή ηπατοπάθεια που θα μπορούσε να είναι είτε

χολαγγειοπατίτιδα ή λιποείδωση του ήπατος, αφού όλα τα υπόλοιπα αίτια αυξημένης δραστηριότητας της ALP είχαν αποκλειστεί με βάση το ιστορικό, την κλινική εικόνα και τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων (με μόνη ίσως εξαίρεση τα νεοπλάσματα του ήπατος και τον υπερθυρεοειδισμό, που όμως δείχνουν μη πιθανά αφού επρόκειτο για νεαρές γάτες ηλικίας 2 και 4 ετών, αντίστοιχα και δε διαπιστώθηκε βρογχοκίλη). Δυστυχώς οι ιδιοκτήτες των γατών αυτών δεν επέτρεψαν την ιστοπαθολογική εξέταση που ήταν απαραίτητη για την οριστική διάγνωση, ενώ επιπλέον θα επέτρεπε να διερευνηθεί ο τυχόν παθογενετικός ρόλος της μόλυνσης από *Leishmania* spp. Τουλάχιστον στο σκύλο το παράσιτο αυτό μπορεί να προκαλέσει πρωτογενή ηπατοπάθεια που συνήθως είναι υποκλινική, έχει συγκεκριμένα ιστοπαθολογικά ευρήματα, που έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τρία στάδια ανάλογα με τη βαρύτητά τους, και μπορεί να συνοδεύεται από αύξηση της δραστηριότητας των ALP και ALT και μερικές φορές από αύξηση της συγκέντρωσης της ολικής χολερυθρίνης (Rallis et al., 2005). Επιπλέον σε δύο γάτες με τη νόσο έχει περιγραφεί ηπατοπάθεια που χαρακτηρίζονταν από κοκκιωματώδη φλεγμονή με διήθηση μακροφάγων, λεμφοκυττάρων και πλασμοκυττάρων, κυρίως στα περιτυλαία διαστήματα, ίνωση και νέκρωση των ηπατοκυττάρων (Marcos et al., 2009; Navarro et al., 2010). Κατά συνέπεια η αυξημένη δραστηριότητα της ALP στις μολυσμένες γάτες, που άλλωστε έχει διαπιστωθεί και σε προηγούμενη μελέτη (Paludo et al., 2008), μπορεί να μην αποτελεί τυχαίο εύρημα αλλά να συνδέεται με τη μόλυνση από *L. infantum*.

Εξαιτίας του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της ALP στη γάτα και του γεγονότος ότι η δραστηριότητά της δεν αυξάνει σε όλες τις περιπτώσεις ενδοηπατικής και εξωηπατικής χολόστασης, η μέτρησή της πρέπει να συνδυάζεται με εκείνη της ολικής χολερυθρίνης, της γ-GT και των χολικών οξέων του ορού (Center et al., 1986). Στη μελέτη αυτή, η αυξημένη συγκέντρωση της ολικής χολερυθρίνης διαπιστώθηκε συχνότερα ( $P=0,032$ ) στις μολυσμένες από *L. infantum* γάτες της ομάδας B και συγκεκριμένα σε τρεις από τις γάτες με αυξημένη δραστηριότητα της ALP (τις δύο με την πρωτογενή ηπατοπάθεια και τη μια από τις δύο με πολυκεντρικό λέμφωμα) αλλά και σε δύο ακόμα γάτες από τις οποίες η μια είχε την αποφρακτική μορφή του συνδρόμου της κατώτερης ουροφόρου οδού και οξεία νεφρική ανεπάρκεια, ενώ η άλλη έπασχε από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και ουρολοίμωξη από *E. coli*, ενώ καμία από τις δύο δεν είχε αναιμία, ώστε να δημιουργηθεί υποψία αιμόλυσης (Rothuizen, 2009). Στην πρώτη από τις δύο τελευταίες γάτες η συγκέντρωση της



ολικής χολερυθρίνης (1 mg/dl) ήταν οριακά μεγαλύτερη από τις τιμές αναφοράς (0-0,9 mg/dl) και δε μπορεί να αξιολογηθεί ιδιαίτερα ενώ για τη δεύτερη από αυτές η υπερχολερυθριναιμία πιθανώς οφειλόταν σε συνυπάρχουσα ηπατοπάθεια με χολόσταση (π.χ. λιποείδωση του ήπατος ή χολαγγειοηπατίτιδα) που, για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, δε μπόρεσε να διερευνηθεί περισσότερο (Center, 2005; Rothuizen, 2009; Chapman and Hostutler, 2013). Τέλος η αυξημένη δραστηριότητα της  $\gamma$ -GT που διαπιστώθηκε μόνο σε τρεις μολυσμένες από *L. infantum* γάτες της ομάδας B (μια με αυξημένη ALP και σακχαρώδη διαβήτη, μια με αυξημένη ALP, αυξημένη ολική χολερυθρίνη και πρωτογενή ηπατοπάθεια και μια με αυξημένη ALP, αυξημένη ολική χολερυθρίνη και πολυκεντρικό λέμφωμα) και σε καμία από τις μη μολυσμένες γάτες της ίδιας ομάδας ( $P=0,058$ ), αυξάνει ακόμα περισσότερο τις υποψίες ότι η *L. infantum* μπορεί να έχει κάποιο παθογενετικό ρόλο στις ηπατοπάθειες της γάτας (Braun et al., 1983; Spano et al., 1983; Center, 2007). Δυστυχώς από το σχεδιασμό της μελέτης, δεν ήταν εφικτή η μέτρηση της συγκέντρωσης των χολικών οξέων στον ορό του αίματος μετά από 12ωρη νηστεία καθώς και δύο ώρες μετά το γεύμα που θα έδινε περισσότερα δεδομένα. Παρά το γεγονός αυτό, η παραπάνω υπόθεση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης σε μελλοντικές κατάλληλα σχεδιασμένες μελέτες.

Από τις 100 γάτες της μελέτης αυξημένη συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου στο αίμα διαπιστώθηκε μόνο σε τρεις που ανήκαν στην ομάδα B και ήταν μολυσμένες από τη *L. infantum* ( $P=0,03$ ). Οι δύο από τις τρεις αυτές γάτες έπασχαν από οξεία νεφρική ανεπάρκεια λόγω της αποφρακτικής μορφής του συνδρόμου της κατώτερης ουροφόρου οδού, ενώ η τρίτη από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια άγνωστης αιτιολογίας, που είναι και τα συχνότερα αίτια υπερφωσφαταιμίας στη γάτα (Tuzio, 2001; Javadi et al., 2005; Kidder and Chew, 2009). Επιπλέον, οι τρεις αυτές γάτες ήταν οι μόνες της ομάδας B που είχαν αυξημένη συγκέντρωση κρεατινίνης (Segev et al., 2011) αν και η διαφορά από τις μη μολυσμένες γάτες δεν ήταν σημαντική ( $P=0,058$ ), ενδεχομένως λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος. Στους νεφρούς δύο γατών με λεϊσμανίωση έχουν βρεθεί αλλοιώσεις (σπειραματονεφρίτιδα και διάμεση νεφρίτιδα με κοκκιωματώδη φλεγμονή) αντίστοιχες με εκείνες της λεϊσμανίωσης του σκύλου (Plevraki et al., 2006; Marcos et al., 2009; Navarro et al., 2010). Επιπλέον, δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις ασθενών γατών με αυξημένη συγκέντρωση κρεατινίνης (Pennisi et al., 2004; Marcos et al., 2009), η τελευταία έχει βρεθεί να είναι μεγαλύτερη στις μολυσμένες σε σύγκριση με τις μη μολυσμένες γάτες

(Paludo et al., 2008), ενώ δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα περίπτωση γάτας που να πάσχει ταυτόχρονα από λεϊμανίωση και σύνδρομο της κατώτερης ουροφόρου οδού. Με βάση τα παραπάνω και το γεγονός ότι τα αίτια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και του συνδρόμου της κατώτερης ουροφόρου οδού της γάτας είναι πολλαπλά αλλά συχνά παραμένουν αδιευκρίνιστα, πρέπει στο μέλλον να διερευνηθεί ο πιθανός παθογενετικός ρόλος της *L. infantum* στην εμφάνιση αυτών των παθολογικών καταστάσεων.

Αναφορικά με τις κλινικά υγιείς γάτες της ομάδας A, τόσο αυτές που ήταν μολυσμένες από τη *L. infantum* όσο και εκείνες που δεν ήταν μολυσμένες, βρέθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελέσματα της αιματολογικής και της βιοχημικής εξέτασης στον ορό του αίματος που βρίσκονταν εκτός των τιμών αναφοράς. Αυτό ήταν σε μεγάλο βαθμό αναμενόμενο με βάση τον τρόπο που υπολογίζονται οι τελευταίες (95% CI των αποτελεσμάτων από κλινικά υγιείς γάτες), την πιθανότητα αναλυτικού σφάλματος, το σύνδρομο καταπόνησης που συνοδεύει τους χειρισμούς των ζώων, την επίδραση των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημική συγκράτηση και το γεγονός ότι διάφορα νοσήματα και παθολογικές καταστάσεις μπορεί να συνοδεύονται από εργαστηριακά αλλά όχι από κλινικά ευρήματα που να γίνουν αντιληπτά από τον ιδιοκτήτη της γάτας ή τον Κτηνίατρο κατά την κλινική εξέταση. Σε κάθε πάντως περίπτωση, η μόνη διαφορά που διαπιστώθηκε μεταξύ των μολυσμένων και των μη μολυσμένων από *L. infantum* γατών της ομάδας A αφορούσε στη μεγαλύτερη συχνότητα αυξημένου αριθμού άωρων ουδετερόφιλων στις μη μολυσμένες γάτες, που προφανώς δεν είχε καμία βιολογική σημασία και πρέπει να θεωρηθεί τυχαίο εύρημα.

