



Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

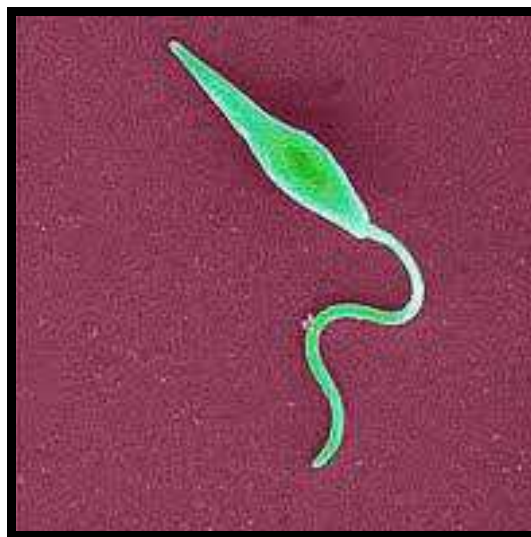
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ LEISHMANIA ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ
ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΧΛΟΨΙΔΗΣ Σ. ΠΑΣΧΑΛΗΣ



ΛΑΡΙΣΑ 2010

Τίτλος εργασίας

***Μοριακή ανάλυση απλοτύπων της *Leishmania* σε σκύλους της
Θεσσαλίας***

Τριμελής Επιτροπή

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Πετεινάκη Ευθυμία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπιλλίνης Χαράλαμπος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Η λεισμανίαση είναι μία ζωνόσος που προκαλείται από διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania*, μέλους της οικογένειας *Trypanosomatidae*. Η μετάδοση του παρασίτου πραγματοποιείται μέσω του τσιμπήματος της θηλυκής σκνίπας του γένους *Phlebotomus*, η οποία λειτουργεί ως φορέας της λεισμανίασης. Ένας από τους σημαντικότερους ξενιστές του παρασίτου είναι ο σκύλος, ο οποίος λειτουργεί και ως δεξαμενή του παρασίτου. Οι δύο μορφές της λεισμανίασης στους σκύλους είναι η σπλαγγχνική και η δερματική.

Η παρουσία της λεισμανίασης είναι γνωστή στην Ελλάδα. Το είδος του παρασίτου, που βρέθηκε να προσβάλλει τους σκύλους στην Ελλάδα είναι η *L. infantum*, η οποία προκαλεί τη σπλαγγχνική μορφή της νόσου. Εμφάνιση σπλαγγχνικής λεισμανίασης σε ανθρώπους αναφέρθηκε για πρώτη φορά στο νησί των Σπετσών το 1879 και στην Ύδρα το 1881. Αργότερα, εμφανίστηκε στην ευρύτερη περιοχή της Αττικής και στην Ήπειρο. Η *L. infantum* έχει ανιχνευθεί ακόμη σε άλλες περιοχές της χώρας όπως η Κρήτη, τα Ιόνια νησιά, η Βορειοδυτική Ελλάδα και η περιοχή της Αττικής.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των ειδών *Leishmania*, που προκαλούν την ασθένεια στους σκύλους της περιοχής της Θεσσαλίας. Έτσι, σε 16 σκύλους της περιοχής οι οποίοι ήταν θετικοί στην ύπαρξη του παρασίτου της *Leishmania*, εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με στόχο την ακριβή ανίχνευση των ειδών από τα οποία είχαν προσβληθεί.

Περιεχόμενα

| | |
|--|-----|
| Τίτλος εργασίας | ii |
| Τριμελής Επιτροπή | iii |
| Περίληψη | iv |
| Εισαγωγή..... | 1 |
| Ενότητα Α: Θεωρητικό Μέρος..... | 5 |
| A.1 Βιολογικός Κύκλος..... | 5 |
| A.2 Το παράσιτο <i>Leishmania</i> | 7 |
| A.2.1 Ταξινόμηση των ειδών <i>Leishmania</i> | 9 |
| A.2.2 Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών της <i>Leishmania</i> | 10 |
| A.3 Φορέας - Μεταδότης..... | 12 |
| A.3.1 Ταξινόμηση των ειδών της σκνίπας | 14 |
| A.3.2 Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του φορέα..... | 15 |
| A.4 Ξενιστής – Δεξαμενή | 20 |
| A.5 Μορφές της Λεισμανίασης των σκύλων | 22 |
| A.5.1 Δερματική | 22 |
| A.5.2 Σπλαχνική | 22 |
| A.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό της έκφρασης των συμπτωμάτων και το μέγεθος της μόλυνσης..... | 24 |
| A.6 Επιδημιολογία..... | 27 |
| A.7 Μετάδοση της νόσου | 32 |

| | |
|--|----|
| A.8 Θεραπεία..... | 32 |
| A.9 Πρόληψη και έλεγχος..... | 34 |
| A.10 Διάγνωση της νόσου..... | 35 |
| A.10.1 Παρασιτολογικές τεχνικές..... | 36 |
| A.10.2 Ορολογικές δοκιμές..... | 37 |
| A.10.3 Μοριακές μέθοδοι..... | 37 |
| A.11 Σκοπός της μελέτης..... | 39 |
| Ενότητα Β: Πειραματικό Μέρος..... | 41 |
| B.1 Υλικά και Μέθοδοι..... | 41 |
| B.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR..... | 41 |
| B.1.2 Πέψη DNA..... | 46 |
| B.1.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης..... | 47 |
| B.2 Αποτελέσματα..... | 49 |
| B.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR..... | 49 |
| B.2.3 Πέψη προϊόντων PCR – Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης..... | 51 |
| Ενότητα Γ: Συζήτηση..... | 56 |
| Βιβλιογραφία:..... | 62 |

Εισαγωγή

Η λείσμανίαση είναι μία σοβαρή και σε ορισμένες περιπτώσεις θανατηφόρος παρασιτική ζωονόσος, η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερη ποικιλία και πολυπλοκότητα, που σχετίζονται με την οικολογία και την επιδημιολογία της.^{1,2} Στην πραγματικότητα, αποτελεί ένα σύμπλεγμα ασθενειών, που προκαλούνται από διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania*, μέλους της οικογένειας *Trypanosomatidae* και μεταδίδονται με το τσίμπημα της θηλυκής σκνίπας του γένους *Phlebotomus*.^{3,4,5} Ένα σύνολο 21 ειδών της *Leishmania* έχουν ταυτοποιηθεί ως παθογόνα για τον άνθρωπο.^{6,7} Στις περισσότερες περιπτώσεις προκαλεί την ασθένεια σε ζώα (σκύλος, αλεπού, τρωκτικά) ενώ οι άνθρωποι προσβάλλονται τυχαία, όταν βρεθούν σε περιοχή που είναι ενδημική για το παράσιτο.

Οι δύο βασικές μορφές της νόσου στους σκύλους είναι η σπλαγχνική και η δερματική λείσμανίαση.⁸ Η διάκριση μεταξύ των δύο μορφών είναι σχετικά δύσκολη σε σύγκριση με τους ανθρώπους καθώς η σπλαγχνική λείσμανίαση των σκύλων εμπεριέχει και συμπτώματα της δερματικής μορφής. Τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου ποικίλλουν. Είναι δυνατόν να υπάρξουν ασυμπτωματικοί φορείς, σκύλοι με αυτοπεριοριζόμενη φλεγμονή αλλά και θανατηφόρα περιστατικά σπλαγχνικής λείσμανίασης.²

Η λείσμανίαση στον άνθρωπο παρουσιάζεται με τρεις μορφές (δερματική, βλεννογονοδερματική, σπλαγχνική), από τις οποίες η σπλαγχνική είναι η πιο σοβαρή. Είναι ενδημική σε πολλά μέρη του κόσμου (π.χ. Ν. Ευρώπη, Ν. Αμερική, Β. Αφρική, Μέση Ανατολή), επικρατεί κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές και μπορεί να βρεθεί σε περίπου 88 διαφορετικές χώρες, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία 350 εκατομμυρίων ανθρώπων. Από τις 88 χώρες που ενδημεί το παράσιτο, οι 66 βρίσκονται στον Παλαιό Κόσμο και οι 22 στο Νέο Κόσμο. Κάθε χρόνο αναφέρονται περίπου 12 εκατομμύρια περιστατικά.^{3,7} Η επίπτωση της νόσου εκτιμάται σε 1.5 εκατομμύριο περιστατικά δερματικής λείσμανίασης (CL) και 500.000 περιστατικά σπλαγχνικής λείσμανίασης (VL) κάθε χρόνο.³ Περισσότερα από το 90% των περιστατικών δερματικής λείσμανίασης παρατηρούνται στο Ιράν, Αφγανιστάν, Συρία, Σαουδική Αραβία, Βραζιλία και στο Περού. Από τις 500.000 νέες περιπτώσεις σπλαγχνικής λείσμανίασης, περισσότερες από το 90% αναφέρονται στην Ινδία, Νεπάλ, Μπαγκλαντές, νότιο Σουδάν και βορειοανατολική Βραζιλία². Στην Αμερική

(Νέο Κόσμο) η μετάδοση του παρασίτου πραγματοποιείται μέσω του τσιμπήματος της σκνίπας του γένους *Lutzomyia*.⁷

Επιχειρώντας μια σύντομη ιστορική αναδρομή θα ήταν προτιμότερο να προσεγγίσουμε ξεχωριστά τις πληροφορίες που αναφέρονται στον Παλαιό Κόσμο (ο οποίος περιλαμβάνει την Ευρώπη, Αφρική και Ασία) και Νέο Κόσμο (ο οποίος ουσιαστικά αποτελείται από την ήπειρο της Αμερικής). Η δερματική λεισμανίαση, στον Παλαιό Κόσμο γνωστή ως oriental sore, είναι γνωστή από την αρχαιότητα. Υπάρχουν περιγραφές των βλαβών που προκαλεί η λεισμανίαση από τον 7^ο αιώνα π.Χ., οι οποίες θεωρούνται ότι έχουν τις πηγές τους σε κείμενα από το 1500 ως το 2500 π.Χ..⁹ Υπάρχουν λεπτομερείς περιγραφές δερματικής λεισμανίασης από Άραβες ιατρούς (Αβικέννας) του 10^{ου} αιώνα, καθώς και αναφορές από διάφορες περιοχές της Μέσης Ανατολής, όπως της Βαγδάτης και της Ιερικούς. Πολλές από τις ονομασίες που είχαν δοθεί σε ασθένειες και βλάβες είναι ακόμη και σήμερα γνωστές.⁹ Η σπλαγγχνική λεισμανίαση ή Kala azar η οποία χαρακτηρίζεται από αποχρωματισμό του δέρματος, πυρετό και διόγκωση του σπληνός, μπορεί εύκολα να εκληφθεί ως ελονοσία. Η νόσος Kala azar παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Ινδία το 1824. Ασθενείς με πυρετό θεωρήθηκε ότι πάσχουν από ελονοσία, αλλά δεν ανταποκρίνονταν στη χορήγηση κινίνης. Μέχρι το 1862 η νόσος είχε πάρει τη μορφή επιδημίας. Η αιτία παρέμεινε άγνωστη και οι επιστήμονες, συμπεριλαμβανομένου του Ronald Ross, θεωρούσαν ότι πρόκειται για μια μορφή ιογενούς ελονοσίας.¹⁰ Η πραγματική φύση της ασθένειας αποκαλύφθηκε το 1900, όταν οι Leishman και Donovan ανακάλυψαν το παράσιτο *Leishmania donovani*.¹¹

Η ανακάλυψη των παρασίτων που προκαλούν τη δερματική λεισμανίαση είναι ένα θέμα που προκαλεί συζητήσεις καθώς αρκετοί ερευνητές περιέγραψαν σχηματισμούς που μπορεί να ήταν το παράσιτο *L. donovani*.¹² Η ανακάλυψη αποδίδεται στον Αμερικανό, James Homer Wright,^{13,14} αν και είναι βέβαιο ότι παρατηρήθηκε από το 1885 από τον David Cunningham,^{13,15} ο οποίος όμως δεν αναγνώρισε το παράσιτο, και το 1898 από τον Ρώσο χειρουργό, P. F. Borovsky.^{11,13} Η ανακάλυψη του παρασίτου που προκαλεί σπλαγγχνική λεισμανίαση, *L. donovani*, είναι γενικώς αποδεκτό ότι έγινε από τον Σκωτσέζο στρατιωτικό γιατρό, William Leishman,^{13,16} και τον καθηγητή φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Madras, Charles Donovan,^{13,18} κατά τη μελέτη σπληνός ασθενών (από WHO: *Leishmaniasis: background information*). Τελικά ο Ronald Ross απέδειξε τη σύνδεση του παρασίτου με την ασθένεια και

ονόμασε τον οργανισμό *Leishmania donovani*. Η πρώτη φορά που ταυτοποιήθηκε λεισμανίαση σε σκύλους ήταν το 1903 στην Ευρώπη από τον Leonard Goodwin.¹⁹

Στο Νέο Κόσμο απεικονίσεις της νόσου αναγνωρίζονται σε γλυπτά από τον 5^ο αιώνα και σε γραφές Ισπανών ιεραποστόλων από τον 16^ο αιώνα.²⁰ Αρχικά υπήρχε η εντύπωση ότι το ίδιο παθογόνο προκαλούσε τη νόσο και στις δύο πλευρές του Ατλαντικού. Τα 1911 ο Gaspar Vianna βρήκε ότι τα παράσιτα στη νότιο Αμερική διέφεραν από αυτά στην Αφρική και την Ινδία και ανέφερε την ύπαρξη ενός νέου είδους της *Leishmania braziliensis*.²⁰ Από τότε, έχουν περιγραφεί αρκετά είδη μοναδικά στην Αμερική. Το 1922 ανακαλύφθηκε επίσης ότι η μετάδοση της νόσου, αφορά τη σκνίπα του γένους *Lutzomyia* και όχι *Phlebotomus*. Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, η πολύπλοκη διάκριση των ειδών του παρασίτου, των ξενιστών του, των φορέων και των ασθενειών που προκαλεί έχουν μελετηθεί διεξοδικά από τον Ralph Lainson και τους συνεργάτες.¹⁸

Μετά την ανακάλυψη του αιτιολογικού παράγοντα της λεισμανίασης ακολούθησαν πολλές έρευνες για τον προσδιορισμό του τρόπου μετάδοσης της νόσου. Οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* θεωρήθηκαν ύποπτες ως φορείς της *Leishmania* από πολύ νωρίς, όταν παρατηρήθηκε ότι τα αναπτυξιακά στάδια των παρασίτων, που βρισκόταν στο έντερο σκνιπών (οι οποίες είχαν απομυζήσει αίμα από ασθενείς με λεισμανίαση), ήταν ίδια με εκείνα των παρασίτων που αναπτύχθηκαν στις εργαστηριακές καλλιέργειες.²¹ Παρά την ανακάλυψη αυτής της αναπτυξιακής μορφής του παρασίτου αλλά και της μετακίνησής του στον οισοφάγο, το φάρυγγα και τελικά στη στοματική κοιλότητα των εργαστηριακών εντόμων, όλες οι προσπάθειες για επίτευξη μόλυνσης των εργαστηριακών ζώων ή ανθρώπων-εθελοντών οδηγήθηκαν σε αποτυχία. Ωστόσο, αναφέρθηκαν κάποιες επιτυχείς μολύνσεις σε χάμστερ, μετά το τσίμπημα από μολυσμένες σκνίπες *Phlebotomus argentipes*.²² Μόνο τρεις από εκείνες τις πολυάριθμες δοκιμές ήταν επιτυχείς. Μετά από πολλά πειράματα που ακολούθησαν, ανακαλύφθηκε ότι, όταν οι σκνίπες τρέφονταν με μολυσμένο αίμα και στη συνέχεια με νέκταρ φυτών, το πρόσθιο τμήμα του εντέρου, ο οισοφάγος και ο φάρυγγας γέμιζαν με πολύ μεγάλο αριθμό παρασίτων, με αποτέλεσμα τα έντομα αυτά να μην έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν αίμα από τα θηλαστικά. Προσπαθούσαν ξανά και ξανά να τραφούν και το μόνο που πετύχαιναν ήταν να απελευθερώνουν μεγάλο αριθμό παρασίτων στο δέρμα του ξενιστή. Διάφορα πειράματα, βασισμένα σε αυτό το σκεπτικό, απέδειξαν τη μετάδοση της λεισμανίασης σε ποντίκια και χάμστερ

το 1940 και 1941.²³ Τελικά, οι Swanimath et al. (1942) μετέδωσαν με επιτυχία την ασθένεια και σε ανθρώπους-εθελοντές μέσω μολυσμένων σκνιπών *Phlebotomus*.²⁴

Ενότητα Α: Θεωρητικό Μέρος

A.1 Βιολογικός Κύκλος

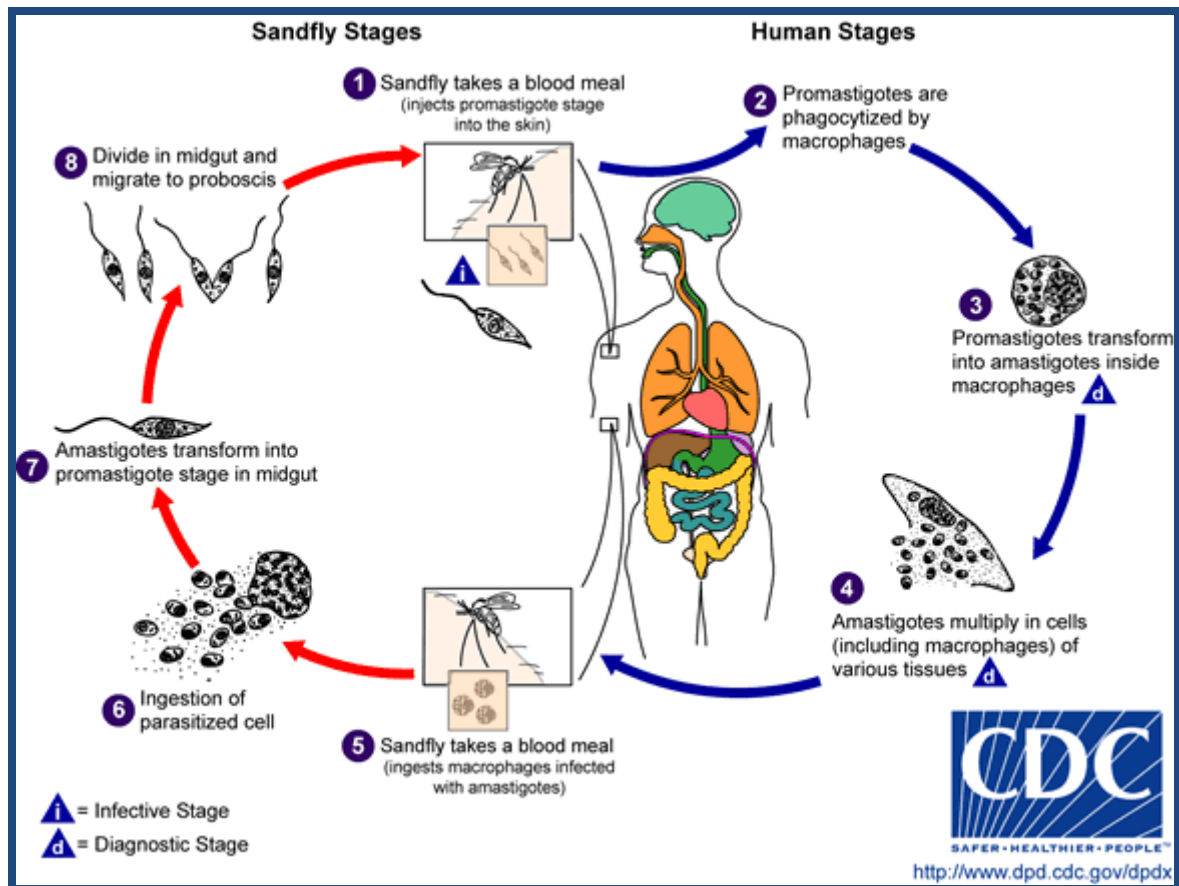
Οι ξενιστές της *Leishmania* στη φύση μπορεί να είναι έντομα (σκνίπες του γένους *Phlebotomus*), στα οποία το παράσιτο έχει τη μορφή μαστιγοφόρου προμαστιγώτη, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια επιμηκυσμένη, κινητή και ενδοκυτταρική φάση ή θηλαστικά, στα οποία το παράσιτο έχει τη μορφή αμαστιγώτη, ο οποίος είναι ωοειδής, ακίνητος και σε εξωκυτταρική φάση.

Όταν μία μολυσμένη θηλυκή σκνίπα απομυζήσει αίμα από ένα θηλαστικό, διοχετεύει μολυσματικούς προμαστιγώτες στο δέρμα του ξενιστή. Εκεί, τα παράσιτα αυτά φαγοκυτταρώνονται ταχύτατα από τα μακροφάγα του δέρματος και μετατρέπονται μετά από 12-24 ώρες, στην αμαστιγωτή μορφή τους, η οποία έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται ταχύτατα με απλή διχοτόμηση, μόνο μέσα στα φαγοκύτταρα του ξενιστή (συγκεκριμένα στο πιο αφιλόξενο μέρος των μακροφάγων, τα φαγολυσosώματα). Ο πολλαπλασιασμός των αμαστιγωτών οδηγεί τελικά στη λύση του κυττάρου με αποτέλεσμα τη μόλυνση παρακείμενων μακροφάγων και την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό το στάδιο είναι χρόνιο και μπορεί να συνεχίζεται για μήνες, χρόνια ή ακόμη και για ολόκληρη τη ζωή του ξενιστή χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων. Αυτό εξαρτάται από τη δεκτικότητα του ξενιστή και από το ανοσοποιητικό του σύστημα. Τα μολυσμένα μακροφάγα μπορεί να παραμείνουν στο δέρμα, όπως στην περίπτωση της δερματικής λεισμανίασης και να οδηγήσουν στο σχηματισμό ελκών ή να διασπαρούν σε άλλα όργανα, όπως στην περίπτωση της σπλαγγικής λεισμανίασης ή στους βλεννογόνους στην περίπτωση της βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης (MCL) (Εικ. 1).

Όταν μια θηλυκή σκνίπα απομυζήσει αίμα από ένα μολυσμένο θηλαστικό, προσλαμβάνει ενδοκυττάρους (ή πιθανόν και εξωκυττάρους) αμαστιγώτες που βρίσκονται μέσα στα μακροφάγα (ή πιθανόν ελεύθερα στην κυκλοφορία του αίματος). Μέσα στο γεύμα αίματος, οι αμαστιγώτες μεταμορφώνονται σε κινούμενους προμαστιγώτες (μετακυκλικοί προμαστιγώτες). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και δύο ακόμη ενδιάμεσα στάδια στην ανάπτυξη του παρασίτου πριν τη διαφοροποίησή του σε μετακυκλικό προμαστιγώτη: η

νεκτομονάδα, η οποία είναι μια ελεύθερη επιμηκυσμένη μορφή προκυκλικού προμαστιγώτη και η απομονάδα, η οποία είναι μια μορφή προ- ή παραμαστιγώτη, που έχει την ικανότητα να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο μέσω του μαστιγίου που διαθέτει.²⁵ Όλο αυτό το διάστημα η τροφή του εντόμου βρίσκεται εγκλωπωμένη μέσα σε μία χιτινική περιτροφική μεμβράνη, η οποία εκκρίνεται από το έντομο 4 ώρες μετά τη λήψη αίματος. Η μεμβράνη αυτή λειτουργεί ως φραγμός που επιβραδύνει τη διάχυση των λυτικών ενζύμων που εκκρίνονται από τη σκνίπα ως απάντηση στη λήψη αίματος, ενώ έμμεσα προστατεύει και τα παράσιτα από τις επιβλαβείς συνέπειες των ενζύμων. Παρέχεται, έτσι, η ευκαιρία στους αμαστιγώτες να διαφοροποιηθούν στις δύο ενδιάμεσες μορφές του παρασίτου. Αυτές με τη σειρά τους, όταν διαλυθεί η περιτροφική μεμβράνη από τις χιτινάσες του εντόμου (3-4 ημέρες μετά τη λήψη αίματος), απελευθερώνονται στον αυλό του εντέρου και προσκολλώνται στο εντερικό επιθήλιο με τα μαστίγιά τους.²⁶ Τελικά, 7 ημέρες μετά τη λήψη του αίματος τα παράσιτα έχουν μεταμορφωθεί σε μετακυκλικούς προμαστιγώτες.²⁵ Το παράσιτο στη μορφή του προμαστιγώτη έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται με μεγάλη ένταση μόνο μέσα στο έντερο του εντόμου.²⁶ Συγκεκριμένα, ο πολλαπλασιασμός αυτός λαμβάνει χώρα στο μέσο έντερο, για το υπο-γένος *Leishmania*,²⁷ ή στο οπίσθιο και το μέσο έντερο για το υπο-γένος *Viannia*. Ανεξάρτητα από το μέρος του πολλαπλασιασμού, τα παράσιτα μεταναστεύουν τελικά στο πρόσθιο μέρος του μέσου εντέρου της σκνίπας και στη συνέχεια κινούνται μέσω του φάρυγγα προς τη στοματική κοιλότητα του εντόμου. Η μορφή που έχουν τα παράσιτα της *Leishmania* σε αυτή τη φάση είναι και η μοναδική που μπορεί να μολύνει τα σπονδυλωτά. Έτσι, την επόμενη φορά που η σκνίπα θα απομυζήσει αίμα από κάποιο θηλαστικό (σκύλο ή άνθρωπο, κ.α.) θα διοχετεύσει στο δέρμα του τους μετακυκλικούς προμαστιγώτες που βρίσκονται στη στοματική της κοιλότητα.²⁸

Εκτός από τον άνθρωπο, διάφορα είδη τρωκτικών και σκύλων έχουν ενοχοποιηθεί ως δεξαμενές του παρασίτου. Υπάρχουν 500 είδη σκνίπας, από τα οποία 30 της θηλυκής *Phlebotomus*, τα οποία ανήκουν σε 6 γένη, θεωρούνται ή έχει αποδειχθεί, ότι μπορούν να μεταφέρουν παράσιτα από ζώο σε ζώο, ζώο σε άνθρωπο ή άνθρωπο σε άνθρωπο.²⁷



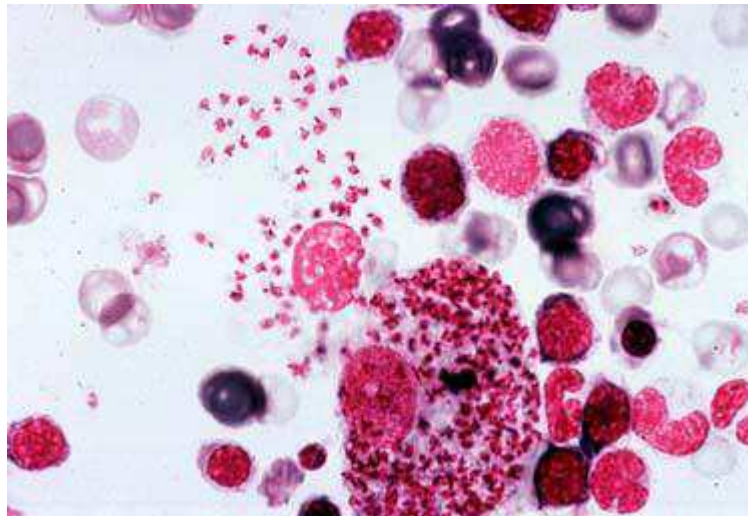
Εικόνα 1: Ο βιολογικός κύκλος της *Leishmania*: 1,2) Μετά το τσίμπημα ενός θηλαστικού από μολυσμένη σκνίπα, διοχετεύονται στο δέρμα του θηλαστικού μολυσματικοί προμαστιγώτες οι οποίοι φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα του ξενιστή, 3) Μεταμόρφωση σε αμαστιγώτες μέσα στα μακροφάγα, η οποία απαιτεί 1-4 ώρες και πολλαπλασιασμός του παρασίτου, 4) Λύση των μακροφάγων (μετά από 48 ώρες) λόγω του πολλαπλασιασμού των παρασίτων και απελευθέρωση των αμαστιγωτών οι οποίοι μπορούν να μολύνουν άλλα φαγοκύτταρα. Οι αμαστιγώτες μερικών ειδών *Leishmania* μπορεί να εισέλθουν στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (RES) και να μεταφερθούν σε εσωτερικά όργανα του ξενιστή προκαλώντας σπλαχνική λεισημανίαση (μέσα σε 4-6 μήνες), 5,6) Με την απομύζηση αίματος από το μολυσμένο σπονδυλωτό, η σκνίπα προσλαμβάνει και αμαστιγώτες, 7) οι οποίοι μετατρέπονται σε προμαστιγώτες μέσα στο έντερό του εντόμου, και 8) πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και μεταφέρονται στη στοματική κοιλότητα του φορέα.²⁹