## Ε) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- 1) Η *L. infantum* είναι το μόνο είδος του γένους *Leishmania* που βρέθηκε στις μολυσμένες γάτες από τη Θεσσαλία και τη Μακεδονία
- 2) Η συχνότητα μόλυνσης της γάτας από τη *L. infantum* είναι αρκετά μεγάλη (41%) και δε διαφέρει μεταξύ των κλινικά υγιών γατών (42%) και εκείνων που εμφανίζουν δερματικές αλλοιώσεις, συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων (40%)
- 3) Η εξέταση δειγμάτων από πολλαπλούς ιστούς με την PCR είναι απαραίτητη προκειμένου να μην υποεκτιμηθεί η συχνότητα μόλυνσης της γάτας από τη *L. infantum*
- 4) Η διαγνωστική ευαισθησία της PCR για την ανίχνευση του DNA της *L. infantum* στη γάτα διαφέρει μεταξύ των τεσσάρων ιστών που εξετάστηκαν και είναι σημαντικά μικρότερη στο υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα σε σύγκριση με τα ιστοτεμάχια του δέρματος και το μυελό των οστών
- 5) Κανένας παράγοντας που διερευνήθηκε και σχετιζόταν με τα στοιχεία ταυτότητας των γατών και τις συνθήκες διαβίωσής τους δε βρέθηκε να συνδέεται με την πιθανότητα μόλυνσης από τη *L. infantum*
- 6) Η πιθανότητα θετικού αποτελέσματος της PCR για την ανίχνευση του DNA της *L. infantum* είναι μεγαλύτερη όταν οι γάτες εξετάζονται την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων
- 7) Η πιθανότητα θετικού αποτελέσματος της PCR για την ανίχνευση του DNA της *L. infantum* δε διαφέρει μεταξύ των γατών που είναι ορολογικά θετικές ή αρνητικές για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *B. hensellae*
- 8) Η κυτταρολογική εξέταση επιχρισμάτων από τη στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη, το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του απευθυσμένου, το υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, τις δερματικές αλλοιώσεις, το μυελό των οστών και το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα δε συνιστάται για τον έλεγχο της συχνότητας μόλυνσης της γάτας από *L. infantum* λόγω της μικρής της ευαισθησίας
- 9) Οι ορολογικές εξετάσεις IFAT και ELISA για την ανίχνευση των ειδικών IgG ανοσοσφαιρινών έναντι της *L. infantum* χαρακτηρίζονται από πολύ μικρή ευαισθησία

η οποία δε μπορεί να βελτιωθεί μεταβάλλοντας το όριο διαχωρισμού για την εκτίμηση του αποτελέσματος, γεγονός που δημιουργεί αμφιβολίες για την αξία των επιδημιολογικών μελετών που στηρίζονται στις εξετάσεις αυτές. Αντίθετα, οι παραπάνω εξετάσεις έχουν σχετικά μεγάλη ειδικότητα (ιδιαίτερα η ELISA), οπότε το θετικό τους αποτέλεσμα αυξάνει την πιθανότητα μόλυνσης από *L. infantum*

10) Η πιθανότητα θετικού αποτελέσματος της IFAT για την ανίχνευση IgG ανοσοσφαιρινών έναντι της *L. infantum* δεν εξαρτάται από την ταυτόχρονη μόλυνση από FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* ή *B. hensellae*

11) Οι γάτες με θετικό αποτέλεσμα της PCR για την ανίχνευση του DNA της *L. infantum* έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίζουν ένα τουλάχιστον σύμπτωμα που είναι ενδεικτικό της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και έχει συνδεθεί με τη λεισμανίωση της γάτας

12) Δεν υπάρχει διαφορά στη συχνότητα αποτελεσμάτων της αιματολογικής εξέτασης εκτός των τιμών αναφοράς μεταξύ των μολυσμένων από *L. infantum* και των μη μολυσμένων γατών, τόσο εκείνων που είναι κλινικά υγιείς όσο και εκείνων που εμφανίζουν δερματικές αλλοιώσεις, συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων

13) Η μόλυνση από *L. infantum* σε γάτες που εμφανίζουν δερματικές αλλοιώσεις, συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων συνδέεται με μεγαλύτερη συχνότητα αυξημένης δραστηριότητας της ALP και αυξημένης συγκέντρωσης της ολικής χολερυθρίνης και του ανόργανου φωσφόρου σε σύγκριση με τις μη μολυσμένες γάτες, γεγονός που δημιουργεί υπόνοια παθογενετικού ρόλου του παρασίτου στις ηπατοπάθειες και τις νεφροπάθειες της γάτας.

## ΣΤ) ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδωσαν σημαντικές απαντήσεις αναφορικά με τη συχνότητα μόλυνσης της γάτας από *L. infantum*, τη διάγνωσή της και τους παράγοντες που την επηρεάζουν. Παράλληλα δημιουργήθηκαν νέα ερωτήματα που μπορεί να αποτελέσουν εφελκυστικό για μελλοντικές, κατάλληλα σχεδιασμένες για το σκοπό αυτό, μελέτες. Ενδεικτικά, θα μπορούσε να διερευνηθεί:

- 1) Η πιθανότητα και η συχνότητα μόλυνσης της γάτας από τις *L. tropica* και *L. major* μέσω της PCR σε ιστοτεμάχια δέρματος με ή χωρίς αλλοιώσεις που θα παρθούν από γάτες που ζουν σε νοτιότερες περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας και στα νησιά
- 2) Η πιθανότητα αύξησης της ευαισθησίας της PCR σε υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα όταν λαμβάνεται και εξετάζεται υλικό και από τους δύο οφθαλμούς
- 3) Η πιθανότητα αυτοπεριορισμού της μόλυνσης από *L. infantum* μετά το τέλος της περιόδου δραστηριότητας των φλεβοτόμων μέσω του διαχρονικού ελέγχου με PCR των μολυσμένων γατών
- 4) Η προέλευση του γεύματος των φλεβοτόμων που είναι μολυσμένοι από *L. infantum* και ιδιαίτερα εκείνων που αποτελούν γνωστούς μεταδότες του παρασίτου στη χώρα μας (π.χ. *P. neglectus*), ώστε να διευκρινιστεί κατά πόσο οι γάτες αποτελούν πηγή μόλυνσης για τα έντομα αυτά
- 5) Η ακριβής εντόπιση της *L. infantum* στο δέρμα των μολυσμένων γατών με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημικής εξέτασης ή του άμεσου ανοσοφθορισμού σε ιστοτεμάχια δέρματος
- 5) Ο πιθανός παθογενετικός ρόλος της μόλυνσης από *L. infantum* σε μολυσμένες γάτες που εμφανίζουν συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και ιδιαίτερα σε εκείνες με ηπατοπάθεια, σύνδρομο της κατώτερης ουροφόρου οδού και νεφροπάθεια

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΤΗΣ ΓΑΤΑΣ ΑΠΟ *LEISHMANIA* SPP.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μόλυνση της γάτας από τη *L. infantum* έχει διαπιστωθεί σε περιοχές όπου η λεϊσμανίωση του σκύλου που οφείλεται στο ίδιο πρωτόζωο είναι ενδημική και συγκεκριμένα στις μεσογειακές χώρες, την Πορτογαλία, τη Βραζιλία και το Ιράν. Η επιδημιολογική σημασία της μόλυνσης της γάτας παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη λόγω του σχετικά μικρού αριθμού κατάλληλα σχεδιασμένων μελετών, των αντιφατικών τους αποτελεσμάτων και των ελάχιστων ερευνητικών δεδομένων αναφορικά με την ικανότητα των μολυσμένων γατών να μεταδίδουν το πρωτόζωο στους φλεβοτόμους. Με τα μέχρι τώρα δεδομένα φαίνεται ότι οι γάτες που ζουν στις παραπάνω περιοχές μπορούν, περισσότερο ή λιγότερο συχνά, να μολυνθούν από τη *L. infantum* χωρίς συνήθως να εμφανίζουν συμπτώματα ή εργαστηριακά ευρήματα της νόσου, γεγονός που αποδίδεται στο γενετικό τους υπόστρωμα το οποίο ευνοεί την ανθεκτικότητα απέναντι στη νόσο. Σε ορισμένες όμως μολυσμένες γάτες μπορεί να διαπιστωθούν δερματικές αλλοιώσεις (συχνότερα έλκη και οζίδια), συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων (ιδιαίτερα περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία και συμπτώματα λόγω νεφροπάθειας) που μπορεί να συνοδεύονται από παθολογικά ευρήματα από την αιματολογική (π.χ. αναιμία), τις βιοχημικές εξετάσεις (π.χ. υπερσφαιριναιμία, αζωθαιμία, αυξημένη δραστηριότητα των ALP, ALT και AST) και την ανάλυση των ούρων (π.χ. πρωτεϊνουρία). Η διάγνωση της μόλυνσης από τη *L. infantum* στα πλαίσια επιδημιολογικών μελετών γίνεται συνήθως με μοριακές (PCR) και ορολογικές εξετάσεις, ενώ για τη διάγνωση της νόσου έχουν χρησιμοποιηθεί επιπλέον η κυτταρολογική, η ιστοπαθολογική εξέταση και η καλλιέργεια.

Οι στόχοι της μελέτης αυτής ήταν η εκτίμηση της συχνότητας μόλυνσης των κλινικά υγιών και των ασθενών γατών μέσω της PCR σε τέσσερις ιστούς, η ταυτοποίηση του υπεύθυνου είδους της *Leishmania*, η εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου, η εκτίμηση της διαγνωστικής ευαισθησίας και ειδικότητας των

κυτταρολογικών εξετάσεων και δύο ορολογικών εξετάσεων (IFAT και ELISA) και η διερεύνηση τυχόν συσχετισμών μεταξύ της μόλυνσης και των στοιχείων ταυτότητας των γατών, των συνθηκών διαβίωσής τους, της περιόδου του έτους που εξετάστηκαν, της μόλυνσής τους από διάφορους άλλους λοιμογόνους παράγοντες και της παρουσίας συμπτωμάτων και παθολογικών ευρημάτων από την αιματολογική, τις βιοχημικές εξετάσεις και την ανάλυση των ούρων.

Στη μελέτη περιλήφθηκαν 100 γάτες που ζούσαν στη Θεσσαλία και τη Μακεδονία και είχαν ηλικία τουλάχιστον 1 έτους και συγκεκριμένα 50 κλινικά υγιείς (ομάδα Α) και 50 γάτες με δερματικές αλλοιώσεις ή συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων (ομάδα Β). Μετά τη λήψη του ιστορικού και την κλινική εξέταση λαμβάνονταν βιολογικά υλικά και συγκεκριμένα αίμα, ούρα, κόπρανα, υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του απευθυσμένου, υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου, ιστοτεμάχια δέρματος, μυελός των οστών και υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα. Οι εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν: α) η PCR στο αίμα, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, το μυελό των οστών και το βλεννογόνο του επιπεφυκότα, β) η ταυτοποίηση του είδους της *Leishmania* μέσω της μέσω της *in silico* ανάλυσης ομολογίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR, γ) η real-time PCR στα δείγματα που ήταν θετικά με την PCR, δ) η κυτταρολογική εξέταση επιχρισμάτων από τη στοιβάδα λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη, το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του απευθυσμένου, το υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, τις δερματικές αλλοιώσεις των γατών της ομάδας Β, το μυελό των οστών και το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα, ε) η ορολογικές εξετάσεις IFAT (για IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες έναντι της *Leishmania* spp.) και ELISA (για IgG ανοσοσφαιρίνες έναντι της *Leishmania* spp.), στ) η αιματολογική εξέταση, ζ) η πλήρης βιοχημική εξέταση στον ορό του αίματος, η) η ανάλυση των ούρων και η μέτρηση του λόγου πρωτεΐνες/κρεατινίνη, θ) οι ορολογικές εξετάσεις για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *B. henselae*, ι) η παρασιτολογική εξέταση των κοπράνων, και ια) διάφορες άλλες εξετάσεις που ήταν απαραίτητες προκειμένου να επιτευχθεί η κατά το δυνατό ακριβέστερη αιτιολογική διάγνωση στις γάτες της ομάδας Β.

Στις συγκρίσεις των στοιχείων ταυτότητας, των συνθηκών διαβίωσης και της περιόδου του έτους που εξετάστηκαν μεταξύ των γατών των ομάδων Α και Β έδειξε ότι οι τελευταίες είχαν μεγαλύτερη ηλικία ( $P < 0,001$ ), ζούσαν λιγότερο συχνά σε

εξωτερικούς χώρους ( $P<0,001$ ) και ζούσαν συχνότερα σε αστικές περιοχές ( $P=0,019$ ). Δερματικές αλλοιώσεις που έχουν αναφερθεί σε γάτες με λεισμανίωση διαπιστώθηκαν σε 18/50 (36%) γάτες της ομάδας Β, συμπτώματα από τους οφθαλμούς σε 1/50 (2%) και συμπτώματα ενδεικτικά προσβολής των εσωτερικών οργάνων σε 28/50 (56%). Στις τελικές διαγνώσεις των γατών αυτών περιλαμβάνονταν 31 νοσήματα ή παθολογικές καταστάσεις αλλά σε καμία γάτα δεν έγινε διάγνωση λεισμανίωσης.

Η *L. infantum* ήταν το υπεύθυνο είδος και το DNA της απομονώθηκε από ένα ή περισσότερους ιστούς 41 γατών και συγκεκριμένα από 21/50 γάτες της ομάδας Α και 20/50 της ομάδας Β ( $P=0,839$ ). Το αποτέλεσμα της PCR διάφερε ( $P=0,014$ ) μεταξύ των τεσσάρων ιστών (αίμα, ιστοτεμάχια δέρματος, μυελός των οστών, υλικό απόξεσης επιπεφυκότα) και ήταν λιγότερο συχνά θετικό στο τελευταίο σε σύγκριση με τα ιστοτεμάχια του δέρματος ( $P=0,007$ ) και το μυελό των οστών ( $P=0,007$ ). Η πιθανότητα θετικού αποτελέσματος της PCR σε ένα ή περισσότερους ιστούς ήταν μεγαλύτερη ( $P=0,046$ , OR: 0,44) όταν η δειγματοληψία γινόταν την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων και προκειμένου για τις γάτες της ομάδας Β, όταν αυτές εμφάνιζαν ένα τουλάχιστον σύμπτωμα ενδεικτικό της προσβολής των εσωτερικών οργάνων που έχει συνδεθεί με τη λεισμανίωση της γάτας ( $P=0,031$ , OR: 3,93). Το παρασιτικό φορτίο στο αίμα κυμαίνονταν από 28-238 παράσιτα/ml (διάμεσος: 87), στα ιστοτεμάχια του δέρματος από 29-325 (διάμεσος: 96), στο μυελό των οστών από 26-352 (διάμεσος: 131) και στο υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα 198-283 (διάμεσος: 241). Οι κυτταρολογικές εξετάσεις ήταν αρνητικές σε όλες τις γάτες της μελέτης.

IgG ανοσοσφαιρίνες έναντι της *Leishmania* spp. βρέθηκαν σε 10 γάτες (5 από την ομάδα Α και 5 από την ομάδα Β) με την IFAT και σε μια γάτα (από την ομάδα Α) με την ELISA, ενώ IgM ανοσοσφαιρίνες βρέθηκαν σε μια γάτα (από την ομάδα Α) με την IFAT. Τα αποτελέσματα της IFAT για IgG ( $P<0,001$ ), της ELISA ( $P<0,001$ ) και της IFAT για IgM ( $P<0,001$ ) διέφεραν από εκείνα της PCR κυρίως λόγω της πολύ μικρής τους ευαισθησίας (0-14,3%), ενώ τα αποτελέσματα της IFAT για IgG διάφεραν από εκείνα της ELISA ( $P=0,039$ ) και δε συνδέονταν με κανένα από τα στοιχεία ταυτότητας των γατών, της συνθήκες διαβίωσής τους, την περίοδο της δειγματοληψίας, την ομάδα τους ή την κλινική εικόνα των γατών της ομάδας Β.

Δεν υπήρχε κάποια αξιόλογη διαφορά στα αποτελέσματα της αιματολογικής εξέτασης ή της ανάλυσης των ούρων μεταξύ των μολυσμένων από τη *L. infantum* και



των μη μολυσμένων γατών, αλλά οι μολυσμένες γάτες της ομάδας Β είχαν συχνότερα αυξημένη δραστηριότητα ALP ( $P=0,032$ ) και αυξημένες συγκεντρώσεις ολικής χολερυθρίνης ( $P=0,032$ ) και ανόργανου φωσφόρου ( $P=0,03$ ) σε σύγκριση με τις μη μολυσμένες γάτες της ίδιας ομάδας.

Τα αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *B. henselae* δε διέφεραν μεταξύ των γατών των ομάδων Α και Β, μεταξύ των μολυσμένων και των μη μολυσμένων γατών ή μεταξύ των ορολογικά θετικών και ορολογικά αρνητικών γατών.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής προκύπτει ότι: α) η *L. infantum* είναι το μόνο είδος του γένους *Leishmania* που βρέθηκε στις μολυσμένες γάτες από τη Θεσσαλία και τη Μακεδονία, β) η συχνότητα μόλυνσης της γάτας από τη *L. infantum* είναι αρκετά μεγάλη (41%) και δε διαφέρει μεταξύ των κλινικά υγιών γατών (42%) και εκείνων που εμφανίζουν δερματικές αλλοιώσεις, συμπτώματα από τους οφθαλμούς ή συμπτώματα ενδεικτικά της προσβολής των εσωτερικών οργάνων (40%), γ) η εξέταση δειγμάτων από πολλαπλούς ιστούς με την PCR είναι απαραίτητη προκειμένου να μην υποεκτιμηθεί η συχνότητα μόλυνσης της γάτας από τη *L. infantum*, δ) η διαγνωστική ευαισθησία της PCR για την ανίχνευση του DNA της *L. infantum* στη γάτα διαφέρει μεταξύ των τεσσάρων ιστών που εξετάστηκαν και είναι σημαντικά μικρότερη στο υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα σε σύγκριση με τα ιστοτεμάχια του δέρματος και το μυελό των οστών, ε) κανένας παράγοντας που να σχετίζεται με τα στοιχεία ταυτότητας των γατών και τις συνθήκες διαβίωσής τους δε συνδέεται με την πιθανότητα μόλυνσης από τη *L. infantum* αλλά η πιθανότητα αυτή είναι μεγαλύτερη όταν οι γάτες εξετάζονται την περίοδο δραστηριότητας των φλεβοτόμων, στ) η πιθανότητα μόλυνσης δε διαφέρει μεταξύ των γατών που είναι ορολογικά θετικές ή αρνητικές για FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* και *B. henselae*, ζ) όλες οι γάτες αιμοδότες ή οι μονάδες αίματος γάτας που προορίζονται για μετάγγιση πρέπει να ελέγχονται με PCR για *L. infantum* προκειμένου να αποφευχθεί η μέσω των μεταγγίσεων μετάδοση του παρασίτου σε άλλες γάτες, η) η κυτταρολογική εξέταση επιχρισμάτων από τη στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη, το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του απευθυσμένου, το υλικό παρακέντησης λεμφογαγγλίου, τα ιστοτεμάχια του δέρματος, τις δερματικές αλλοιώσεις, το μυελό των οστών και το υλικό απόξεσης από το βλεννογόνο του επιπεφυκότα δε συνιστάται για τον έλεγχο της συχνότητας μόλυνσης της γάτας από *L. infantum* λόγω της μικρής

της ευαισθησίας, θ) οι ορολογικές εξετάσεις IFAT και ELISA για την ανίχνευση IgG ανοσοσφαιρινών έναντι της *L. infantum* χαρακτηρίζονται από πολύ μικρή ευαισθησία, γεγονός που δημιουργεί αμφιβολίες για την αξία των επιδημιολογικών μελετών που στηρίζονται στις εξετάσεις αυτές, ενώ αντίθετα, έχουν σχετικά μεγάλη ειδικότητα (ιδιαίτερα η ELISA), ι) η πιθανότητα θετικού αποτελέσματος της IFAT για την ανίχνευση IgG ανοσοσφαιρινών έναντι της *L. infantum* δεν εξαρτάται από την ταυτόχρονη μόλυνση από FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* ή *B. henselae*, ια) η πιθανότητα μόλυνσης είναι μεγαλύτερη σε γάτες που εμφανίζουν ένα τουλάχιστον σύμπτωμα που είναι ενδεικτικό της προσβολής των εσωτερικών οργάνων και έχει συνδεθεί με τη λεϊσμανίωση της γάτας καθώς και στις ασθενείς γάτες που έχουν αυξημένη δραστηριότητα της ALP ή αυξημένης συγκέντρωση της ολικής χολερυθρίνης και του ανόργανου φωσφόρου.