A.2 Το παράσιτο *Leishmania*

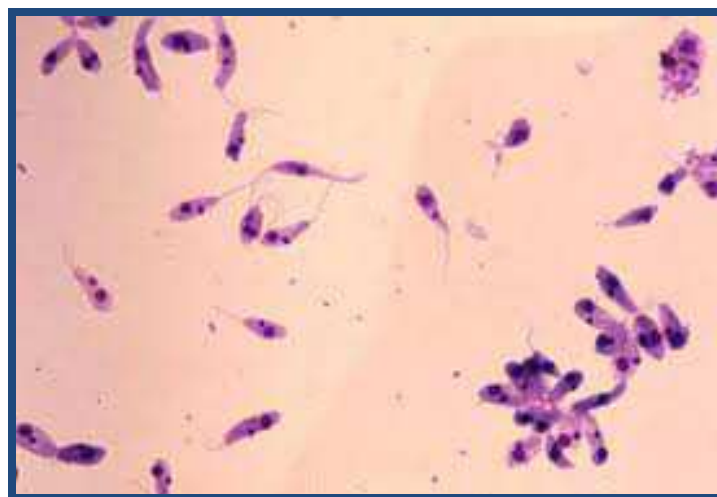
Η *Leishmania* είναι ένα πρωτόζωο που ανήκει στην τάξη *Kinetoplastida* και την οικογένεια *Trypanosomatidae*. Πρόκειται για ένα διμορφικό παράσιτο το δύο μορφολογικά στάδια του οποίου είναι: ο ενδοκυττάριος αμαστιγώτης (Εικ. 2), που αναπτύσσεται μέσα στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα του θηλαστικού-ξενιστή, και ο μαστιγοφόρος προμαστιγώτης (Εικ. 3), που αναπτύσσεται μέσα στο έντερο του εντόμου-φορέα.²⁸

Στο στάδιο του αμαστιγώτη, το παράσιτο έχει σχήμα κυκλικό ή ωοειδές με διάμετρο περίπου 2-6 μm και περιέχει έναν πυρήνα, έναν κινητοπλάστη και ένα εσωτερικό μαστίγιο το οποίο διακρίνεται καθαρά σε ηλεκτρονική μικροφωτογραφία. Οι αμαστιγώτες πολλαπλασιάζονται μέσα σε παρασιτοφόρα κενοτόπια των μακροφάγων.²⁸

Στο στάδιο του προμαστιγώτη, το σώμα του παρασίτου είναι μακρύ και λεπτό (περίπου 15-30 μm μήκος και 2-3 μm πλάτος), με έναν κεντρικό πυρήνα, έναν κινητοπλάστη και ένα μακρύ ελεύθερο πρόσθιο μαστίγιο.²⁸



Εικόνα 2³⁰: Παράσιτα *Leishmania* (αμαστιγώτες) μέσα σε μακροφάγα στο μυελό των οστών σκύλου.



Εικόνα 3³¹: Παράσιτα *Leishmania* σε μορφή προμαστιγώτη.

A.2.1 Ταξινόμηση των ειδών *Leishmania*

Η διάκριση των ειδών της *Leishmania* δεν μπορεί να γίνει από την μορφολογία τους και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά κριτήρια. Τέτοιου είδους κριτήρια μπορεί να είναι εξωγενή (π.χ. κλινικά χαρακτηριστικά, γεωγραφική κατανομή, συμπεριφορά σε καλλιέργεια, φορείς εργαστηρίου) ή ενδογενή (π.χ. ανοσολογικά, βιοχημικά ή μοριακά κριτήρια).³² Μεταξύ όλων αυτών των κριτηρίων, η ανάλυση ισοενζύμων με ηλεκτροφόρηση και οι τεχνικές που βασίζονται στο DNA είναι οι πιο διαδεδομένες.

Έχουν προταθεί πολλοί τύποι ταξινόμησης για το γένος *Leishmania*. Ένας από αυτούς τους τύπους φαίνεται στον Πίνακα 1, όπου αποκαλύπτεται μια γονική σχέση μεταξύ των διαφόρων ειδών *Leishmania*. Σύμφωνα με αυτή τη φυλογενετική ταξινόμηση τα είδη του παρασίτου ομαδοποιούνται σε διάφορα συμπλέγματα, ενώ παρατηρείται η ύπαρξη δύο υπογενών (*Leishmania* και *Viannia*).^{33,34}

Πίνακας 1: Απλοποιημένη ταξινόμηση του γένους *Leishmania*, προερχόμενη από τη φυλογενετική ανάλυση των Rioux et al., βασισμένη σε ισοένζυμα.³³

| <u>I.Sub-genus Leishmania Ross, 1903</u> ³⁵ | |
|---|---|
| <i>L. donovani</i> complex | <i>L. donovani</i> (Laveran & Mesnil, 1903) <i>L. archibaldi</i> Castellani & Chalmers, 1919 |
| <i>L. infantum</i> complex | <i>L. infantum</i> Nicolle, 1908 (syn. <i>L. chagasi</i> Cunha & Chagas, 1937) |
| <i>L. tropica</i> complex | <i>L. tropica</i> (Wright, 1903) |
| <i>L. killicki</i> complex | <i>L. killicki</i> Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986 |
| <i>L. aethiopica</i> complex | <i>L. aethiopica</i> Bray, Ashford & Bray, 1973 |
| <i>L. major</i> complex | <i>L. major</i> Yakimoff & Schokhor, 1914 |
| <i>L. turanica</i> complex | <i>L. turanica</i> Strelkova, Peters & Evans, 1990 |
| <i>L. gerbilli</i> complex | <i>L. gerbilli</i> Wang, Qu & Guan, 1964 |
| <i>L. arabica</i> complex | <i>L. arabica</i> Peters, Elbihari & Evans, 1986 |
| <i>L. mexicana</i> complex | <i>L. mexicana</i> Biagi, 1953 |

| I. Sub-genus <i>Leishmania</i> Ross, 1903³⁵ | |
|---|--|
| | (syn. <i>L. pifanoi</i> Medina & Romero, 1959) |
| <i>L. amazonensis</i> complex | <i>L. amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972 (syn. <i>L. garnhami</i> Scorza et al., 1979) <i>L. aristidesi</i> Lainson & Shaw, 1979 |
| <i>L. enriettii</i> complex | <i>L. enriettii</i> Muniz & Medina, 1948 |
| <i>L. hertigi</i> complex | <i>L. hertigi</i> Herrer, 1971 <i>L. deanei</i> Lainson & Shaw, 1977 |

| II. Sub-genus <i>Viannia</i> Lainson and Shaw, 1987³⁶ | |
|---|---|
| <i>L. braziliensis</i> complex | <i>L. braziliensis</i> Vianna, 1911. <i>L. peruviana</i> Velez, 1913 |
| <i>L. guyanensis</i> complex | <i>L. guyanensis</i> Floch, 1954 <i>L. panamensis</i> Lainson & Shaw, 1972 <i>L. shawi</i> Lainson et al., 1989 |
| <i>L. naiffi</i> complex | <i>L. naiffi</i> Lainson & Shaw, 1989 |
| <i>L. lainsoni</i> complex | <i>L. lainsoni</i> Silveira et al., 1987 |

A.2.2 Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών της *Leishmania*

Το παράσιτο της *Leishmania* έχει βρεθεί σε περίπου 88 χώρες σε όλο τον κόσμο. Από αυτές, οι 22 είναι χώρες του Νέου Κόσμου (περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής), και οι 66 του Παλαιού Κόσμου (περιοχές της Αφρικής, της Ινδίας, της Μέσης Ανατολής, της Ασίας, της Νότιας Ευρώπης και της Μεσογείου).⁷

Παλαιός Κόσμος:

- Η *L. infantum* συναντάται σε χώρες γύρω από τη Μεσόγειο Θάλασσα, στην Πορτογαλία, στη Βόρεια, Ανατολική και Δυτική Αφρική, στη Μέση Ανατολή (Ιράκ, Ιράν, Πακιστάν, Αφγανιστάν), στην Ινδία και την Κίνα.^{37,38}
- Η *L. donovani* βρίσκεται στην Ανατολική Αφρική και το Σουδάν.³⁶

- Η *L. tropica* συναντάται στη Μέση Ανατολή (Αφγανιστάν, Ιράν), στην Ινδία, στις χώρες της Μεσογείου, στη Δυτική και Κεντρική Ασία και στην Κεντρική και Βόρεια Αφρική (Κένυα).³⁶
- Η *L. major* συναντάται στη Μέση ανατολή, στην Ινδία, στις χώρες της Μεσογείου, στη Δυτική και Κεντρική Ασία, στην Κεντρική και Βόρεια Αφρική (Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία) και στη Βορειοδυτική Κίνα.³⁶
- Η *L. aethiopica* βρίσκεται στην Ανατολική Αφρική (Αιθιοπία, Κένυα) και στην Υεμένη.³⁶
- Η *L. arabica* συναντάται στη Σαουδική Αραβία, η *L. killicki* στην Τυνησία, ενώ τα είδη *L. turanica* και *L. gerbilli* συναντώνται στην Κεντρική Ασία.²

Νέος Κόσμος:

- Η *L. chagasi* συναντάται στην Κεντρική και Νότια Αμερική (Βραζιλία, Βενεζουέλα, Κολομβία)³⁶ και σε μικρές ενδημικές περιοχές της Βόρειας Αμερικής (Οχάιο, Αλαμπάμα, Μίσιγκαν),³⁹ ενώ έχουν εμφανιστεί και μεμονωμένες περιπτώσεις σε άλλες χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Ελ Σαλβαδόρ, Γουατεμάλα, Ονδούρα, Νικαράγουα, Αργεντινή, Βολιβία, Παραγουάη).³⁶
- Η *L. mexicana* βρίσκεται στην Κεντρική Αμερική (Μεξικό, Ονδούρα, Γουατεμάλα) και στην περιοχή του Αμαζονίου.³⁶
- Η *L. amazonensis* συναντάται σε χώρες της Νότιας Αμερικής, όπως Βολιβία, Βραζιλία (κυρίως στην περιοχή του Αμαζονίου), Περού και Βενεζουέλα.⁴⁰
- Η *L. braziliensis* (*Viannia*) βρίσκεται σε χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής. Συγκεκριμένα, στη Βραζιλία (περιοχή Αμαζονίου, Ρίο ντε Τζανέιρο, Σάο Πάολο, κ.α.), στην Ονδούρα (Santa Barbara), στο Περού, στη Βενεζουέλα,⁴⁰ στον Παναμά, στη Βολιβία και στην Κολομβία.⁴¹ Η *L. peruviana* που ανήκει στο σύμπλεγμα της *L. braziliensis*, συναντάται στις Περουβιανές Άνδεις.

- Η *L. guyanensis* (*Viannia*) βρίσκεται στη Νότια Αμερική και συγκεκριμένα σε περιοχές της Βόρειας Βραζιλίας και στη Γουιάνα (Guyana).⁴¹
- Η *L. panamensis* (*Viannia*) συναντάται σε χώρες της Κεντρικής Αμερικής (Παναμάς, Κόστα Ρίκα, Ονδούρα) και στην Κολομβία.⁴¹
- Τα είδη *L. naiffi* (*Viannia*) και *L. lainsoni* (*Viannia*) βρίσκονται στη Βραζιλία.⁴²

Στην Ελλάδα συναντώνται τρία από τα παραπάνω είδη *Leishmania* του Παλαιού Κόσμου:

Το πιο ευρέως διαδεδομένο είναι η *L. infantum*,⁴³⁻⁴⁵ η οποία έχει ανιχνευθεί σε πολλές περιοχές της χώρας (κυρίως στην Κρήτη και στην ευρύτερη περιοχή των Αθηνών αλλά και στα Ιόνια νησιά και τη Βορειοδυτική Ελλάδα). Η λεισμανίαση, σποραδικά κρούσματα της οποίας βρέθηκαν σε αγροτικές περιοχές της ηπειρωτικής χώρας, της Κρήτης και κάποιων νησιών του Ιονίου, αποδείχθηκε ότι έχει προκληθεί από την *L. tropica*.^{44,46} Επίσης, το είδος *L. major* θεωρείται ότι προκαλεί κρούσματα δερματικής λεισμανίασης στην περιοχή της Μεσογείου γεγονός που μας ωθεί να το αναζητήσουμε κατά την εκτέλεση των μοριακών τεχνικών.⁴⁷

A.3 Φορέας - Μεταδότης

Ο φορέας της λεισμανίασης στον Παλαιό Κόσμο είναι η θηλυκή σκνίπα που ανήκει στην τάξη *Diptera*, την οικογένεια *Psychodidae* και την υπο-οικογένεια *Phlebotomidae*. Ο βιολογικός κύκλος των εντόμων αυτών περιλαμβάνει δύο διαφορετικά βιολογικά στάδια: α) το στάδιο του ενηλίκου και β) τη φάση ανάπτυξης, η οποία περιλαμβάνει το στάδιο του αυγού, τέσσερα στάδια προνύμφης και το στάδιο της νύμφης, και η οποία λαμβάνει χώρα σε υγρό έδαφος, πλούσιο σε οργανική ύλη.⁴⁸



Εικόνα 4: Η σκνίπα-φορέας της *Leishmania* που ανήκει στο γένος *Phlebotomus*.

Οι σκνίπες είναι μικρές σε μέγεθος με μήκος σώματος που σπάνια ξεπερνά τα 3 mm. (Εικ. 4) Το χρώμα τους ποικίλλει από σχεδόν λευκό μέχρι σχεδόν μαύρο. Τρία χαρακτηριστικά καθιστούν εύκολη την αναγνώρισή τους: όταν βρίσκονται σε ανάπαυση, κρατούν τα φτερά τους τα οποία είναι ωοειδή και λογχωτά, με χαρακτηριστικό τρόπο σε γωνία πάνω από την κοιλιά τους, είναι τριχωτές, και όταν είναι έτοιμες να λάβουν την τροφή τους, χοροπηδούν χαρακτηριστικά γύρω από τον ξενιστή, πριν σταματήσουν για να πάρουν το αίμα του. Σε αντίθεση με τα κουνούπια, η επίθεσή τους είναι αθόρυβη. Ο τρόπος κίνησής τους έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι οι σκνίπες δεν απομακρύνονται από τον τόπο της γέννησής τους. Ένα είδος (*P. ariasi*) έχει αποδειχθεί ότι μετακινείται σε απόσταση μεγαλύτερη των 2χμ., αν και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η απόσταση ποικίλλει ανάλογα με το είδος και το περιβάλλον και η μέγιστη διασπορά σπάνια υπερβαίνει το 1 χιλιόμετρο.⁴⁹⁻⁵¹ Μελέτες σε αεροδυναμικές σήραγγες δείχνουν πως η ταχύτητα πτήσης τους δεν υπερβαίνει το 1 m/sec.⁵² Είναι δραστήρια στη δύση του ηλίου αλλά και κατά τη διάρκεια της νύχτας. Κατά τη διάρκεια της ημέρας ξεκουράζονται σε σκοτεινά, δροσερά και υγρά μέρη που περιλαμβάνουν σπίτια, στάβλους, κελάρια, σπηλιές, ρωγμές στο έδαφος, σε τοίχους ή βράχους, σε πυκνή βλάστηση, δέντρα, φωλιές τρωκτικών και άλλων θηλαστικών, φωλιές πουλιών. Η τροφή και των δύο φύλων είναι το νέκταρ των φυτών, όμως τα θηλυκά χρειάζονται και ένα γεύμα αίματος πριν καταστούν ικανά να γεννήσουν τα αυγά τους, προκειμένου να εξασφαλίσουν τις πρωτεΐνες που χρειάζονται για την ανάπτυξη των αυγών. Οι πιθανοί ξενιστές τους είναι ερπετά, αμφίβια, πουλιά και θηλαστικά. Οι διατροφικές τους συνήθειες εξαρτώνται από το

είδος στο οποίο ανήκουν, ενώ η φύση του ξενιστή από τον οποίο παίρνουν το αίμα είναι ένα σημείο κλειδί για τη μετάδοση της *Leishmania*.

A.3.1 Ταξινόμηση των ειδών της σκνίπας

Έχουν περιγραφεί πάνω από 500 είδη σκνίπας της υπο-οικογένειας *Phlebotomidae*, τα οποία συναντώνται σε ποικίλα μέρη του κόσμου και για τα οποία έχουν προταθεί πολλοί τύποι ταξινόμησης. Τα περισσότερα είδη ταξινομούνται σε τρία κύρια γένη: τα *Phlebotomus*, *Sergentomyia* και *Lutzomyia* (Εικ. 5).

Παρακάτω περιγράφονται τα είδη των δύο πιο σημαντικών γενών στη μετάδοση της *Leishmania* (*Phlebotomus* και *Lutzomyia*), εκ των οποίων πολλά είναι αποδεδειγμένοι φορείς.

Το γένος *Phlebotomus* χωρίζεται στα υπογένη:

- *Phlebotomus*⁵³ (*Ph. duboscqi*, *Ph. papatasi*, *Ph. salehi*),
- *Paraphlebotomus*⁵⁴ (*Ph. caucasicus*, *Ph. sergenti*, *Ph. similis*, *Ph. alexandri*),
- *Synphlebotomus*⁵⁴ (*Ph. celiae*, *Ph. martini*, *Ph. vansomerena*, *Ph. rossi*,⁵⁵ *Ph. ansarii*⁵⁵),
- *Larrousius*⁵⁶ (*Ph. ariasi*, *Ph. kandelakii*, *Ph. langeroni orientalis*, *Ph. longicuspis*, *Ph. longipes*, *Ph. major syriacus*, *Ph. perfillievi*, *Ph. perniciosus tobbi*, *Ph. pedifer*, *Ph. neglectus*,⁵⁵ *Ph. smirnovi*,⁵⁵ *Ph. transcaucasicus*,⁵⁵ *Ph. guggisbergi*,⁵⁵ *Ph. aculaetus*⁵⁵),
- *Adlerius*⁵⁶ (*Ph. chinensis chinensis*, *Ph. c. halepensis*, *Ph. c. longiductus*, *Ph. simici*, *Ph. balcanicus*),
- *Euphlebotomus*⁵⁴ (*Ph. argentipes*) και
- *Transphlebotomus*⁵⁷ (*Ph. Mascittii*, *Ph. canaaniticus*, *Ph. economidesi*).

Στο γένος *Lutzomyia* ανήκουν:

- το υπογένο *Lutzomyia* (*Lu. longipalpis*, *Lu. renei*),

- η ομάδα *cruciata* (*Lu. cruciata*, *Lu. gomezi*),
- η ομάδα *migonei* (*Lu. migonei*),
- η ομάδα *vexator* (*Lu. sanguinaria*),
- το υποείδος *Nyssomyia* (*Lu. anduzei*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. intermedia*, *Lu. olmeca*, *Lu. trapedoi*, *Lu. whitmani*, *Lu. ylephiletor*),
- το υπογένος *Psychodopygus* (*Lu. wellcomei*, *Lu. panamensis*)
- και το υπογένος *Pintomyia* (*Lu. fisceri*, *Lu. pessoai*).⁵⁸



Εικόνα 5: Ο φορέας της Λεισημανίασης που ανήκει στο γένος *Lutzomyia*.

(<http://www.fiocruz.br>)

A.3.2 Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του φορέα

Οι σκνίπες-φορείς του Παλαιού κόσμου ανήκουν στα γένη *Phlebotomus* και *Sergentomyia*, ενώ εκείνες του Νέου Κόσμου ανήκουν στο γένος *Lutzomyia*.

Παλαιός Κόσμος:

- *Ph. duboscqi*: Βόρεια Αφρική και Αραβία.⁵⁸
- *Ph. papatasi*: Μεσόγειος, Δυτική Ασία, Βόρεια Αφρική και Αραβία.^{58,59}
- *Ph. salehi*: Βορειοδυτική Ινδία και Ιράν.⁶⁰

- *Ph. caucasicus*: Καύκασος και Δυτική Ασία.³⁶
- *Ph. sergenti*: Μεσόγειος, Δυτική Ασία, Βόρεια Αφρική (Μαρόκο) και Αραβία.^{58,61}
- *Ph. similis*: Περιοχή των Βαλκανίων, Νότια Αδριατική, Μάλτα και Αιγαίο Πέλαγος.⁶²
- *Ph. alexandri*: Αφρική (Αλγερία, Αίγυπτος, Αιθιοπία, Μαρόκο, Τυνησία, Σουδάν), Νότια Ευρώπη (Ελλάδα, Κύπρος, Ισπανία, Ρουμανία), Ασία (Τουρκία, Υεμένη, Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα, Σαουδική Αραβία, Ιορδανία, Ισραήλ, Καζακστάν, Ιράκ, Κουβέιτ, Ιράν, Αφγανιστάν, Πακιστάν, Τουρκμενιστάν, Μογγολία, Κίνα, Ινδία).⁶³
- *Ph. celiae*: Κένυα.⁵⁸
- *Ph. martini*: Κένυα, Αιθιοπία και Σουδάν.⁵⁸
- *Ph. vansomerena*: Κένυα.⁵⁸
- *Ph. rossi*: Αφρική (Ναμίμπια).⁶⁰
- *Ph. ansarii*: Ιράν.⁶⁰
- *Ph. ariasi*: Μεσόγειος (Γαλλία, Ισπανία, Ιταλία, Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία) και Πορτογαλία.^{58,64}
- *Ph. kandelakii*: Δυτική Ασία (Λίβανος, Τουρκία, Ιράν, Αφγανιστάν) και Καύκασος.^{58,60}
- *Ph. langeroni orientalis*: Αφρική (Σουδάν, Αιθιοπία, Κένυα, Τσαντ, Νιγηρία), Νότια Αραβία και Ισπανία.^{58,60}
- *Ph. longicuspis*: Βόρεια Αφρική και Ισπανία.^{58,60}
- *Ph. longipes*: Αιθιοπία και Σουδάν.⁵⁸
- *Ph. syriacus*: Ισραήλ, Ιορδανία και Συρία.^{55,60,63}

- *Ph. perfilievi*: Μεσόγειος (Ιταλία, Μάλτα, Κύπρος, Ελλάδα, Γιουγκοσλαβία), Ισραήλ, Μαρόκο, Αλγερία και Τυνησία.^{55,60,63}
- *Ph. neglectus*: Ανατολική Μεσόγειος.⁶⁰
- *Ph. smirnovi*: Κίνα, Καζακστάν.⁶⁰
- *Ph. transcaucasicus*: Αζερμπαϊτζάν.⁶⁰
- *Ph. guggisbergi*: Κένυα.⁶⁰
- *Ph. aculaetus*: Κένυα.⁶⁰
- *Ph. perniciosus tobbi* (ή *Ph. perniciosus* ή *Ph. tobbi*): Μεσόγειος (Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία, Μάλτα, Κύπρος, Γιουγκοσλαβία), Πορτογαλία, Καύκασος, Ιράν, Τουρκία, Συρία και Αφρική (Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία, Λιβύη).^{55,60,63}
- *Ph. pedifer*: Κένυα και Αιθιοπία.⁶⁵
- *Ph. c. hinensis chinensis*: Κίνα.⁵⁸
- *Ph. c. halepensis*: Καύκασος, Ιράν και Συρία.⁵⁸
- *Ph. c. longiductus*: Βόρεια Αφρική, Κεντρική Ασία (Ουζμπεκιστάν, Πακιστάν) και Βόρεια Ινδία.^{58,60}
- *Ph. simici*: Νοτιοανατολική Ευρώπη και Δυτική Ασία.⁵⁸
- *Ph. balcanicus*: Γεωργία, Ελλάδα, Ρουμανία, Ουκρανία, Γιουγκοσλαβία, στο Αζερμπαϊτζάν, στο Ιράν και στην Τουρκία.⁶⁶
- *Ph. argentipes*: Ινδία, Βιρμανία, Μαλαισία, Ταϊλάνδη, Βιετνάμ και Πακιστάν.^{58,24}
- *Ph. mascittii*: Δυτική Ευρώπη και Βόρεια Αφρική.⁶⁷
- *Ph. canaaniticus*: Εγγύς Ανατολή.⁶⁷
- *Ph. economidesi*: Κύπρος.⁶⁷

Νέος Κόσμος:

- *Lu. longipalpis*: Κεντρική και Νότια Αμερική (Μεξικό, Ελ Σαλβαδόρ, Νικαράγουα και Βραζιλία, Βολιβία, Παραγουάη, Αργεντινή).^{58,68}
- *Lu. renei*: Βραζιλία.⁵⁸
- *Lu. cruciata*: Κεντρική Αμερική (Γουατεμάλα) και Η.Π.Α (Φλόριντα).^{58,68}
- *Lu. gomezi*: Κεντρική Αμερική (Παναμάς), Βενεζουέλα, Γαλλική Γουιάνα, Εκουαδόρ και Βραζιλία.^{58,68}
- *Lu. migonei*: Νότια Αμερική (Βενεζουέλα, Βραζιλία, Παραγουάη, Αργεντινή).⁵⁸
- *Lu. sanguinaria*: Κεντρική Αμερική (Κόστα Ρίκα, Ονδούρα, Παναμάς).⁵⁸
- *Lu. anduzei*: Κεντρική και Νότια Αμερική (Βενεζουέλα, Γαλλική Γουιάνα, Βραζιλία).⁵⁸
- *Lu. flaviscutellata*: Νότια Αμερική (Βραζιλία, Γαλλική Γουιάνα, Βολιβία, Κολομβία, Παραγουάη, Εκουαδόρ).^{58,68}
- *Lu. intermedia*: Νότια Αμερική (Βραζιλία, Παραγουάη, Αργεντινή).⁵⁸
- *Lu. olmeca*: Κεντρική Αμερική (Μεξικό, Γουατεμάλα, Κόστα Ρίκα, Ονδούρα) και Βόρεια Αμερική (Η.Π.Α.).^{58,68}
- *Lu. trapidoi*: Κεντρική και Νότια Αμερική (Ονδούρα, Κόστα Ρίκα, Παναμάς και Κολομβία, Εκουαδόρ).^{58,68}
- *Lu. whitmani*: Νότια Αμερική (Γαλλική Γουιάνα, Βραζιλία, Παραγουάη, Περού).^{58,68}
- *Lu. ylephiletor*: Κεντρική Αμερική (Μεξικό, Γουατεμάλα, Νικαράγουα).^{58,68}
- *Lu. wellcomei*: Νότια Αμερική (Βραζιλία).⁶⁰

- *Lu. panamensis*: Κεντρική (Παναμάς, Νικαράγουα, Μεξικό) και Νότια Αμερική (Βενεζουέλα, Κολομβία, Βραζιλία, Περού).^{58,68}
- *Lu. fisceri*: Νότια Αμερική (Βραζιλία, Παραγουάη).⁵⁸
- *Lu. pessoai*: Νότια Αμερική (Βραζιλία, Παραγουάη).⁵⁸

Ελλάδα:

Οι πιο σημαντικοί φορείς στην Ελλάδα είναι οι *Ph. neglectus*, *Ph. perfilievi*, *Ph. tobbi*, *Ph. similis* και *Ph. papatasi*.⁶⁰ Άλλα είδη που επίσης συναντώνται στη χώρα είναι τα *Ph. alexandri*, *Ph. balcanicus* και *Ph. mascittii*, ενώ έχουν βρεθεί και κάποια είδη *Sergentomyia* (*S. minuta*, *S. dentata*)⁶⁹ τα οποία θεωρούνται πιθανοί φορείς. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) φαίνεται και η αναλυτική κατανομή των ειδών αυτών στην Ελλάδα.