# **STUDY ON THE EPIDEMIOLOGY AND THE CLINICAL IMPORTANCE OF FELINE INFECTION BY *LEISHMANIA* SPP.**

**Emmanouil K. Chatzis**

**Doctoral Thesis, 2014**

## **SUMMARY**

Feline infection by *L. infantum* has been reported in areas where canine leishmaniosis is endemic, including Mediterranean countries, Portugal, Brazil, and Iran. The epidemiologic importance of feline infection by the parasite remains obscure due to the relatively low number of properly designed epidemiological surveys, their conflicting results, and the limited body of scientific evidence on the propensity of infected cats to transmit *L. infantum* to sandflies. Based on current evidence, it seems that cats residing in endemic areas become more or less commonly infected by *L. infantum*, usually without presenting clinical signs or laboratory abnormalities, because of their innate resistance. However, a minority of the infected cats may present skin lesions (mainly ulcers and nodules), ocular and/or systemic signs (especially peripheral lymphadenomegaly, splenomegaly, hepatomegaly, and kidney disease) that can be accompanied by laboratory abnormalities, including anemia, hyperglobulinemia, azotemia, increased activity of ALP, ALT and AST, and proteinuria. In the context of epidemiological investigations, feline infection by *L. infantum* is usually diagnosed using molecular (PCR) and serological tests, whereas cytology, histopathology and culture can be additionally employed when there is suspicion of the disease.

The aims of this study are to estimate the frequency of the infection in clinically healthy and sick cats, to identify the responsible *Leishmania* species, to investigate the parasitic load of infected cats, to explore the diagnostic sensitivity and specificity of cytology and serology (IFAT and ELISA), and to investigate possible associations between the infection and the signalment, living conditions, period of sampling, infection by other agents and presence of clinical signs or laboratory abnormalities.

A total of 100 cats, older than 1 year, from Thessaly and Macedonia, Greece, were included and they were allocated into two groups: group A included 50 clinically healthy cats and group B included 50 cats with skin lesions, ocular and/or systemic signs. After history and physical examination, sampling of blood, urine, feces, rectal mucosa scrapes, lymph node aspirates, skin biopsies, bone marrow aspirates, and conjunctival smears was performed. Laboratory examinations included: a) PCR in blood, skin biopsies, bone marrow, and conjunctiva; b) identification of *Leishmania* species through nucleotide sequence analysis of PCR products; c) real-time PCR in conventional PCR-positive samples; d) cytology of buffy coat, rectal mucosal scrapes, lymph node aspiration smears, impression smears from skin biopsies, smears from the lesional skin of group B cats, bone marrow, and conjunctival smears; e) serology, including IFAT for IgG and IgM against *Leishmania* spp. and ELISA for IgG; f) hematology; g) serum biochemistry; h) urinalysis including urine protein/creatinine ratio; i) serology for FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* and *B. henselae*; j) fecal parasitology; k) various additional diagnostic examination in group B cats in an effort to achieve, as precisely as possible, a definitive etiological diagnosis.

Differences between group A and group B cats related to their signalment and living conditions included the older age ( $P<0.001$ ), less frequent outdoor lifestyle ( $P<0,001$ ) and common residency in urban areas ( $P=0.019$ ) of the latter. Skin lesions compatible with feline leishmaniosis were present in 18/50 (36%) group B cats, ocular signs in 1/50 (2%) and systemic signs in 28/50 (56%). Final diagnoses included 31 diseases but none of the cats was diagnosed with feline leishmaniosis.

*L. infantum* was identified in all infected cats and PCR was positive in 41 of them, including 21/50 group A and 20/50 group B cats ( $P=0.839$ ). The results of PCR differed ( $P=0.014$ ) among the four types of samples (blood, skin biopsies, bone marrow, conjunctiva) being less frequently positive in the latter compared to the skin biopsies ( $P=0.007$ ) and bone marrow ( $P=0.007$ ). The possibility for positive PCR in one or more samples was higher ( $P=0.046$ ; OR: 0.44) when sampling had been performed during the period of sandfly activity, as well as, when group B cats presented at least one systemic sign compatible with feline leishmaniosis ( $P=0.031$ ; OR: 3.93). Parasitic density ranged from 28-238 parasites/ml (median: 87) in the blood, 29-325 (median: 96) in skin biopsies, 26-352 (median: 131) in bone marrow, and 198-283 (median: 241) in conjunctiva. Cytology was negative in all cats.

Based on IFAT, IgG against *Leishmania* spp. were present in 10 cats (5 from group A and 5 from group B) and in one group A cat based on ELISA, whereas, IFAT for IgM was positive in one group A cat. The results of IFAT for IgG ( $P<0,001$ ), of ELISA ( $P<0,001$ ), and of IFAT for IgM ( $P<0,001$ ) were significantly different compared to PCR, mainly due to the low sensitivity of serology (0-14.3%). Furthermore, the results of IFAT for IgG were significantly different from the results of ELISA ( $P=0.039$ ) and were not associated with the signalment, living conditions, sampling period or clinical status of the study population.

There was no important difference in the results of hematology and urinalysis between infected and non-infected cats, but an increased frequency of increased ALP activity ( $P=0.032$ ) and of increased total bilirubin ( $P=0.032$ ) and inorganic phosphorus ( $P=0.03$ ) was witnessed in the former cats.

The results of serology for FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* and *B. henselae* did not differ between group A and group B cats, between infected and non-infected cats, and between seropositive and seronegative cats.

In conclusion, the results of this study show that: a) *L. infantum* is the only *Leishmania* species found to infect cats from Thessaly and Macedonia, Greece; b) the prevalence of the infection is considerable (41%) and does not differ between clinically healthy cats (42%) and cats with skin lesions, ocular signs and/or systemic signs (40%); c) multiple tissue examination with PCR is necessary to avoid underestimation of the prevalence of the infection; d) the diagnostic sensitivity of PCR differs among tissues and it is significantly lower for conjunctiva compared to skin biopsies and bone marrow; e) there is no factor relevant to the signalment and living conditions that influences the prevalence of the infection, but the latter is higher when sampling is performed during the period of sandfly activity; f) the prevalence of the infection does not differ between cats that are seropositive or seronegative for FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* and *B. henselae*; g) all blood donor cats or the feline blood units should be examined with PCR to avoid the transmission of *L. infantum* through transfusions of blood; h) cytological examination of buffy coat, rectum smear, lymph node, skin, bone marrow and conjunctiva lacks sensitivity and is not recommended in the context of epidemiological investigations; i) IFAT and ELISA are characterized by high specificity but low sensitivity for the diagnosis of the infection which makes the results of seroepidemiological studies of questionable validity; j) the probability of positive IFAT for IgG is not associated with

seropositivity to FeLV, FIV, FCV, *T. gondii* or *B. henselae*, k) the prevalence of the infection is higher in cats with at least one systemic sign compatible with feline leishmaniosis, in cats with increased ALP activity and in cats with increased total bilirubin or inorganic phosphorus serum concentrations.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acedo-Sánchez, C., Morillas-Márquez, F., Sanchíz-Marín, M.C., Martín-Sánchez, J., 1998, Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Vet. Parasitol.* 75, 1-8.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., Moreno, J., 1997, *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 298-319.
- Andreadou, M., Liandris, E., Kasampalidis, I.N., Taka, S., Antoniou, M., Ntais, P., Vaiopoulou, A., Theodoropoulos, G., Gazouli, M., Ikononopoulos, J., 2012, Evaluation of the performance of selected in-house and commercially available PCR and real-time PCR assays for the detection of *Leishmania* DNA in canine clinical samples. *Exp. Parasitol.* 131, 419-424.
- Antoniou, M., Doulgerakis, C., Pratlong, F., Dedet, J.P., Tselentis, Y., 2004, Treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite *Leishmania infantum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 71-72.
- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2000, Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1933-1938.
- Archer, F.J., Taylor, S.M., 1996, Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. *The Canadian Veterinary Journal* 37, 735-739.
- Ashford, R.W., 2000, The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.
- Athanasίου, L.V., 2004. Contribution to the study of epidemiology, diagnosis and treatment of canine leishmaniosis. Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece.
- Athanasίου, L.V., Kontos, V.I., Saridomichelakis, M.N., Rallis, T.S., Diakou, A., 2012, A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Trop.* 122, 291-295.
- Ayllón, T., Diniz, P.P., Breitschwerdt, E.B., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F., Sainz, A., 2012, Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 143-150.

- Ayllon, T., Tesouro, M.A., Amusatogui, I., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F., Sainz, A., 2008, Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 361-364.
- Baker, R., Chiodini, P., Kaye, P., 1999, Leishmaniasis, In: James, D.G., Zumla, A. (Ed.). *The Granulomatous Disorders*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 212-234.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008, Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* 24, 324-330.
- Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007, *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* 64, 1-109.
- Berman, J.D., 1997, Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24, 684-703.
- Bonfante-Garrido, R., Valdivia, O., Torrealba, J., García, M.T., Garofalo, M.M., Urdaneta, I., Urdaneta, R., Alvarado, J., Copulillo, E., Momen, H., Grimaldi, G.J., 1996, Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. *Revista Científica* 6, 187-190.
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Houry, C., Maroli, M., 2003, Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop.* 88, 109-116.
- Bongiorno, G., Paparcone, R., Foglia Manzillo, V., Oliva, G., Cuisinier, A.M., Gradoni, L., 2013, Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish<sup>®</sup>) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs-a preliminary xenodiagnosis study. *Vet. Parasitol.* 197, 691-695.
- Boutsini, S., 2010. Study of the distribution of canine leishmaniosis and identification of the sandfly vectors in the area of Attica. Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki.
- Bowman, D.D., 2005. Breach of the dermal barrier by parasites. In: 6th International Ectoparasite Control Symposium, Birmingham, U.K., pp. 5-12.
- Braun, J.P., Benard, P., Burgat, V., Rico, A.G., 1983, Gamma glutamyl transferase in domestic animals. *Veterinary Research Communications* 6, 77-90.
- Bresciani, K.D., Serrano, A.C., Matos, L.V., Savani, E.S., D'Auria, S.R., Perri, S.H., Bonello, F.L., Coelho, W.M., Aoki, C.G., Costa, A.J., 2010, Occurrence de