Πίνακας 2: Κατανομή της σκνίπας στην Ελλάδα.⁶⁹

| Είδος σκνίπας | Περιοχή |
|-----------------------|--|
| <i>Ph. neglectus</i> | Δράμα, Πιερία, Αττική, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Σάμος |
| <i>Ph. perfilievi</i> | Δράμα, Κιλκίς, Γιαννιτσά, Λάρισα, Φάρσαλα, Μαγνησία, Αττική, Κεφαλλονιά, Ρόδος, Σάμος |
| <i>Ph. tobbi</i> | Ξάνθη, Καβάλα, Πιερία, Λάρισα, Φάρσαλα, Αττική, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Ρόδος, Σάμος |
| <i>Ph. similis</i> | Κομοτηνή, Πιερία, Λάρισα, Κρήτη, Ρόδος, Σάμος |
| <i>Ph. papatasi</i> | Κομοτηνή, Λάρισα, Μαγνησία, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Σάμος |
| <i>Ph. alexandri</i> | Κομοτηνή, Λάρισα, Σάμος |
| <i>Ph. balcanicus</i> | Κιλκίς, Λάρισα |
| <i>Ph. mascittii</i> | Κρήτη |
| <i>S. minuta</i> | Κομοτηνή, Ξάνθη, Καβάλα, Κιλκίς, Πιερία, Λάρισα, Φάρσαλα, Μαγνησία, Αττική, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Σάμος |

| Είδος σκνίπας | Περιοχή |
|-------------------|----------------------------------|
| <i>S. dentata</i> | Λάρισα, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Σάμος |

Σύμφωνα με τη μελέτη των Ivonis, Patakakis, Tselentis, Chaniotis (2007), οι φορείς (αποδεδειγμένοι ή πιθανοί) με την ευρύτερη γεωγραφική εξάπλωση στην Ελλάδα είναι οι *Ph. perfilievi* και *Ph. tobbi*.⁶⁹

A.4 Ξενιστής – Δεξαμενή

Οι περισσότερες λεισμανιάσεις είναι ζωνοσώτοι και οι ξενιστές τους μπορεί να είναι ποικίλα είδη θηλαστικών, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μακρά περίοδο διατήρησης της *Leishmania* στη φύση.⁷⁰ Η λεισμανιάση στον άνθρωπο είναι μια ασθένεια που προκαλείται από διαφορετικά είδη του παρασίτου *Leishmania*, και εκδηλώνεται με την εμφάνιση βλαβών στο δέρμα ή τα σπλάγχνα. Ο οργανισμός-ξενιστής μπορεί να είναι ένα άγριο ή οικόσιτο θηλαστικό ή ακόμη και ένας άνθρωπος. Συνήθως, οι οργανισμοί αυτοί είναι καλά προσαρμοσμένοι με τη *Leishmania* και αναπτύσσουν μόνο ήπιες λοιμώξεις, οι οποίες μπορεί να επιμείνουν για πολλά χρόνια και δεν απειλούν τη ζωή των ξενιστών. Σημαντική εξαίρεση αποτελούν οι σκύλοι στους οποίους αναπτύσσεται μια γενικευμένη και θανατηφόρος ασθένεια (Εικ. 6).²⁸

Οι ξενιστές περιλαμβάνονται σε επτά διαφορετικές τάξεις θηλαστικών. Τα τρωκτικά, το ύραξ (hyrax ή προκαβία), τα μαρσιποφόρα και τα ζώα που ανήκουν στην τάξη *Edentata* (βραδύπους, μυρμηγκοφάγος, κ.α.) είναι ξενιστές της άγριας λεισμανιάσης. Ο σκύλος θεωρείται επί του παρόντος ως ο πραγματικός ξενιστής των *L. infantum* και *L. peruviana* και ο άνθρωπος αναγνωρίζεται συνήθως ως ξενιστής των *L. donovani* και *L. tropica*.²⁸

Οι σκύλοι είναι οι πιο σημαντικοί ξενιστές του παρασίτου. Είναι οι κυρίως υπεύθυνοι για τη διατήρηση της λεισμανιάσης τόσο των σκύλων όσο και των ανθρώπων σε πολλές ενδημικές περιοχές. Παρά το γεγονός ότι έχουν βρεθεί και άλλα ζώα να έχουν μολυνθεί (τρωκτικά, μαρσιποφόρα, κ.ά.) ή να είναι οροθετικά, φαίνεται απίθανο να μπορούν να λειτουργήσουν ως αποτελεσματικοί ξενιστές-δεξαμενές.⁷¹



Εικόνα 6⁷²: Σκύλος προσβεβλημένος από *Leishmania*.

Αυτή η αποτελεσματικότητα των σκύλων οφείλεται σε τρεις λόγους: α) στην πολύ μακρά περίοδο πριν την εμφάνιση της ασθένειας, β) στην υψηλή συγκέντρωση παρασίτων σε αμαστιγωτή μορφή στο δέρμα και γ) στο υψηλό ποσοστό υποτροπών σε συνάρτηση με την αβέβαιη παρασιτολογική αποστείρωση μετά τη θεραπεία.⁷¹

Περισσότερο από το 50% των σκύλων που είναι αποδεδειγμένα μολυσμένοι με το παράσιτο, είναι φαινομενικά υγιείς (ασυμπτωματικοί φορείς). Είτε βρίσκονται σε εκείνο το στάδιο εξέλιξης της νόσου όπου δεν έχουν ακόμη εμφανιστεί τα συμπτώματα, ή παρουσιάζουν αυτόματη ίαση (οι σκύλοι που ανήκουν στην τελευταία κατηγορία θεωρούνται ανθεκτικοί στη νόσο). Οι σκύλοι της πρώτης κατηγορίας παρά το γεγονός ότι είναι ασυμπτωματικοί, είναι ικανοί να μολύνουν όποια σκίπα τους τσιμπήσει. Τέλος, υπάρχει και μια τρίτη κατηγορία σκύλων, οι οποίοι ίσως να μην παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα ή αναπτύσσουν μόνο κάποια δερματικά εξογκώματα στην περιοχή του τσιμπήματος. Αυτό μπορεί να συμβεί λόγω του διαφορετικού τύπου κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης που διαθέτει κάθε σκύλος.⁷¹

Μελέτες δείχνουν πως δεν υπάρχει καμία προδιάθεση για τη νόσο μεταξύ των σκύλων διαφόρων ηλικιών ή φύλου. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί η προδιάθεση όσον αφορά τη ράτσα του σκύλου, καθώς οι ράτσες Boxer και Cocker εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο σε σχέση με άλλες.⁷³ Τέλος, έχει βρεθεί ότι οι σκύλοι με κοντό τρίχωμα έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου σε σχέση με εκείνους που το τρίχωμά τους είναι πιο μακρύ.

A.5 Μορφές της Λεισμανίασης των σκύλων

Οι δύο βασικές μορφές της νόσου στους σκύλους είναι η σπλαγχνική και η δερματική λεισμανίαση. Η διάκριση μεταξύ των δύο μορφών είναι σχετικά δύσκολη σε σύγκριση με τους ανθρώπους καθώς η σπλαγχνική λεισμανίαση των σκύλων εμπεριέχει και συμπτώματα της δερματικής μορφής.

A.5.1 Δερματική

Η δερματική λεισμανίαση προκαλείται από μεγαλύτερη ποικιλία ειδών του παρασίτου, τα οποία ανήκουν στα υπογένη *Leishmania* και *Viannia*. Σε όποια περίπτωση έχει αποκαλυφθεί ο πλήρης κύκλος ζωής του παρασίτου, ο πρωταρχικός ξενιστής είναι ένα άγριο θηλαστικό.

Η δερματική μορφή της νόσου περιλαμβάνει συμπτώματα όπως: αλλοιώσεις του δέρματος, αλωπεκία (απώλεια των τριχών) και ελκωτική ή αποφολιδωτική δερματίτιδα. Συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από την σχετικά αργή ανάπτυξη μονών ή πολλαπλών δερματικών οζιδίων ή ελκών τα οποία συνήθως επουλώνονται αυτόματα μετά από κάποιους μήνες. Οι αλλοιώσεις της νόσου χαρακτηρίζονται από τη διείσδυση μακροφάγων στο δέρμα. Μαζί με τα μακροφάγα πραγματοποιείται και διείσδυση λεμφοκυττάρων, κυττάρων του πλάσματος και πιο σπάνια ηωσινόφιλων ενώ μέσα στα μακροφάγα βρίσκεται μεγάλος αριθμός παρασίτων. Οι δερματικές αλλοιώσεις που παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, περιβάλλονται από συνδετικό ιστό (ινοβλάστες), με αποτέλεσμα να αποκτούν την εμφάνιση κοκκιώματος (μικρός όγκος στρογγυλού σχήματος).⁷⁴

A.5.2 Σπλαγχνική

Οι πρωταρχικοί ξενιστές των παρασίτων που προκαλούν σπλαγχνική λεισμανίαση στην περιοχή της Μεσογείου και στη Λατινική Αμερική είναι οι αλεπούδες. Αν οι αλεπούδες μολυνθούν αποτελούν πηγή μόλυνσης για κάθε σκνίπα. Όταν ένας τέτοιος πληθυσμός εντόμων μολυνθεί, μπορεί να μεταδώσει την μόλυνση κατευθείαν στον άνθρωπο ή σε κάποιο ζώο όπως ο σκύλος.

Η σπλαγχνική λεισμανίαση εμφανίζεται ως προοδευτική εξάντληση του ζώου και απώλεια βάρους με ή χωρίς μείωση της όρεξης, ενώ είναι πιθανή και η εμφάνιση

δερματικών αλλοιώσεων. Τα πιο συχνά κλινικά συμπτώματα είναι η διόγκωση των λεμφαδένων (ενός ή περισσότερων) και η σπληνομεγαλία. Οι δερματικές αλλοιώσεις είναι γενικά μη κνησμώδεις και χαρακτηρίζονται από ξηρή αποφολιδωτική δερματίτιδα με αλωπεκία (τριχόπτωση) στην περιοχή του κεφαλιού (αυτιά, μύτη, βλέφαρα), της ράχης και ενίοτε σε όλο το σώμα. Σε περιπτώσεις σκύλων με χρόνια λειψιμανίαση που δεν έχουν δεχθεί θεραπεία, οι επαναλαμβανόμενες δερματικές μολύνσεις μπορούν να οδηγήσουν σε χαρακτηριστική πάχυνση του δέρματος. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η ονυχογρύπωση που είναι στην ουσία η ανώμαλη ανάπτυξη των νυχιών. Στο 40% των προσβεβλημένων σκύλων παρατηρούνται δερματικές εξελκώσεις οι οποίες συνήθως, κατανέμονται στα άκρα, στην παρυφή του πτερυγίου του αυτιού και στη θαλάμη της μύτης (ρουθούνι) ή σε οποιαδήποτε άλλη βλεννογονική μεμβράνη (π.χ. στόμα, γεννητικά όργανα) (Εικ. 7). Είναι, επίσης, πιθανή και η παρουσία μη εξελκωμένων οζιδίων με διάμετρο 1-10 cm, τα οποία περιέχουν μεγάλο αριθμό παρασίτων στη αμαστιγωτή μορφή. Συχνά, οι μεμβράνες των βλεννογόνων είναι ωχρές (εξαρτάται από το βαθμό της αναιμίας) ή καστανοκόκκινες (ως αποτέλεσμα ηπατονεφρικής βλάβης).⁷⁵

Ένα μικρότερο ποσοστό προσβεβλημένων σκύλων εμφανίζει οφθαλμικές αλλοιώσεις από απλή βλεφαρο-επιπεφυκίτιδα μέχρι και σοβαρή πανοφθαλμίτιδα. Συνήθως, στα οφθαλμικά αυτά συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται και βλάβες του πρόσθιου τμήματος του ματιού (κερατοειδής επιπεφυκίτιδα και φλεγμονή ίριδας), οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε γλαύκωμα λόγω απόφραξης της κόρης.^{76,77}

Ένα ακόμη σύμπτωμα της νόσου είναι η επίσταξη (αιμορραγία από το βλεννογόνο των ρινικών κοιλοτήτων), που είναι συνήθως μονόπλευρη και ασυνεχής και προκαλείται από μεγάλο βαθμού θρομβοκυτταροπενία ή τοπική εξέλκωση του βλεννογόνου της ρινικής κοιλότητας.⁷⁸ Επίσης, κάποιοι προσβεβλημένοι σκύλοι παρουσιάζουν χωλότητα σε ένα ή περισσότερα άκρα, που προκαλείται από πολυμυοσίτιδα ή ανοσολογική πολυαρθρίτιδα. Η ψηλάφηση της διάφυσης των μακρών οστών των σκύλων παράγει πόνο, το ίδιο και η κάμψη ή η έκταση των άκρων. Αυτό συμβαίνει λόγω της παρουσίας παρασίτων στις αρθρώσεις.^{79,80}

Η πολουρία και η πολυδιψία είναι δύο ακόμη συμπτώματα της σπλαγχνικής λειψιμανίασης που οφείλονται στη βλάβη των νεφρών. Η νεφρική βλάβη μπορεί επίσης να προκαλέσει περιφερικό οίδημα, πρωτεϊνουρία και αυξημένα επίπεδα ουρίας

και κρεατινίνης στον ορό.⁸¹ Πιο σπάνια συμπτώματα είναι η χρόνια κολίτιδα, που προκαλείται από τη διήθηση λεμφοπλασμοκυττάρων, ιστοκυττάρων και αμαστιγωτών στον εντερικό βλεννογόνο και η χρόνια ηπατίτιδα,⁸² που προκαλείται από τη διήθηση πλούσιων σε αμαστιγώτες μακροφάγων στο ήπαρ του προσβεβλημένου σκύλου.⁸³ Τέλος, έχουν αναφερθεί και κάποιες περιπτώσεις σκύλων με σπλαχνική λεισημανίαση, οι οποίοι εμφάνισαν φλεγμονή του μυοκαρδίου λόγω της διήθησης σε αυτό μεγάλου αριθμού μονοπύρηνων κυττάρων με αποτέλεσμα την ατροφία και τον εκφυλισμό του.⁸⁴ Αυτή η μορφή της νόσου εμφανίζεται πιο συχνά στους σκύλους και είναι και η πιο επικίνδυνη.



Αλωπεκία



Ονυχογρύπωση



Ξηρό δέρμα γύρω από μάτια, αυτιά και μύτη



Επίσταξη



Φλεγμονή ματιού

Εικόνα 7^{85,86}: Συμπτώματα σπλαχνικής λεισημανίασης σε σκύλους.

A.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό της έκφρασης των συμπτωμάτων και το μέγεθος της μόλυνσης

Ο βαθμός της έκφρασης των συμπτωμάτων εξαρτάται από τον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης που θα ενεργοποιηθεί μετά τη μόλυνση του σκύλου.

Έχει βρεθεί ότι το παράσιτο πιθανόν προσβάλλει και τα κύτταρα Langerhans καθώς και άλλα δενδριτικά κύτταρα.⁸⁷ Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα του παρασίτου (αντιγονοπαρουσιαστικά) και προσελκύουν κύτταρα Th (T helper ή βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα) τα οποία και οδηγούν στο σημείο της

μόλυνσης. Οι περιπτώσεις σκύλων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη *Leishmania* οφείλονται στην ισχυρή T-λεμφοκυτταρική απόκριση τύπου 1 (Th1), η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή κυτοκινών όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN γ), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF), η ιντερλευκίνη 2 (IL2) και η ιντερλευκίνη 12 (IL12). Οι κυτοκίνες αυτές ενεργοποιούν την κυτταρική ανοσία η οποία έχει την ικανότητα να εξαλείψει τη μόλυνση. Οι σκύλοι που εμφανίζουν ισχυρή Th1 απόκριση πιθανόν να είναι παροδικά οροθετικοί ή να διατηρούν τα παράσιτα περιορισμένα μέχρι την πλήρη εξάλειψή τους.⁸⁸

Η δεύτερη περίπτωση σκύλων εμφανίζει T-λεμφοκυτταρική απόκριση τύπου 2 (Th2), στην οποία παράγονται οι ιντερλευκίνες IL4, IL5, IL6 και IL10. Οι ιντερλευκίνες αυτές προάγουν τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν αντισώματα κατά του παρασίτου (χυμική ανοσία). Όμως τα αντισώματα αυτά συμβάλλουν ελάχιστα στην αντιμετώπιση της πρωτοζωικής λοίμωξης. Μπορούν μάλιστα να γίνουν ακόμη και επιζήμια για τον οργανισμό του σκύλου, καθώς σχηματίζουν ανοσοσύμπλοκα τα οποία εναποτίθενται στις βασικές μεμβράνες. Η οψωνινοποίηση των παρασίτων μέσω της χυμικής ανοσίας μπορεί ακόμη να αυξήσει τη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα και να οδηγήσει σε επιπλέον μόλυνσή τους με παράσιτα.⁸⁹ Το σύστημα της κυτταρικής ανοσίας των ευαίσθητων σκύλων είναι εξασθενημένο. Τα λεμφοκύτταρα των σκύλων αυτών εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού στην *in vitro* έκθεση σε αντιγόνα *Leishmania*.^{90,91}

Οι προσβεβλημένοι σκύλοι μπορεί να εμφανίσουν ένα από τα δύο πρότυπα απόκρισης, δηλαδή, είτε αναπτύσσουν προοδευτική νόσο που μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατο, είτε παραμένουν ασυμπτωματικοί. Στην πραγματικότητα, μετά τη μόλυνση ενεργοποιούνται και οι δύο τύποι ανοσίας (Th1 και Th2), με αποτέλεσμα η μεταβλητότητα στην εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων αλλά και η σοβαρότητα της ασθένειας να εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των δυο συστημάτων απόκρισης.⁹⁰

Η περίοδος επώασης πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων μπορεί να διαρκέσει από ένα μήνα μέχρι και επτά χρόνια. Σε αυτή την περίοδο πραγματοποιείται ευρεία εξάπλωση των παρασίτων με προτίμηση το μυελό των οστών, τους λεμφαδένες, το σπλήνα και το συκώτι.

Η ζημιά που θα προκαλέσει το παράσιτο εξαρτάται από δύο παράγοντες:

1. την απευθείας δράση του παρασίτου στους ιστούς, που οδηγεί στο σχηματισμό μη πυωδών αλλοιώσεων του δέρματος, του ήπατος, του εντέρου, των νεφρών, των ματιών και των οστών,
2. την έμμεση βλάβη λόγω της εναπόθεσης των ανοσοσυμπλόκων στις αρθρώσεις και στις βασικές μεμβράνες των νεφρών, των αγγείων και των ματιών, που οδηγεί σε αγγειίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα και πολυαρθρίτιδα.^{83,92}

Ένας ακόμη παράγοντας, που φαίνεται πως επηρεάζει το βαθμό της μόλυνσης του παρασίτου έναντι του ξενιστή, είναι κάποια συστατικά του σιέλου της σκνίπας. Τα είδη της σκνίπας στα οποία έχει μελετηθεί αυτή η ιδιότητα είναι κυρίως η *Lutzomyia longipalpis* και λιγότερο η *Ph. papatasi*.⁹³

Αρχικά, βρέθηκε ότι η μόλυνση εργαστηριακών ποντικών με έναν αριθμό παρασίτων *L. major* (όμοιο με τον αριθμό που μεταδίδει με το τσίμπημα της η σκνίπα *Lutzomyia longipalpis*, 10-100 παράσιτα), οδηγεί στην επιβίωση των παρασίτων μέσα στο ζώο, μόνο εφόσον αυτά είχαν ενεθεί μαζί με σιέλο σκνίπας.^{93,94} Το γεγονός αυτό δεν οφείλεται στην απευθείας επιρροή του σιέλου της σκνίπας στο παράσιτο, αλλά σε ένα είδος επίδρασης στον ίδιο τον ξενιστή.⁹⁵ Στη φύση, το τσίμπημα μια μολυσμένης σκνίπας οδηγεί στην απελευθέρωση στο δέρμα του ξενιστή παρασίτων μαζί με σιέλο. Αργότερα βρέθηκε ένα συστατικό του σιέλου της *Lu. longipalpis*, που ονομάζεται *maxadilan* και έχει την ικανότητα να οξύνει τη μόλυνση από την *L. major* και να παρατείνει την επιβίωση του παρασίτου στον ξενιστή. Συγκεκριμένα, αναστέλλει την παραγωγή της IFN- γ και της υπομονάδας IL-12p40 και επάγει την παραγωγή IL-6 από τα διεγερμένα από την *L. major* μακροφάγα.⁹⁶ Το γεγονός αυτό πιθανόν να οδηγεί σε αναστολή της κυτταρικής ανοσίας, η οποία ενεργοποιείται από την IFN- γ , και επαγωγή της χυμικής ανοσίας που ενεργοποιείται από την IL-6. Ευνοείται, δηλαδή, η T-λεμφοκυτταρική απόκριση τύπου 2, η οποία ενισχύει την πρόοδο της ασθένειας.⁹⁷

Αντίστοιχες μελέτες για τη *L. braziliensis* και τη *L. amazonensis* έδειξαν ότι ο σιέλος της *Lu. longipalpis* ενισχύει τη μόλυνση του ξενιστή και από αυτά τα είδη του παρασίτου. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο δρα είναι διαφορετικός και φαίνεται

να εμπλέκει την IL-4 για τη *L. braziliensis*⁹⁸ (η οποία έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δράση της IFN-γ στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας) και την IL-10 για τη *L. amazonensis*⁹⁹.

Όσον αφορά τη *Ph. rapatasi*, η οποία είναι και ο φυσικός φορέας της *L. major*, φαίνεται πως και αυτή ενισχύει τη μόλυνση του ξενιστή από το είδος αυτό του παρασίτου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο σίελος της *Ph. rapatasi*, αναστέλλει την έκφραση της iNOS (συνθάση του NO) και επομένως την παραγωγή του NO στα μολυσμένα μακροφάγα *in vitro*¹⁰⁰ αλλά και *in vivo*¹⁰¹. Με τον τρόπο αυτό, πιθανώς μειώνεται η μικροβιοκτόνος δράση των μακροφάγων και προωθείται ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων στο εσωτερικό των κυττάρων αυτών. Το συστατικό του σιέλου της *Ph. rapatasi*, που παρεμβαίνει στην ικανότητα των μακροφάγων να καταστρέψουν το παράσιτο, φαίνεται πως είναι η αδενοσίνη.¹⁰²

A.6 Επιδημιολογία

Η λειψμανίαση είναι μία ασθένεια ευρέως κατανεμημένη σε όλο τον κόσμο. Η κατανομή της ξεκινά από τις τροπικές περιοχές της Αμερικής και της Αφρικής και εκτείνεται σε εύκρατες περιοχές της Νότιας Αμερικής, της Νότιας Ευρώπης και της Ασίας. Τα όρια της έκτασής της έχουν γεωγραφικό πλάτος 45° στο Βορρά και 32° στο Νότο. Η γεωγραφική κατανομή της ασθένειας σχετίζεται σε αρκετά μεγάλο βαθμό με αυτή των ειδών της σκνίπας που δρουν ως φορείς καθώς επίσης και με την οικολογία τους και τις συνθήκες της εσωτερικής ανάπτυξης του παρασίτου. Η ασθένεια αυτή είναι παρούσα σε 88 χώρες σε όλο τον κόσμο, εκ των οποίων οι 16 είναι βιομηχανοποιημένες και οι 72 αναπτυσσόμενες, ενώ οι 13 από αυτές βρίσκονται μεταξύ των πιο φτωχών χωρών του κόσμου.¹⁰³

Σπλαγχνική Μορφή:

Η σπλαγχνική λειψμανίαση που προκαλείται από την *L. infantum* είναι χωρίς αμφιβολία η πιο σημαντική ζωνοσος της οποίας ο βασικός ξενιστής-δεξαμενή είναι ο σκύλος. Η *L. infantum* είναι ευρέως διαδεδομένη στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο, δηλαδή τη Ν. Ευρώπη και τη Β. Αφρική, αλλά και στη Δυτική Αφρική. Επίσης, βρίσκεται στη Σαουδική Αραβία και την Υεμένη και εκτείνεται μέσω του Ιράκ του Ιράν και του Πακιστάν μέχρι τη Βορειοδυτική Ινδία και την Κίνα. Οι

αποδεδειγμένοι φορείς της λεισμανίασης των σκύλων που προκαλείται από την *L. infantum* είναι οι *Ph. perniciosus*, *Ph. ariasi*, *Ph. perfilievi*, *Ph. neglectus* και *Ph. langeroni*, ενώ πιθανοί φορείς είναι οι *Ph. chinensis*, *Ph. longiductus*, *Ph. longicuspis*, *Ph. tobbi*, *Ph. kandelakii*, *Ph. syriacus*, *Ph. smirnovi* και *Ph. transcaucasicus*.^{60,104-105}

Στο Νέο Κόσμο η σπλαγχνική λεισμανίαση των σκύλων προκαλείται από την *L. chagasi* (η οποία έχει τελικά αποδειχθεί πως είναι πανομοιότυπη με την *L. infantum*) και συναντάται στην Κεντρική και Νότια Αμερική. Οι αποδεδειγμένοι φορείς της *L. chagasi* (= *L. infantum*) είναι η *Lu. longipalpis* και η *Lu. youngi*, ενώ πιθανοί είναι η *Lu. evansi* και η *Lu. shannoni*.^{60,104-105}

Η *L. amazonensis* έχει βρεθεί να προκαλεί σπλαγχνική λεισμανίαση σε σκύλους στη Ν. Αμερική και συγκεκριμένα στη Βραζιλία, ενώ γενικά συναντάται και στη Βολιβία, το Περού και τη Βενεζουέλα. Ωστόσο δεν έχει ακόμη βρεθεί το είδος της σκνίπας που μεταδίδει την ασθένεια στο σκύλο.¹⁰⁶ Πιθανός φορέας είναι η *Lu. flaviscutelata*.⁶⁰

Δερματική Μορφή:

Ο σκύλος αποτελεί έναν σημαντικό ξενιστή-δεξαμενή και για τη δερματική λεισμανίαση που προκαλείται από την *L. peruviana*. Αυτό το είδος του παρασίτου συναντάται στην περιοχή των Περουβιανών Άνδεων. Οι φορείς της *L. peruviana* είναι η *Lu. verrucarum* και η *Lu. peruensis*.⁶⁰

Η *L. braziliensis* είναι ένα ακόμη είδος του παρασίτου, που προκαλεί δερματική λεισμανίαση στους σκύλους. Ο σκύλος φαίνεται να μην αποτελεί το βασικό ξενιστή-δεξαμενή για αυτή την ασθένεια. Ωστόσο, το παράσιτο έχει απομονωθεί από οικόσιτους σκύλους σε χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Αργεντινή, Βολιβία, Βραζιλία, Κολομβία, Περού, Βενεζουέλα). Οι αποδεδειγμένοι φορείς της *L. braziliensis* είναι η *Lu. wellcomei* και η *Lu. whitmani*.^{60, 107-108}

Δερματική λεισμανίαση προκαλείται στον σκύλο και από την *L. mexicana* στη Ν. Αμερική και συγκεκριμένα στο Εκουαδόρ, ενώ γενικά συναντάται και στην Κεντρική Αμερική (Μεξικό, Ονδούρα, Γουατεμάλα). Το είδος της σκνίπας που μεταδίδει την ασθένεια στο σκύλο είναι η *Lu. ayachuchensis*.¹⁰⁸

Η *L. panamensis* είναι ένα ακόμη είδος, που προκαλεί δερματική λείσμανίαση στον σκύλο. Έχει απομονωθεί από σκύλους στην Κολομβία και το Εκουαδόρ και γενικά συναντάται και σε χώρες της Κεντρικής Αμερικής (Παναμάς, Κόστα Ρίκα, Ονδούρα). Ο φορέας της *L. panamensis* είναι η *Lu. trapidoi*.¹⁰⁸

Η *L. major* έχει απομονωθεί από σκύλους μόνο στη Σαουδική Αραβία ενώ γενικά συναντάται στη Β. Αφρική, την Κεντρική Ασία, την περιοχή της Μεσογείου, την Εγγύς και Μέση Ανατολή και την Ινδία. Ο αποδεδειγμένος φορέας της *L. major* είναι ο *Ph. papatasi*.^{47,60} Το παράσιτο αυτό, όμως, βρίσκεται κυρίως στα τρωκτικά της ερήμου και προκαλεί επιδημία στους ανθρώπους. Ο σκύλος δεν αποτελεί σημαντικό ξενιστή-δεξαμενή της *L. major*.

Τέλος, η *L. tropica*, που προκαλεί δερματική λείσμανίαση, έχει απομονωθεί από σκύλους στην Ινδία, στο Αφγανιστάν και το Ιράν, ενώ γενικά συναντάται και στις χώρες της Μεσογείου, στη Δυτική και Κεντρική Ασία και στην Κεντρική και Βόρεια Αφρική. Ο αποδεδειγμένος φορέας της *L. tropica* είναι ο *Ph. sergenti*.⁶⁰

Η γεωγραφική κατανομή των διαφόρων παρασίτων *Leishmania* συμπίπτει σε μεγάλο βαθμό με τη γεωγραφική εξάπλωση των ειδών της σκνίπας. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια επιπλέον απόδειξη της δράσης των σκνιπών *Phlebotomus* και *Lutzomyia* στη μετάδοση της λείσμανίασης. Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται η συγκριτική κατανομή των ειδών *Leishmania* που προσβάλλουν τον σκύλο και των ειδών της σκνίπας που αποτελούν αποδεδειγμένους ή πιθανούς φορείς (Πίνακες 3 και 4).