- Leishmania* spp. in domestic cats from Araçatuba, SP. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 19, 127-129.
- Broussard, J.D., Peterson, M.E., Fox, P.R., 1995, Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. Journal of the American Veterinary Medical Association 206, 302-305.
- Brown, B., Mauldin, G.E., Armstrong, J., Moroff, S.D., Mauldin, G.N., 2000, Metabolic and hormonal alterations in cats with hepatic lipidosis. Journal of Veterinary Internal Medicine 14, 20-26.
- Bruner, J.M., Steiner, J.M., Williams, D.A., van Alstine, W.G., Blevins, W., 1997, High feline trypsin-like immunoreactivity in a cat with pancreatitis and hepatic lipidosis. Journal of the American Veterinary Medical Association 210, 1757-1760.
- Callahan Clark, J.E., Haddad, J.L., Brown, D.C., Morgan, M.J., van Winkle, T.J., Rondeau, M.P., 2011, Feline cholangitis: a necropsy study of 44 cats (1986-2008). Journal of Feline Medicine and Surgery 13, 570-576.
- Caney, S.M., Pancreatitis and diabetes in cats, 2013. Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice 43, 303-317.
- Cardia, D.F., Camossi, L.G., Neto, L.D., Langoni, H., Bresciani, K.D., 2013, Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. Vet. Parasitol. 197, 634-637.
- Cardoso, L., Lopes, A.P., Sherry, K., Schallig, H., Solano-Gallego, L., 2010, Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. Vet. Parasitol. 174, 37-42.
- Carreras, J.K., Goldschmidt, M., Lamb, M., McLear, R.C., Drobatz, K.J., Sorenmo, K.U., 2003, Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997-2000). Journal of Veterinary Internal Medicine 17, 326-331.
- Center, S.A., 2005, Feline hepatic lipidosis. Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice 35, 225-269.
- Center, S.A., 2007, Interpretation of liver enzymes. Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice 37, 297-333.
- Center, S.A., 2009, Diseases of the gallbladder and biliary tree. Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice 39, 543-598.
- Center, S.A., Baldwin, B.H., Dillingham, S., Erb, H.N., Tennant, B.C., 1986, Diagnostic value of serum gamma-glutamyl transferase and alkaline

- phosphatase activities in hepatobiliary disease in the cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 188, 507-510.
- Chaniotis, B., Gozalo Garcia, G., Tselentis, Y., 1994, Leishmaniasis in greater Athens, Greece. *Entomological studies. Ann. Trop. Med. Parasitol.* 88, 659-663.
- Chaniotis, B., Spyridaki, I., Scoulika, E., Antoniou, M., 2000, Colonization of *Phlebotomus neglectus* (Diptera: Psychodidae), the major vector of visceral leishmaniasis in Greece. *J. Med. Entomol.* 37, 346-348.
- Chaniotis, B., Tselentis, Y., 1996, Water wells as a habitat of sand fly (Diptera: Psychodidae) vectors of visceral leishmaniasis in Greece. *J. Med. Entomol.* 33, 269-270.
- Chapman, S.E., Hostutler, R.A., 2013, A laboratory diagnostic approach to hepatobiliary disease in small animals. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 43, 1209-1225.
- Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., Del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, A., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarria, M.A., Sanchis-Monsonís, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011, Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 181, 12-16.
- Chulay, J.D., Bryceson, A.D., 1983, Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 475-479.
- Coelho, W.M., do Amarante, A.F., Apolinário, J.C., Coelho, N.M., de Lima, V.M., Perri, S.H., Bresciani, K.D., 2011a, Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitol. Res.* 109, 1009-1013.
- Coelho, W.M., Lima, V.M., Amarante, A.F., Langoni, H., Pereira, V.B., Abdelnour, A., Bresciani, K.D., 2010, Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 19, 256-258.

- Coelho, W.M., Richini-Pereira, V.B., Langoni, H., Bresciani, K.D., 2011b, Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 176, 281-282.
- Costa, T.A.C., Rossi, C.N., Laurenti, M.D., Gomes, A.A.D., Vides, J.P., Sobrinho, L.S.V., Marcondes, M., 2010, Occurrence of leishmaniasis in cats from endemic area for visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 47, 213-217.
- Craig, T.M., Barton, C.L., Mercer, S.H., Droleskey, B.E., Jones, L.P., 1986, Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 1100-1102.
- da Silva, A.V., de Souza Cândido, C.D., de Pita Pereira, D., Brazil, R.P., Carreira, J.C., 2008, The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 105, 92-94.
- da Silva, S.M., Rabelo, P.F., Gontijo N.F., Ribeiro, R.R., Melo, M.N., Ribeiro, V.M., Michalick, M.S., 2010, First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet. Parasitol.* 174, 150-154.
- da Silveira Neto, L., Sobrinho, L.S., Martins, C.O., Machado, R.Z., Marcondes, M., de Lima, V.M., 2011, Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Vet. Parasitol.* 177, 374-377.
- de Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., de Andrade, A.S., Melo, M.N., 2012, Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1596.
- de Amorim, I.F., Freitas, E., Alves, C.F., Tafuri, W.L., Melo, M.N., Michalick, M.S., da Costa-Val, A.P., 2010, Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. *Vet. Parasitol.* 173, 55-63.
- De Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, G., 1995, Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J. Med. Entomol.* 32, 229-233.

- de Freitas, J.C., Lopes-Neto, B.E., de Abreu, C.R., Coura-Vital, W., Braga, S.L., Reis, A.B., Nunes-Pinheiro, D.C., 2012, Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. Res. Vet. Sci. 93, 705-709.
- de Moraes, R.C., Gonçalves, S.D., Costa, P.L., da Silva, K.G., da Silva, F.J., Silva, R.P., de Brito, M.E., Brandão-Filho, S.P., Dantas-Torres, F., de Paiva-Cavalcanti, M., 2012, Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. Exp. Appl. Acarol. 59, 473-481.
- Dereure, J., Rioux, J.A., Khiami, A., Pratlong, F., Périères, J., Martini, A., 1991, Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. 2--Presence, in dogs, of *Leishmania infantum* Nicolle and *Leishmania tropica* (Wright) (Kinetoplastida-Trypanomatidae). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 66, 252-255.
- Di Muccio, T., Veronesi, F., Antognoni, M.T., Onofri, A., Piergili Fioretti, D., Gramiccia, M., 2012, Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. J. Clin. Microbiol. 50, 2651-2659.
- Diakou, A., 2000. Optimization of RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-PCR) and application to the study of Greek *Leishmania* isolates from dogs. Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki.
- Diakou, A., Papadopoulos, E., Lazarides, K., 2009, Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. J. Feline Med. Surg. 11, 728-730.
- Duarte, A., Castro, I., Pereira da Fonseca, I.M., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L.M., Meireles, J., Fazendeiro, M.I., Tavares, L., Vaz, Y., 2010, Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. J. Feline Med. Surg. 12, 441-446.
- Dye, C., Killick-Kendrick, R., Vitutia, M.M., Walton, R., Killick-Kendrick, M., Harith, A.E., Guy, M.W., Cañavate, M.C., Hasibeder, G., 1992, Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. Parasitology 105, 35-41.
- el Sawaf, B.M., Mansour, N.S., el Said, S.M., Daba, S., Youssef, F.G., Kenawy, M.A., Beier, J.C., 1989, Feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* and

- Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae) in El Agamy, Egypt. J. Med. Entomol. 26, 497-498.
- Erlich, H.A., 1989, PCR Technology, Principles and Application for DNA Amplification. Stocton Press, Mac Milan Publishers Ltd, UK.
- Everett, R.M., Duncan, J.R., Prasse, K.W., 1977a, Alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase, and alanine aminotransferase activities with obstructive and toxic hepatic disease in cats. Am. J. Vet. Res. 38, 963-966.
- Everett, R.M., Duncan, J.R., Prasse, K.W., 1977b, Alkaline phosphatases in tissues and sera of cats. Am. J. Vet. Res. 38, 1533-1538.
- Feldman, E.C., Nelson, R.W., 2004, Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 3rd Edition. Saunders, St. Louis, MO.
- Ferreira, S.A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N., de Andrade, A.S., 2008, Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. Vet. Parasitol. 152, 257-263.
- Ferreri, J.A., Hardam, E., Kimmel, S.E., Saunders, H.M., van Winkle, T.J., Drobotz, K.J., Washabau, R.J., 2003, Clinical differentiation of acute necrotizing from chronic nonsuppurative pancreatitis in cats: 63 cases (1996-2001). Journal of the American Veterinary Medical Association 223, 469-474.
- Ferroglio, E., Poggi, M., Trisciuglio, A., 2008, Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. Zoonoses and Public Health 55, 145-148.
- Figueiredo, F.B., Bonna, I.C., Nascimento, L.D., Costa, T., Baptista, C., Pacheco, T.M., Amendoeira, M.R., M.F., M., 2009, Serological evaluation for detection of anti-Leishmania antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 42, 141-145.
- Foster, D.J., Thoday, K.L., 2000, Tissue sources of serum alkaline phosphatase in 34 hyperthyroid cats: a qualitative and quantitative study. Research in Veterinary Science 68, 89-94.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006, Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet. Parasitol. 137, 214-221.

- Gagne, J.M., Armstrong, P.J., Weiss, D.J., Lund, E.M., Feeney, D.A., King, V.L., 1999, Clinical features of inflammatory liver disease in cats: 41 cases (1983-1993). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214, 513-516.
- Garifallou, A., Schnur, L.F., Stratigos, J.D., Hadziandoniou, M., Savigos, M., Stavrianeas, N., Sérié, C., 1984, Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, 369-375.
- Gavgani, A.S., Hodjati, M.H., Mohite, H., Davies, C.R., 2002, Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *The Lancet* 360, 374-379.
- Ghosh, A.K., Mullins, J.I., 1995, cDNA encoding a functional feline liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322, 240-249.
- Giffoni, J.H., de Almeida, C.E., dos Santos, S.O., Ortega, V.S., de Barros, A.T., 2002, Evaluation of 65% permethrin spot-on for prevention of canine visceral leishmaniasis: effect on disease prevalence and the vectors (Diptera: Psychodidae) in a hyperendemic area. *Veterinary Therapeutics* 3, 485-492.
- González-Salazar, C., Stephens, C.R., 2012, Constructing ecological networks: a tool to infer risk of transmission and dispersal of leishmaniasis. *Zoonoses and Public Health* 59 (Supplement 2), 179-193.
- Gramiccia, M., Di Muccio, T., Vitale, F., Caracappa, S., Reale, S., Pennisi, M.G., 2005. *Leishmania infantum* characterization from three cases of feline leishmaniasis in Sicily (Italy). In: 3rd World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy, p. 146.
- Greene, G.E., 2006, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd Edition. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Grevot, A., Jaussaud Hugues, P., Marty, P., Pratlong, F., Ozon, C., Haas, P., Breton, C., Bourdoiseau, G., 2005, Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite* 12, 271-275.
- Hatam, G.R., Adnani, S.J., Asgari, Q., Fallah, E., Motazedian, M.H., Sadjjadi, S.M., Sarkari, B., 2010, First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 313-316.