Πίνακας 3: Επιδημιολογία της λείσμανίασης των σκύλων και συγκριτική κατανομή των ειδών *Leishmania* και των ειδών *Phlebotomus* στον Παλαιό Κόσμο^{47,60, 104-105}

| Μορφή της νόσου | Είδος παρασίτου | Φορέας (αποδεδειγμένος ή πιθανός) | Γεωγραφική κατανομή |
|-----------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Σπλαγχνική | <i>L. infantum</i> | <i>Ph. perniciosus</i> [†] | Μεσόγειος |
| | | <i>Ph. ariasi</i> [†] | Δυτική Μεσόγειος |
| | | <i>Ph. perfilievi</i> [†] | Μεσόγειος |
| | | <i>Ph. neglectus</i> [†] | Ανατολική Μεσόγειος |
| | | <i>Ph. langeroni</i> [†] | Β. Αφρική, Ισπανία |
| | | <i>Ph. chinensis</i> [*] | Κεντρική και Βόρεια Κίνα |
| | | <i>Ph. longiductus</i> [*] | Β. Αφρική, Κεντρική |

| Μορφή της νόσου | Είδος παρασίτου | Φορέας (αποδεδειγμένος ή πιθανός) | Γεωγραφική κατανομή |
|-----------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | | | Ασία |
| | | <i>Ph. longicuspis</i> * | Β. Αφρική, Ισπανία |
| | | <i>Ph. tobbi</i> * | Ανατολική Μεσόγειος |
| | | <i>Ph. kandelakii</i> * | Λίβανος, Τουρκία, Ιράν, Αφγανιστάν |
| | | <i>Ph. syriacus</i> * | Ισραήλ, Ιορδανία, Συρία |
| | | <i>Ph. smirnovi</i> * | Κεντρική Ασία |
| | | <i>Ph. transcaucasicus</i> * | Αζερμπαϊτζάν |
| Δερματική | <i>L. major</i> | <i>Ph. papatasi</i> † | Σαουδική Αραβία, Μεσόγειος |
| | <i>L. tropica</i> | <i>Ph. sergenti</i> † | Ιράν, Αφγανιστάν, Ινδία |

† Αποδεδειγμένος φορέας

* Πιθανός φορέας

Πίνακας 4: Επιδημιολογία της λεισμανίασης των σκύλων και συγκριτική κατανομή των ειδών *Leishmania* και των ειδών *Lutzomyia* στον Νέο Κόσμο. ^{47,60, 104-107}

| Μορφή της νόσου | Είδος παρασίτου | Φορέας (αποδεδειγμένος ή πιθανός) | Γεωγραφική κατανομή |
|-----------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| Σπλαγχνική | <i>L. chagasi</i> (= <i>L. infantum</i>) | <i>Lu. longipalpis</i> † | Κεντρική και Νότια Αμερική |
| | | <i>Lu. youngi</i> † | Κεντρική και Νότια Αμερική |
| | | <i>Lu. evansi</i> * | Κολομβία, Κόστα Ρίκα, Βενεζουέλα |
| | | <i>Lu. shannoni</i> * | Νοτιοανατολικές Η.Π.Α., Ν. Αμερική |
| | <i>L. amazonensis</i> | <i>Lu. flaviscutelata</i> * | Βραζιλία |

| Μορφή της νόσου | Είδος παρασίτου | Φορέας (αποδεδειγμένος ή πιθανός) | Γεωγραφική κατανομή |
|-----------------|--|---------------------------------------|----------------------------|
| Σπλαγγχνική | <i>L. chagasi</i> (= <i>L. infantum</i>) | <i>Lu. longipalpis</i> [†] | Κεντρική και Νότια Αμερική |
| Δερματική | <i>L. braziliensis</i> | <i>Lu. wellcomei</i> [†] | Βραζιλία |
| | | <i>Lu. whitmani</i> [†] | Βραζιλία, Περού |
| | <i>L. peruviana</i> | <i>Lu. verrucarum</i> [†] | Περού |
| | | <i>Lu. peruensis</i> [†] | Περού |
| | <i>L. mexicana</i> | <i>Lu. ayachuchensis</i> [†] | Εκουαδόρ |
| | <i>L. panamensis</i> | <i>Lu. trapidoi</i> [†] | Κολομβία, Εκουαδόρ |

† Αποδεδειγμένος φορέας

* Πιθανός φορέας

Ελλάδα

Η *L. infantum*, είναι το είδος του παρασίτου, το οποίο προκαλεί κρούσματα σπλαγγχνικής λεισμανίασης στους σκύλους, στην Ελλάδα και την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου.^{43,46} Έχει ανιχνευθεί σε πολλές περιοχές της χώρας (κυρίως στην Κρήτη και στην ευρύτερη περιοχή των Αθηνών αλλά και στα Ιόνια νησιά και τη Βορειοδυτική Ελλάδα).

Το δεύτερο είδος *Leishmania* που έχει εντοπιστεί στην Ελλάδα είναι η *L. tropica*,⁴⁴⁻⁴⁶ η οποία προκαλεί κρούσματα δερματικής λεισμανίασης σε σκύλους αλλά και ανθρώπους. Επίσης, το είδος *L. major* θεωρείται ότι προκαλεί κρούσματα δερματικής λεισμανίασης στην περιοχή της Μεσογείου γεγονός που μας ωθεί να το αναζητήσουμε κατά την εκτέλεση των μοριακών τεχνικών.⁴⁷ Οι συνηθέστεροι φορείς του είδους αυτού είναι τα τρωκτικά.¹⁰⁹

Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί ο αποδεδειγμένος φορέας της λεισμανίασης των σκύλων στη χώρα. Ωστόσο, οι πιο πιθανοί φορείς είναι οι *Ph. perfilievi* και *Ph. tobbi*, αλλά και οι *Ph. neglectus*, *Ph. sergenti*, *Ph. simici*, *Ph. papatasi*, *Ph. balcanicus*, *Ph. alexandri* και *Ph. mascittii*.¹¹⁰⁻¹¹¹ Ο *Ph. neglectus* είναι το μοναδικό είδος που έχει

αποδειχθεί ότι μεταδίδει τη σπλαγγνική λειψμανίαση στην Ελλάδα, όμως φαίνεται να δείχνει προτίμηση μόνο στον άνθρωπο και σε τρωκτικά και όχι τόσο στον σκύλο.⁶⁹

A.7 Μετάδοση της νόσου

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μετάδοση της λειψμανίασης των σκύλων γίνεται μέσω των σκνιπών που είναι φορείς του παρασίτου. Αυτός είναι ο βασικός τρόπος μετάδοσης της νόσου. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί (ή υποπτευθεί) περιπτώσεις μετάδοσης στις οποίες δεν συμμετείχαν οι σκνίπες.

Μία τέτοια υπόθεση προτείνει τον πιθανό ρόλο των τσιμπουριών και των ψύλλων στη μετάδοση της νόσου. Η μετάδοση επετεύχθει σε εργαστηριακές συνθήκες, με τη χρήση τσιμπουριών (*Rhipicephalus sanguineus*) και ψύλλων (*Ctenocephalides felis*) που απομονώθηκαν από μολυσμένους με λειψμανίαση σκύλους, σε εργαστηριακά χάμστερ.^{112,113} Ωστόσο, δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί η μετάδοση της νόσου στους σκύλους μέσω αυτών των αρθροπόδων σε φυσικές συνθήκες.

Η κάθετη μετάδοση της σπλαγγνικής λειψμανίασης από μία μολυσμένη μητέρα στα κουτάβια της έχει επίσης παρατηρηθεί σε εργαστηριακές συνθήκες.¹¹⁴ Ωστόσο διάφορες έρευνες που έχουν γίνει στη φύση δίνουν συγκεκριμένα αποτελέσματα για τη σημασία αυτού του τρόπου μετάδοσης.¹¹⁵⁻¹¹⁶

Επιπλέον, έχει προταθεί και η περίπτωση μετάδοσης της νόσου στους σκύλους μέσω μετάγγισης αίματος.¹¹⁷ Η απευθείας μετάδοση από σκύλο σε σκύλο μέσω της επαφής έχει επίσης αναφερθεί ότι ίσως συμβαίνει στις Η.Π.Α. σε μία προσπάθεια να εξηγηθεί η εξάπλωση της λειψμανίασης μεταξύ των σκύλων, σε μια περιοχή όπου απουσιάζουν οι αποδεδειγμένοι φορείς αλλά και η ανθρώπινη μόλυνση.¹¹⁸

Όλοι οι παραπάνω τρόποι μετάδοσης της νόσου, εκτός αυτής με φορέα τη σκνίπα, θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω, καθώς δεν είναι ακόμη γνωστός ο ρόλος που ίσως παίζουν στην επιδημιολογία της λειψμανίασης των σκύλων.

A.8 Θεραπεία

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της λειψμανίασης των σκύλων επιτρέπουν την καλή ανάρρωση των περισσότερων ζώων, όμως σπάνια μειώνουν την

πιθανότητα υποτροπών.¹¹⁹ Η μέτρια θεραπευτική τους επιτυχία αποδίδεται στις εκτεταμένες ανοσολογικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του κύκλου της μόλυνσης. Επίσης, η παρουσία κυττάρων μολυσμένων με παράσιτα σε ιστούς που δεν αιματώνονται καλά (π.χ. δέρμα, κερατινώδεις ιστοί, υαλώδες σώμα) κάνει ακόμη πιο δύσκολη την επίτευξη αποτελεσματικής ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των φαρμάκων. Ο έλεγχος της λεισμανίασης γίνεται περαιτέρω περίπλοκος λόγω της συχνής εμφάνισης στελεχών *Leishmania* ανθεκτικών σε κάποια από τα φάρμακα.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φάρμακα στη θεραπεία της λεισμανίασης των σκύλων, σπλαγχνικής και δερματικής, είναι οι πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου, οι οποίες αναστέλλουν εκλεκτικά τη γλυκόλυση στη *Leishmania* και την οξειδωση των λιπαρών οξέων καθώς και η αλλοπουρινόλη η οποία δρα παρεμποδίζοντας την μετάφραση των πρωτεϊνών, παρεμβαίνοντας στη σύνθεση του RNA.¹²⁰ Η δράση της αλλοπουρινόλης δηλαδή, είναι παρασιτοστατική και όχι παρασιτοκτόνος.¹²¹ Η θεραπεία με τα παραπάνω φάρμακα είναι συχνά συνδυασμένη. Χορηγούνται ενώσεις του αντιμονίου για 4 εβδομάδες και αλλοπουρινόλη για μακρά χρονική περίοδο.

Η μιλτεφοσίνη (Miltefosine) είναι σχετικά ένα νέο φάρμακο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί τον πρώτο μήνα της θεραπείας σε συνδυασμό με αλλοπουρινόλη αντί για ενώσεις του αντιμονίου.

Η αμφοτερικίνη Β που συνδέεται με την εργοστερόλη, στην κυτταρική μεμβράνη του παρασίτου και αλλάζει την διαπερατότητά της, χρησιμοποιείται επίσης, αλλά παρουσιάζει ισχυρή νεφροτοξική δράση. Η φαρμακευτική αγωγή συχνά επιτυγχάνει μόνο προσωρινή βελτίωση σε σκύλους με λεισμανίαση και δεν συνδέεται πάντοτε με την εξάλειψη του παρασίτου.^{122,123}

Οι ιμιδαζόλες (κετοκοναζόλη και μετρονιδαζόλη), που χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία της ανθρώπινης λεισμανίασης, έχουν δείξει κάποια θετικά σημάδια και στη θεραπεία των σκύλων. Ωστόσο, η χρήση τους περιορίζεται λόγω των συχνών παρενεργειών που παρουσιάζονται και θα πρέπει να γίνουν πολλές ακόμη έρευνες για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί και στους σκύλους.^{124,125}

Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και ένα φάρμακο με αντιπρωτοζωικές και αντιμυκητιακές ιδιότητες, η πενταμιδίνη, η οποία φαίνεται πως έχει την ικανότητα να προκαλεί βλάβες στο DNA της *Leishmania*.¹²⁶ Το πρόβλημα με τη χρήση της

πενταμιδίνης στους σκύλους είναι ότι έχει πολλές και σοβαρές παρενέργειες, για το λόγο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται με πολύ μεγάλη προσοχή.¹²⁷

Η αμινοσιδίνη είναι ένα ακόμη φάρμακο που έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της σπλαγγνικής λεισμανίασης των σκύλων κυρίως στις περιπτώσεις εκείνες που το παράσιτο εμφανίζει ανθεκτικότητα σε άλλα φάρμακα.¹¹⁹

Η διατήρηση και θεραπεία των μολυσμένων σκύλων αποτελεί ένα δίλημμα για τους ιδιοκτήτες και τους επιστήμονες, ιδιαίτερα στις περιοχές που ενδημούν φορείς-μεταδότες του παρασίτου, καθώς υπάρχει κίνδυνος μετάδοσης σε ανθρώπους και ζώα της κοινότητας. Οι σκύλοι που έχουν λάβει αγωγή, συχνά παραμένουν φορείς της νόσου, μπορούν να τη μεταδώσουν στις σκνίπες ή να παρουσιάσουν υποτροπή της νόσου.

A.9 Πρόληψη και έλεγχος

Η πρόληψη και ο έλεγχος της λεισμανίασης των σκύλων μπορεί να επιτευχθεί μέσω του ελέγχου των φορέων της και με τη λήψη μέτρων για την αποφυγή έκθεσης σε αυτούς. Για παράδειγμα, σε ενδημικές περιοχές της νόσου, οι σκύλοι δεν θα πρέπει να περνούν τη νύχτα εκτός σπιτιού (καθώς οι σκνίπες είναι δραστήριες κυρίως τη νύχτα), ενώ θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλέγματα παραθύρων με πολύ λεπτά ανοίγματα προκειμένου να μην μπορούν να περάσουν οι σκνίπες στο εσωτερικό του σπιτιού. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η χρήση περιλαίμιου με εντομοαπωθητικό (δελταμεθρίνη), μπορεί να προστατέψει τους σκύλους από το τσίμπημα της σκνίπας και με αυτό τον τρόπο προλαμβάνει τη μόλυνση από το παράσιτο.¹²⁸

Ο εμβολιασμός των σκύλων κατά της *Leishmania* έχει, επίσης, προταθεί για την πρόληψη της νόσου. Το πρόβλημα που ανακύπτει με τη δημιουργία εμβολίου οφείλεται στο γεγονός ότι για τα διάφορα είδη *Leishmania* έχουν ταυτοποιηθεί διαφορετικοί μολυσματικοί παράγοντες και υπάρχουν πολύ μεγάλες διαφορές στους μηχανισμούς ανοσολογικής απόκρισης που διαμεσολαβούν στη δημιουργία ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας στη μόλυνση αλλά και στην παθολογία της ασθένειας.¹²⁹ Το 2003 κυκλοφόρησε ένα εμβόλιο (Leshmune Vaccine) για την *L. donovani* στη Βραζιλία. Οι μελέτες έδειξαν ότι επετεύχθη πάνω από 87% προστασία, ενώ υπήρχαν και κάποιες παρενέργειες όπως ανορεξία και τοπικό οίδημα.^{130,131}