- Hervás, J., Chacón-M De Lara, F., Sánchez-Isarria, M.A., Pellicer, S., Carrasco, L., Castillo, J.A., Gómez-Villamandos, J.C., 1999, Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *J. Feline Med. Surg.* 1, 101-105.
- Hervás, J., Chacón-Manrique de Lara, F., López, J., Gómez-Villamandos, J.C., Guerrero, M.J., Moreno, A., 2001, Granulomatous (pseudotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat. *The Veterinary Record* 149, 624-625.
- Hodges, J., 2013, Using cytology to increase small animal practice revenue. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 43, 1385-1408.
- Hoffman, W.E., Renegar, W.E., Doner, J.L., 1977, Alkaline phosphatase and alkaline phosphatase isoenzymes in the cat. *Vet. Clin. Pathol.* 6, 21-24.
- Hoffman, W.E., Solter, P.F., 2008, Diagnostic enzymology of domestic animals, In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Ed.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 351-378.
- Hoffmann, W.E., Renegar, W.E., Dorner, J.L., 1977, Serum half-life of intravenously injected intestinal and hepatic alkaline phosphatase isoenzymes in the cat. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1637-1639.
- Horney, B.S., Farmer, A.J., MacKensie, A., Honor, D.J., Buczkowski, S., 1992, Alkaline phosphatase isoenzymes in feline serum using an agarose gel alkaline phosphatase kit method. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56, 373-375.
- Hubbard, B.S., Vulgamott, J.C., 1992, Feline hepatic lipidosis. *Compendium on the Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 14, 459-464.
- Ivovic, V., Tselentis, Y., 2005. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae). In: 3rd World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy, p. 154.
- Jacobson, R.L., Eisenberger, C.L., Svobodova, M., Baneth, G., Sztern, J., Carvalho, J., Nasereddin, A., El Fari, M., Shalom, U., Volf, P., Votypka, J., Dedet, J.P., Pratlong, F., Schonian, G., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., Warburg, A., 2003, Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *The Journal of Infectious Diseases* 188, 1065-1073.
- Javadi, S., Djajadiningrat-Laanen, S.C., Kooistra, H.S., van Dongen, A.M., Voorhout, G., van Sluijs, F.J., van den Ingh, T.S., Boer, W.H., Rijnberk, A., 2005,

- Primary hyperaldosteronism, a mediator of progressive renal disease in cats. *Domestic Animal Endocrinology* 28, 85-104.
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., Molina, R., 2013, Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.* 112, 2453-2459.
- Keck, N., Dereure, J., 2003, Epidemiology of canine leishmaniasis by cross-sectional study in the French focus of Cévennes. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)* 154 599-604.
- Kidder, A.C., Chew, D., 2009, Treatment options for hyperphosphatemia in feline CKD: what's out there? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 913-924.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., 1999, Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis, In: Killick-Kendrick, R. (Ed.). *Canine Leishmaniasis: an Update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum.* Hoechst Roussel Vet., Barcelona, Spain, pp. 26-31.
- Kirkpatrick, C.E., Farrell, J.P., Goldschmidt, M.H., 1984, *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Exp. Parasitol.* 58, 125-131.
- Kontos, V.I., 1986. A contribution to the study of canine leishmaniasis, A clinical, serological and experimental investigation. Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Reynes, J., Lamothe, J., Bastien, P., 2001, Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J. Clin. Microbiol.* 39, 613-617.
- Léger, N., Gramiccia, M., Gradoni, L., Madulo-Leblond, G., Pesson, B., Ferté, H., Boulanger, N., Killick-Kendrick, R., M., K.-K., 1988, Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 419-420.
- Leite, R.S., Ferreira, S., de A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N., de Andrade, A.S., 2010, PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet. Parasitol.* 170, 201-206.
- Leiva, M., Lloret, A., Peña, T., Roura, X., 2005, Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Vet. Ophthalmol.* 8, 71-75.



- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Mylonakis, M.E., 2002, A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.* 109, 19-27.
- Lewis, D.J., 1987, Depth of penetration of vertebrate skin by phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 81, 173-179.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Caprì, A., Solano-Gallego, L., 2012, Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* 184, 10-17.
- Longoni, S.S., López-Cespedes, A., Sánchez-Moreno, M., Bolio-Gonzalez, M.E., Sauri-Arceo, C.H., Rodríguez-Vivas, R.I., Marín, C., 2012, Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 469-476.
- Machattie, C., Mills, E.A., Chadwick, C.R., 1931, Naturally occurring oriental sore of the domestic cat in Iraq. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 25, 103-106.
- Maia, C., Campino, L., 2011, Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology* 27, 341-344.
- Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M.O., Neto, L., Cristóvão, J.M., Campino, L., 2013, *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 481-487.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., Campino, L., 2010, Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet. Parasitol.* 174, 336-340.
- Maia, C., Nunes, M., Campino, L., 2008, Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 555-559.
- Mancianti, F., 2004, Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia* 46, 203-206.
- Manna, L., Reale, S., Viola, E., Vitale, F., Foglia Manzillo, V., Michele, P.L., Caracappa, S., Gravino, A.E., 2006, *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 142, 271-280.

- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Gravino, A.E., 2009, Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res. Vet. Sci.* 87, 76-78.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L.M., Gravino, A.E., 2008, Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal* 177, 279-282.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G., Staiano, N., Gravino, A.E., 2004, Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 125, 251-262.
- Marcos, R., Santos, M., Malhão, F., Pereira, R., Fernandes, A.C., Montenegro, L., Roccabianca, P., 2009, Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Vet. Clin. Pathol.* 38, 201-205.
- Maroli, M., Jalouk, L., Al Ahmed, M., Bianchi, R., Bongiorno, G., Khoury, C., Gradoni, L., 2009, Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria. *Med. Vet. Entomol.* 23, 148-154.
- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2007, Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 145, 357-360.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., 2007, Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145, 267-273.
- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., Altet, L., 2011, Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors* 4, 57.
- McCown, M., Grzeszak, B., 2010, Zoonotic and infectious disease surveillance in Central America: Honduran feral cats positive for *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Rickettsia*, and Lyme disease. *J. Spec. Oper. Med.* 10, 41-43.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V., Stanneck, D., 2003, Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitol. Res.* 90 (Supplement 3), S108-S111.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J.,

- Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007, Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147, 67-76.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011, An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 352-357.
- Minodier, P., Piarroux, R., Gambarelli, F., Joblet, C., Dumon, H., 1997, Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2551-2555.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G., Baneth, G., 2008, Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* 24, 371-377.
- Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A., Molina, R., 2007, Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet. Parasitol.* 143, 375-379.
- Morsy, T.A., Abou el Seoud, S.M., 1994, Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 24, 199-204.
- Nasereddin, A., Salant, H., Abdeen, Z., 2008, Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet. Parasitol.* 158, 364-369.
- Navarro, J.A., Sánchez, J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía, A.J., Altimira, J., Vilafranca, M., 2010, Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. *J. Comp. Pathol.* 143, 297-302.
- Noli, C., Auxilia, S.T., 2005, Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* 16, 213-232.
- Ntais, P., Antoniou, M., 2010. Frequency of canine leishmaniosis in different parts of Greece. In: 9th Hellenic Congress on Companion Animal Medicine, Athens, Greece, pp. 369-370.
- Ntais, P., Sifaki-Pistola, D., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Pralong, F., Poupalos, G., Antoniou, M., 2013, Leishmaniases in Greece. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89, 906-915.

- Ogusuku, E., Perez, J.E., Paz, L., Nieto, E., Monje, J., Guerra, H., 1994, Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 88, 329-335.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Lelievre, A., Haas, P., 1998, Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet. Parasitol.* 75, 273-277.
- Paludo, G.R., Marodin, N.B., Firmino, F.P., Marcola, T.G., Silva, L.G., Ramos, R.R., Borges, T.S., Carranza-Tamayo, C.O., 2008. Occurrence of *Leishmania* infection in cats from an endemic area of Brasilia, Brazil. In: 13th I.S.A.C.P., 10th E.S.V.C.P., 8th A.E.C.C.P., 7th A.P.P. Congress, Barcelona, Spain, pp. 120-121.
- Papadopoulos, B., Tselentis, Y., 1994, Sandflies in the Greater Athens region, Greece. *Parasite* 1, 131-140.
- Pennisi, M.G., 2002. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain*, pp. 39-48.
- Pennisi, M.G., 2006. Feline leishmaniasis. In: *E.S.F.M. Feline Congress 2006, Rome, Italy*, pp. 21-23.
- Pennisi, M.G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C., 2013, Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 15, 638-642.
- Pennisi, M.G., Lupo, T., Malara, D., Masucci, M., Migliazzo, A., Lombardo, G., 2012, Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from southern Italy. *J. Feline Med. Surg.* 14, 656-657.
- Pennisi, M.G., Venza, M., Reale, S., Vitale, F., Lo Giudice, S., 2004, Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet. Res. Commun.* 28 (Suppl 1), 363-366.
- Peterson, M.E., Kintzer, P.P., Cavanagh, P.G., Fox, P.R., Ferguson, D.C., Johnson, G.F., Becker, D.V., 1983, Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 103-110.
- Peterson, M.E., Kintzer, P.P., Hurvitz, A.I., 1988, Methimazole treatment of 262 cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2, 150-157.

- Piarroux, R., Fontes, M., Perasso, R., Gambarelli, F., Joblet, C., Dumon, H., Quilici, M., 1995, Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 249-252.
- Plevraki, K., Koutinas, A.F., Kaldrymidou, H., Roumpies, N., Papazoglou, L.G., Saridomichelakis, M.N., Savvas, I., Leondides, L., 2006, Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J. Vet. Intern. Med.* 20, 228-233.
- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Mancianti, F., 2002, Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet. Parasitol.* 106, 181-191.
- Pratlong, F., Dedet, J.P., Marty, P., Portús, M., Deniau, M., Dereure, J., Abranches, P., Reynes, J., Martini, A., Lefebvre, M., Rioux, J.A., 1995, *Leishmania*-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *The Journal of Infectious Diseases* 172, 323-326.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009, Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915-1934.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L., Dye, C., 1997, The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 115 143-156.
- Rüfenacht, S., Sager, H., Müller, N., Schaerer, V., Heier, A., Welle, M.M., Roosje, P.J., 2005, Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *The Veterinary Record* 156, 542-545.
- Rallis, T., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Adamama-Moraitou, K.K., Papazoglou, L., Fytianou, A., Koutinas, A.F., 2005, Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J. Comp. Pathol.* 132, 145-152.
- Ramos, J.J.Z., Sarasa, I.A., Ochoa, P.G., Hernández, J.A.C., Salinas, M.J.G., Amella, M.J.M., 2002. Serological Evidence of Leishmaniasis in Cats in Aragon, Spain. In: 27th W.S.A.V.A. Congress, Granada, Spain, p. <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2860&Category=2475>.

- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Liboreiro Guerra, L., Andrade, R., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2006, Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102-116.
- Reithinger, R., Coleman, P.G., Alexander, B., Vieira, E.P., Assis, G., Davies, C.R., 2004, Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int. J. Parasitol.* 34, 55-62.
- Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C., Counihan, H., Espinoza, C.J., González, J.S., Davies, C.R., 2002, *Leishmania (Viannia)* spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 76-78.
- Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C., Davies, C.R., 2000, Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *J. Clin. Microbiol.* 38, 748-751.
- Rodríguez-Cortés, A., Fernández-Bellón, H., Ramis, A., Ferrer, L., Alberola, J., Solano-Gallego, L., 2007a, *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 190-198.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O., Alberola, J., 2007b, A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* 37, 683-693.
- Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Bernet, A., Quintana, F., Arboix, M., Alberola, J., 2003, Specific immunoglobulin class distribution in dogs with leishmaniosis. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 424.
- Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Ojeda, A., Quintana, J., Riera, C., Gállego, M., Portús, M., Alberola, J., 2006, Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 495-498.
- Rothuizen, J., 2009, Important clinical syndromes associated with liver disease. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 39, 419-437.

- Rutledge, L.C., Gupta, R.K., 2002, Moth Flies and Sand Flies (*Psychodidae*), In: Mullen, G., Durden, L. (Ed.). Medical and Veterinary Entomology Academic Press, New York, pp. 147-161.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sanchez, M.A., Diaz, N.L., Zerpa, O., Negron, E., Convit, J., Tapia, F.J., 2004, Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 618-624.
- Saridomichelakis, M.N., 2009, Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet. Dermatol.* 20, 471-489.
- Saridomichelakis, M.N., 2012. New strategies in canine leishmaniasis. Part II-treatment and prevention. In: Proceedings of the Continuing Education Programme. 7th World Congress of Veterinary Dermatology, Vancouver, Canada, pp. 224-231.
- Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Bourdeau, P., 2009, Questionnaire-based survey of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 60, 503-526.
- Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Olivry, T., Dunston, S.M., Farmaki, R., Koutinas, C.K., Petanides, T., 2007, Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Dermatol.* 18, 227-233.
- Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L.S., Koutinas, A.F., Billinis, C., Kontos, V.I., 2005, Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 82-86.
- Sarkari, B., Hatam, G.R., Adnani, S.J., Asgari, Q., 2009, Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 275-277.
- Savani, E.S., de Oliveira Camargo, M.C., de Carvalho, M.R., Zampieri, R.A., dos Santos, M.G., D'Auria, S.R., Shaw, J.J., Floeter-Winter, L.M., 2004, The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 120, 229-233.

- Schubach, T.M., Figueiredo, F.B., Pereira, S.A., Madeira, M.F., Santos, I.B., Andrade, M.V., Cuzzi, T., Marzochi, M.C., Schubach, A., 2004, American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 165-167.
- Segev, G., Livne, H., Ranen, E., Lavy, E., 2011, Urethral obstruction in cats: predisposing factors, clinical, clinicopathological characteristics and prognosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13, 101-108.
- Serrano, A.C.M., Nunes, C.M., Savani, E.S.M., D Auria, S.R.N., Bonello, F.L., Vasconcelos, R.O., de Lima, V.M.F., Bresciani, K.D.S., 2008, Feline leishmaniasis within the urban zone of Araçatuba, SP, Brazil - case report. *Clinical Veterinarian* 12, 36-40.
- Sherry, K., Miró, G., Trotta, M., Miranda, C., Montoya, A., Espinosa, C., Ribas, F., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2011, A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 239-245.
- Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E., Karagouni, E., 1999, Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur. J. Epidemiol.* 15, 271-276.
- Simões-Mattos, L., Bevilaqua, C.M.L., Franzosi Mattos, M.R., de Lima Pompeu, M.M., 2004, Feline leishmaniasis: uncommon or unknown? *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 99, 79-87.
- Sobrinho, L.S., Rossi, C.N., Vides, J.P., Braga, E.T., Gomes, A.A., de Lima, V.M., Perri, S.H., Generoso, D., Langoni, H., Leutenegger, C., Biondo, A.W., Laurenti, M.D., Marcondes, M., 2012, Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 187, 302-306.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001, Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560-563.



- Solano-Gallego, L., Quintana, F., Iniesta, L., Rodriguez, A., Llull, J., Espada, Y., Arboix, M., Portus, M., Alberola, J., 2003, A serosurvey of feline leishmaniosis in North-east Spain. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 423-424.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M., Alberola, J., 2007, Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 676-680.
- Souza, A., Nunes, V.L.B., Borralho, V.M., Ishikawa, E.A.Y., 2009, Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 15, 359-365.
- Spanakos, G., Piperaki, E.T., Menounos, P.G., Tegos, N., Fliemetakis, A., Vakalis, N.C., 2008, Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 46-53.
- Spano, J.S., August, J.R., Henderson, R.A., Dumas, M.B., Groth, A.H., 1983, Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in healthy cats and cats with induced hepatic disease. *American Journal of Veterinary Research* 44, 2049-2053.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004, Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 1729-1733.
- Tabar, M.D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2008, Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet. Parasitol.* 151, 332-336.
- Tabar, M.D., Francino, O., Altet, L., Sánchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2009, PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniosis. *The Veterinary Record* 164, 112-116.
- Thoday, K.L., Mooney, C.T., 1992, Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. *The Veterinary Record* 131, 257-264.
- Trainor, K.E., Porter, B.F., Logan, K.S., Hoffman, R.J., Snowden, K.F., 2010, Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. *Vet. Pathol.* 47, 1076-1081.

- Travi, B.L., Tabares, C.J., Cadena, H., Ferro, C., Osorio, Y., 2001, Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 119-124.
- Tselentis, Y., Gikas, A., Chaniotis, B., 1994, Kala-azar in Athens basin. *The Lancet* 343, 1635.
- Tuzio, H.T., 2001, Acute and chronic renal failure, In: Lappin, M.R. (Ed.). *Feline Internal Medicine Secrets*. Hanley & Belfus, Philadelphia, pp. 183-202.
- Tzamouranis, N., Schnur, L.F., Garifallou, A., Pateraki, E., Sérié, C., 1984, Leishmaniasis in Greece I. Isolation and identification of the parasite causing human and canine visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, 363-368.
- Velo, E., Paparisto, A., Bongiorno, G., Di Muccio, T., Khoury, C., Bino, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2005, Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. *Parasite* 12, 45-49.
- Vides, J.P., Schwardt, T.F., Sobrinho, L.S., Marinho, M., Laurenti, M.D., Biondo, A.W., Leutenegger, C., Marcondes, M., 2011, *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 178, 22-28.
- Vilhena, H., Martinez-Díaz, V.L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor, J., Silvestre-Ferreira, A.C., 2013, Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors* 6, 99.
- Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E., Luciani, A., 2005, Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet. Res. Commun.* 29 (Supplement 2), 319-321.
- Washabau, R.J., Day, M.J., 2012, Diseases of the gastrointestinal tract, In: Washabau, R.J., Day, M.J. (Ed.). *Canine and Feline Gastroenterology*. Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 864-865.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Έντυπο Π1:** Έντυπο ενυπόγραφης συγκατάθεσης ιδιοκτήτη για να περιληφθεί η γάτα του στη μελέτη

### ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Τρικάλων 224, 43100, Καρδίτσα

Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Χριστοδουλόπουλος

Τηλέφωνα: 24410 66095, 24410 66053 - Fax: 2441066053

#### ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΙΔΙΟΚΤΗΤΗ ΓΑΤΑΣ ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ο παρακάτω υπογεγραμμένος ....., ιδιοκτήτης γάτας, ονόματος ....., φύλου ....., φυλής ..... και ηλικίας ..... χρόνων, αφού ενημερώθηκα πλήρως σχετικά με την απαραίτητη διαδικασία, από το προσωπικό της Παθολογικής Κλινικής, του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, συμφωνώ με την λήψη βιολογικών υλικών (αίμα, ούρα, λεμφογάγγλια, μυελός των οστών, ιστοτεμάχια δέρματος) από τη γάτα μου για την διερεύνηση τυχόν μόλυνσής της από *Leishmania* spp. και των κλινικών επιπτώσεων που αυτή μπορεί να έχει στη υγεία του ζώου μου.

Το προσωπικό της Κλινικής δεσμεύτηκε για τα ακόλουθα:

- Η σχετική μελέτη είναι εγκεκριμένη από την αρμόδια υπηρεσία της Νομαρχίας Καρδίτσας.
- Η δειγματοληψία θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τους διεθνείς κανόνες της Ορθής Κλινικής Πράξης (Good Clinical Practice) και σε καμία περίπτωση δε θα έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση πόνου ή γενικότερα την επιβάρυνση της ποιότητας της ζωής της γάτας μου.
- Η χορήγηση ηρεμιστικού και ενδεχομένως γενικής αναισθησίας είναι απαραίτητη ώστε η λήψη των παραπάνω βιολογικών υλικών να γίνει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Υστερα από τα παραπάνω συμφωνώ χωρίς καμία επιφύλαξη για την λήψη των παραπάνω βιολογικών υλικών από τη γάτα μου.

**Ο ιδιοκτήτης του ζώου**

**Ο υπεύθυνος Κτηνίατρος**

.....

.....

**Πίνακας Π1.** Στοιχεία ταυτότητας των 50 κλινικά υγιών (ομάδα Α) και των 50 ασθενών (ομάδα Β) γατών της μελέτης

<b>α/α</b>	<b>Φυλή</b>	<b>Γένος</b>	<b>Ηλικία (έτη)</b>	<b>Σωματικό βάρος (Kg)</b>	<b>Μήκος τριχώματος</b>
<i>Ομάδα Α</i>					
1	ΚΕ	Θ	4	3,7	Μ
2	ΚΕ	Α	4	5,1	Β
3	ΚΕ	Α	4	4,1	Β
4	ΚΕ	Θ	4	3	Β
5	ΚΕ	Θ	4	3	Β
6	ΚΕ	Α	4	4,2	Β
7	ΚΕ	Α	4	3,1	Β
8	ΚΕ	Θ	4	4,1	Β
9	ΚΕ	Θ	1,5	3,8	Β
10	ΚΕ	Θ	7	4,5	Β
11	ΚΕ	Θ	1,5	3,7	Β
12	ΚΕ	Θ	1,5	3,4	Β
13	ΚΕ	Α	4	4,2	Β
14	ΚΕ	Α	1,5	3,3	Β
15	ΚΕ	Α	2	3	Β
16	ΚΕ	Θ	3	3	Β
17	ΚΕ	Θ	1	3,3	Β
18	ΚΕ	Α	2	3,5	Β
19	ΚΕ	Θ	1,5	3,1	Β
20	ΚΕ	Θ	2	2,3	Β
21	ΚΕ	Α	3	5,6	Β
22	ΚΕ	Α	2	4	Β
23	ΚΕ	Α	9	4,3	Μ
24	ΚΕ	Α	3,5	4	Β
25	ΚΕ	Θ	1,5	4,1	Β
26	ΚΕ	Α	14	4,5	Β
27	ΚΕ	Θ	2	3,7	Β
28	ΚΕ	Α	1	3,1	Β

29	KE	A	1	2,8	B
30	KE	Θ	3,5	5,3	M
31	KE	A	2,5	5	B
32	KE	A	1,5	4,9	B
33	KA	Θ	2,5	3,1	B
34	KE	A	2,5	3,5	B
35	KE	Θ	1,5	2,2	B
36	KE	Θ	2,5	2,2	B
37	KE	A	5,5	4,7	M
38	KE	Θ	2	4,2	B
39	KE	A	2	3,8	B
40	KE	A	2	3,5	B
41	KE	Θ	3,5	4	B
42	KE	Θ	3	4,2	B
43	KE	A	2	3,1	B
44	KE	A	2,5	3	B
45	KE	Θ	2	2,6	B
46	KE	A	1,5	3,5	B
47	KE	A	6	5	B
48	KE	A	5	4,8	B
49	KE	A	5	5	B
50	KE	A	3	4,5	B

***Ομάδα Β***

1	KE	Θ	4	3,1	B
2	KE	Θ	4	3,3	B
3	KE	Θ	12	6,9	B
4	KE	Θ	5,5	3,2	B
5	KE	Θ	9	3,4	B
6	KE	Θ	12	4,6	B
7	KE	Θ	11	2,6	B
8	KE	A	1	3,2	B
9	KE	Θ	10	4	B
10	KA	A	11	4,5	M

11	KA	A	14	2,6	B
12	KE	⊖	3	3,6	B
13	KE	⊖	12	6	B
14	KE	⊖	6	3,8	B
15	KE	⊖	8	5,5	B
16	KE	⊖	5	5,5	B
17	KE	A	4	2,5	B
18	KE	⊖	5	3	B
19	KE	A	2,5	3	B
20	KA	A	5	5,4	B
21	KA	⊖	18	4,1	B
22	KE	A	1	4	B
23	KE	A	1	4,2	B
24	KE	A	1	3,3	B
25	KE	A	7,5	6,9	M
26	KE	⊖	2	3,6	B
27	KE	⊖	1	2,7	B
28	KE	A	5	3,3	B
29	KE	A	1	4,7	M
30	KA	A	18	7,5	B
31	KE	A	2	3,8	B
32	KE	A	5,5	5,9	B
33	KE	⊖	4	3,4	B
34	KA	A	11	4,3	B
35	KE	⊖	8	5,6	M
36	KE	⊖	1	3	B
37	KE	A	3	4,2	B
38	KE	⊖	2	2,2	B
39	KE	⊖	4	4,5	B
40	KE	⊖	14	2,3	M
41	KE	A	11	3,5	B
42	KA	⊖	5,5	2,2	M
43	KE	⊖	24	2,1	B

44	ΚΕ	Α	4	3,2	B
45	ΚΕ	Θ	7	3	B
46	ΚΕ	Α	2	4,1	B
47	ΚΕ	Α	3	6	B
48	ΚΕ	Θ	16	6,5	M
49	ΚΕ	Θ	4	3,9	B
50	ΚΕ	Α	2	3,3	B

Συντμήσεις:

ΚΕ: κοινή Ευρωπαϊκή

ΚΑ: καθαρόαιμη φυλή

Α: αρσενική, Θ: θηλυκή

B: βραχύτριχη, M: μακρύτριχη

**Πίνακας Π-2.** Ανίχνευση του DNA της *L. infantum* σε ένα ή περισσότερους από τους τέσσερεις διαφορετικούς ιστούς που εξετάστηκαν στις μολυσμένες γάτες των ομάδων Α και Β

	<b>Αίμα</b>	<b>Δέρμα</b>	<b>Μυελός των οστών</b>	<b>Επιπεφυκότητα</b>
<b>Ομάδα Α</b>				
A-6	+	-	-	-
A-7	+	+	-	-
A-8	-	+	+	-
A-11	+	-	-	-
A-16	-	+	-	-
A-17	-	-	+	-
A-19	+	-	-	-
A-20	+	-	-	-
A-22	-	-	+	-
A-25	-	-	+	-
A-26	-	-	+	-
A-27	-	-	-	+
A-30	+	-	-	-
A-31	+	-	-	-
A-32	+	-	-	-
A-33	-	-	+	-
A-37	+	-	-	-
A-39	-	-	+	+
A-41	-	-	+	-
A-42	+	+	-	-
A-43	-	+	+	-
<b>Ομάδα Β</b>				
B-7	-	-	+	-
B-9	-	+	-	-
B-11	-	-	-	+
B-12	-	+	-	-
B-13	-	-	+	-



B-20	-	+	-	-
B-22	-	+	+	-
B-23	-	+	-	-
B-24	-	+	-	-
B-28	+	-	-	-
B-33	-	-	+	-
B-38	-	+	-	-
B-39	-	-	+	-
B-42	-	+	-	-
B-43	-	+	-	-
B-45	-	+	-	-
B-46	+	+	+	*
B-47	-	+	-	-
B-48	+	-	+	*
B-49	-	+	-	-

Σύμβολα:

+: θετικό αποτέλεσμα PCR, -: αρνητικό αποτέλεσμα PCR, \*: το δείγμα χάθηκε κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο

**Πίνακας Π-3.** Παρασιτικό φορτίο (αριθμός *L. infantum*/ml) στα 50 δείγματα που πάρθηκαν από τις 41 μολυσμένες γάτες της μελέτης και ήταν θετικά με την PCR

	<b>Αίμα</b>	<b>Δέρμα</b>	<b>Μυελός των οστών</b>	<b>Επιπεφυκότας</b>
	<b>Ομάδα Α</b>			
A-6	127,5			
A-7	39	163		
A-8		186	352	
A-11	28			
A-16		171		
A-17			110,3	
A-19	112			
A-20	29			
A-22			196,5	
A-25			-	
A-26			-	
A-27				282,6
A-30	130			
A-31	-			
A-32	238			
A-33			26	
A-37	56			
A-39			-	197,5
A-41			-	
A-42	191	214		
A-43		-	-	
	<b>Ομάδα Β</b>			
B-7			-	
B-9		30		
B-11				-
B-12		35,2		
B-13			-	
B-20		128		

B-22		39	118
B-23		270	
B-24		-	
B-28	38		
B-33			143
B-38		96	
B-39			-
B-42		-	
B-43		325	
B-45		-	
B-46	62,5	124	-
B-47		29	
B-48	143		132
B-49		53	

Σύμβολα:

-: παρασιτικό φορτίο μικρότερο από το όριο αντίγνωσης και ποσοτικοποίησης της real-time PCR

**Πίνακας Π-4.** Αποτελέσματα της IFAT και της ELISA για ειδικές IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες έναντι της *Leishmania* spp. στις 11 γάτες της μελέτης που ήταν θετικές σε μια τουλάχιστον από τις παραπάνω εξετάσεις και σύγκρισή τους με τα αποτελέσματα της PCR

	Τίτλος IFAT για IgG	OD ELISA για IgG	Τίτλος IFAT για IgM	PCR
<b>Ομάδα Α</b>				
A-5	1/40	-	-	-
A-6	1/40	-	1/20	+
A-11	-	0,154	-	+
A-26	1/40	-	-	+
A-34	1/20	-	-	-
A-39	1/40	-	-	+
<b>Ομάδα Β</b>				
B-1	1/40	-	-	-
B-8	1/20	-	-	-
B-12	1/40	-	-	+
B-15	1/40	-	-	-
B-45	1/40	-	-	+

Σύμβολα:

+: θετική PCR σε ένα ή περισσότερους από τους ιστούς που εξετάστηκαν, -: αρνητικό αποτέλεσμα

**Εικόνα 1.** Καμπύλη ROC για την ευαισθησία και την ειδικότητα των πιθανών ορίων διαχωρισμού για το θετικό αποτέλεσμα της ELISA για ειδικές IgG έναντι της *Leishmania spp.* όταν αυτή χρησιμοποιείται για τη διάγνωση των γατών που είναι μολυσμένες από *L. infantum*