Το ιδανικό εμβόλιο για τη *Leishmania* θα πρέπει να είναι ασφαλές, οικονομικό, αποτελεσματικό σε όλα τα είδη του παρασίτου και επίσης αποτελεσματικό και για την πρόληψη αλλά και για τη θεραπεία της νόσου. Τέτοια εμβόλια πιθανόν να αναπτυχθούν στα επόμενα 5-10 χρόνια. Η δυνατότητά τους να χρησιμοποιούνται και για τη θεραπεία της νόσου είναι αρκετά ελκυστική δεδομένων των προβλημάτων που αντιμετωπίζονται (παρενέργειες, κόστος) με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται τώρα.¹³²

Τέλος, τα αποτελέσματα των μελετών για την επίδραση του σιέλου της σκνίπας στην οξύτητα της μόλυνσης, λόγω της αλλαγής που επιφέρουν τα συστατικά του στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, οδήγησαν σε μια ενδιαφέρουσα πιθανότητα εμβολιασμού του ξενιστή ενάντια στα συστατικά αυτά. Έχει αποδειχθεί, ότι η προηγούμενη έκθεση των εργαστηριακών ποντικών σε συστατικά του σιέλου, πιθανόν να παρέχει προστασία ενάντια στη μετέπειτα μόλυνση.¹³³ Πράγματι, η ανοσοποίηση με το αντιγόνο maxadilan (συστατικό του σιέλου της *Lu. longipalpis*) παρείχε προστασία στα ποντίκια κατά της μόλυνσης από την *L. major*.¹³⁴ Προστασία των ποντικών από την *L. major* επετεύχθει, επίσης, και μετά από εμβολιασμό τους με συστατικά του σιέλου της *Ph. paratasi*.¹³⁵ Επομένως, ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών του σιέλου της σκνίπας μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση νέων εμβολίων κατά της *Leishmania*.¹³⁶⁻¹³⁷ Ωστόσο, ο πολυμορφισμός των πρωτεϊνών αυτών αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα που ίσως περιορίσει την χρησιμότητα αυτού του είδους των εμβολίων.¹³⁸⁻¹³⁹

A.10 Διάγνωση της νόσου

Η διάγνωση της λεισμανίασης στους σκύλους είναι αρκετά δύσκολη εξαιτίας τριών βασικών λόγων:⁷⁴

1. Τα κλινικά συμπτώματα είναι ποικίλα και μπορεί να μοιάζουν με τα συμπτώματα άλλων ασθενειών.
2. Η ιστοπαθολογία της νόσου είναι εξαιρετικά μη ειδική και πιθανόν να μοιάζει με εκείνη άλλων μολυσματικών ή ανοσοδιαμεσολαβούμενων ασθενειών.

3. Μέχρι στιγμής, δεν είναι διαθέσιμο κανένα διαγνωστικό τεστ που να διαθέτει 100% εξειδίκευση αλλά και ευαισθησία.

Η διάγνωση μπορεί να γίνει με βάση τα κλινικά συμπτώματα, όμως απαιτείται και η επιβεβαίωση μέσω των τεχνικών διάγνωσης. Οι βασικές διαγνωστικές τεχνικές είναι τρεις:

A.10.1 Παρασιτολογικές τεχνικές

Μικροσκοπική εξέταση: Στόχος των τεχνικών αυτών είναι η οπτικοποίηση του παρασίτου. Έχουν εξειδίκευση 100%, όμως ο βαθμός ευαισθησίας είναι συνήθως χαμηλός. Η επιβεβαίωση της διάγνωσης της λεισμανίασης βασίζεται στη μικροσκοπική αποκάλυψη της αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου σε υλικό που λαμβάνεται με εξέταση λεπτής βελόνας ή σε υλικό από βιοψίες από το μυελό των οστών, σπλήνα, λεμφαδένες, ήπαρ, δέρμα^{140,141} ή από το περιφερικό αίμα μετά από φυγοκέντρηση¹⁴². Τα επιχρίσματα βαφονται με τη χρωστική Rompnowsky's, αιματοξυλίνης-ηοσίνης (H & E) ή με χρώση ανοσοϋπεροξειδάσης. Οι αμαστιγώτες μπορούν να γίνουν ορατοί στους ιστούς που έχουν ληφθεί μετά από τη χρώση τους με χρωστική Giemsa, κατά προτίμηση σε pH 7.2 και όχι 6.8 που συνήθως χρησιμοποιείται στην αιματολογία. Τμήματα ιστού που βάφονται πιο συμβατικά με H & E, είναι πιο δύσκολο να διακριθούν. Για να επιβεβαιωθεί, ότι οι δομές που παρατηρούνται είναι αμαστιγώτες, ο έμπειρος παρατηρητής θα πρέπει να διακρίνει το χαρακτηριστικό μέγεθος (2-4 mm σε διάμετρο), σχήμα (κυκλικό προς ωοειδές), και τα εσωτερικά οργανίδια, τον πυρήνα και τον κινητοπλάστη. Είναι σημαντικό να εντοπιστεί ο κινητοπλάστης.⁷ Με τη χρώση Giemsa, το κυτόπλασμα παίρνει ένα χαρακτηριστικό ανοιχτό μπλε χρώμα, ενώ ο πυρήνας και ο κινητοπλάστης αποκτούν μωβ-ροζ χρώμα.¹⁴³ Η χρώση ανοσοϋπεροξειδάσης παρέχει βελτιωμένη ευαισθησία σε περιπτώσεις δερματικής και βλεννογονοδερματικής λεισμανίασης.¹⁴³⁻¹⁴⁵

Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν έχει παρατηρηθεί κανενός είδους συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των παρασίτων που ανιχνεύονται στα κυτταρολογικά επιχρίσματα και της σοβαρότητας της νόσου.¹⁴⁶

Η ευαισθησία των τεχνικών αυτών για τη διάγνωση της λεισμανίασης στους σκύλους είναι χαμηλή. Μόνο το 50-70% των επιχρισμάτων μυελού από μολυσμένους σκύλους

δίνουν θετικό αποτέλεσμα, ενώ όσον αφορά τα επιχρίσματα λεμφαδένων, θετικό είναι μόνο το 30% των περιπτώσεων.^{75,147}

A.10.2 Ορολογικές δοκιμές

Το σημείο κλειδί στη διάγνωση της σπλαγγχνικής λείσμανίασης είναι η ανεύρεση υψηλού τίτλου ανοσοσφαιρινών στο αίμα, ενώ στις περιπτώσεις της δερματικής και βλεννογονοδερματικής λείσμανίασης η ανοσοαπόκριση είναι εξαιρετικά φτωχή.^{91\}

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες ορολογικές δοκιμές που μετρούν τα αντισώματα στην κυκλοφορία του αίματος. Η έμμεση δοκιμή ανοσοφθορισμού (IFAT), η έμμεση δοκιμή οροσυγκόλλησης (IHA), η Dot-ELISA και η άμεση δοκιμή οροσυγκόλλησης (DAT) είναι κάποιες από τις δοκιμές που κυκλοφορούν στην αγορά.^{91,148-151} Η ευαισθησία και η εξειδίκευση αυτών των τεχνικών είναι συνήθως υψηλή (80-100%). Το πρόβλημα είναι ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοναδικές τεχνικές για τη διάγνωση της νόσου καθώς πιθανόν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα για κάποιους υγιείς, ανθεκτικούς σκύλους οι οποίοι είχαν έλθει κάποια στιγμή στο παρελθόν σε επαφή με το παράσιτο. Παράλληλα, μπορούν να προκύψουν και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για μολυσμένους σκύλους που δεν έχουν ακόμη αναπτύξει αντισώματα (προσυμπτωματικό στάδιο).^{146,149} Επιπλέον, τα επίπεδα των αντισωμάτων του ορού δεν είναι ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου¹⁴⁹⁻¹⁵¹ ενώ είναι και ακατάλληλα ως μέσο ελέγχου της αποτελεσματικότητας του θεραπευτικού σχήματος καθώς μπορεί να παραμένουν ανιχνεύσιμα στον ορό ακόμη και μετά την ίαση του ζώου.¹⁴⁷

Παρά λοιπόν τη διαθεσιμότητα αρκετών ορολογικών μεθόδων, καμία από αυτές δεν βοηθά στην διάγνωση της δερματικής και βλεννογονοδερματικής λείσμανίασης γιατί τα αντισώματα έχουν την τάση να μην είναι ανιχνεύσιμα ή παρουσιάζονται σε ιδιαίτερα μικρό τίτλο εξαιτίας της μικρής ανοσιακής απόκρισης.^{140,152-153} Αυτές οι μέθοδοι δεν παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα αλλά οι αναγνώστες που ενδιαφέρονται μπορούν να συμβουλευθούν την πρόσφατη βιβλιογραφία.^{140-141,154}

A.10.3 Μοριακές μέθοδοι

Η μοριακή βιολογία εμπλέκεται ολοένα και περισσότερο στη διάγνωση και τον έλεγχο μολυσματικών ασθενειών. Πληροφορίες σχετικά με την ακολουθία του DNA

έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα, σε εφαρμογές που σχετίζονται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ένα διαγνωστικό τεστ με υψηλή ευαισθησία αλλά και εξειδίκευση.¹⁵⁵ Με την πρόοδο των μοριακών τεχνικών έχει αναπτυχθεί ένας σημαντικός αριθμός διαφορετικών μοριακών δεικτών και πρωτοκόλλων PCR για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των ειδών της *Leishmania*.¹⁵⁶ Η εφαρμογή της στηρίζεται στην ανίχνευση αλληλουχιών-στόχων του γενετικού υλικού. Χαρακτηριστικές περιοχές-στόχους αποτελούν η ITS (internal transcribed spacer region) του ριβοσωμικού RNA του παρασίτου καθώς και το DNA του κινητοπλάστη (kDNA) του παρασίτου, το οποίο μπορεί επιλεκτικά να ενισχυθεί από τους ιστούς του ήπατος, του σπληνός, του δέρματος, των λεμφαδένων και του μυελού των οστών.¹⁴⁷

Το γενετικό υλικό του ριβοσώματος εμφανίζεται με τη μορφή επαναλαμβανόμενων μονάδων, οι οποίες είναι διαταγμένες σε συστοιχίες. Κάθε μονάδα αποτελείται από μία περιοχή που μπορεί να μεταγραφεί (η οποία φέρει τα γονίδια των περιοχών 18S, 5.8S και 26S rRNAs και τις external transcribed spacers, ETS1 and ETS2) και μία περιοχή που δεν μεταγράφεται (non-transcribed spacer-NTS- region). Στην περιοχή που μεταγράφεται, οι περιοχές ITS (internal transcribed spacers) βρίσκονται στα δύο άκρα της γονιδιακής περιοχής 5.8S rRNA και περιγράφονται ως ITS1 και ITS2.

Το μήκος και η αλληλουχία των περιοχών ITS του rDNA πιστεύεται ότι εξελίσσεται συνεχώς και για το λόγο αυτό μπορεί να ποικίλλει. Εκκινητές οι οποίοι σχεδιάζονται βασισμένοι σε υψηλά συντηρημένες περιοχές του ITS, έχοντας το πλεονέκτημα του σχετικά μικρού μεγέθους της περιοχής (600-700 bp) και του μεγάλου αριθμού αντιγράφων (μέχρι 30000 για κάθε κύτταρο) δίνουν τη δυνατότητα εύκολης ενίσχυσης της περιοχής.¹⁵⁷⁻¹⁶⁰ Τα τμήματα ITS παρουσιάζουν επίσης επαρκή πολυμορφισμό ώστε να χρησιμοποιούνται στη διάκριση στελεχών, τουλάχιστον σε επίπεδο είδους¹⁶¹⁻¹⁶³ και τέλος, ένας μεγάλος αριθμός αλληλουχιών βρίσκεται αποθηκευμένος σε γνωστές τράπεζες πληροφοριών (sequence data banks). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την περιοχή ITS ένα πολύ ενδιαφέρον εργαλείο σε έρευνες που σχετίζονται με την εξέλιξη των ειδών¹⁶⁴ καθώς και με βιογεωγραφικές μελέτες.¹⁶⁵ Οι αλληλουχίες της ITS 1 έχουν μελετηθεί εκτενώς στη *Leishmania*.

Ο κινητοπλάστης αποτελεί οργανίδιο παρόμοιο με το μιτοχόνδριο και περιέχει δύο τύπους κυκλικών μορίων DNA (kDNA).⁸ Τα μεγαλύτερα μόρια, περίπου 20-50 σε κάθε κινητοπλάστη, καλούνται μεγακύκλοι (maxicircles) περιέχουν δομικά γονίδια για τα κυτοχρώματα, κωδικοποιούν πρωτείνες που συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας και έχουν μέγεθος 20000-35000 βάσεις. Τα μικρότερα μόρια (minicircles) είναι περίπου 10^3 - 10^5 σε αριθμό και μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ των 800 και 1300 βάσεων.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Για πολύ καιρό ήταν δύσκολο να βρεθεί η λειτουργική σημασία των minicircles. Θεωρείται πλέον ότι διαδραματίζουν ρόλο στην κωδικοποίηση Guide RNAs (gRNAs), τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία του RNA editing (αλλαγή στην αλληλουχία του RNA).

A.11 Σκοπός της μελέτης

Στηριζόμενοι στα παραπάνω χαρακτηριστικά χρησιμοποιήσαμε τις περιοχές του kDNA, ITS 1 για το σχεδιασμό εκκινητών πάνω στους οποίους θα βασιστεί η εφαρμογή της τεχνικής PCR-RFLP. Η τεχνική αυτή έχει την ικανότητα να ανιχνεύει την ύπαρξη παρασίτων και να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα στην ταυτοποίηση και το διαχωρισμό των ειδών τους, όπως έχει αποδειχθεί με την εφαρμογή της σε σημαντικό αριθμό ερευνών.¹⁶⁹⁻¹⁷²

Η εφαρμογή της PCR-RFLP τεχνικής θα καταστήσει δυνατό τον προσδιορισμό των ειδών *Leishmania*, που προκαλούν την ασθένεια στους σκύλους της περιοχής της Θεσσαλίας. Συγκεκριμένα θα μας επιτρέψει να καθορίσουμε με ακρίβεια τα είδη του παρασίτου *Leishmania* που έχουν μολύνει τους 16 σκύλους της έρευνάς μας.

Ο παραπάνω στόχος θα επιτευχθεί με την πραγματοποίηση των παρακάτω βημάτων:

1. Στοχευμένη ενίσχυση περιοχών του γενετικού υλικού των παρασίτων με την εφαρμογή της PCR και τη χρήση ειδικών εκκινητών.
2. Πέψη των προϊόντων της PCR με τη χρήση ενζύμων περιορισμού.
3. Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και ανάλυση τους.

Είναι σαφές ότι η μέθοδος που επιλέγουμε να χρησιμοποιήσουμε για τον διαχωρισμό των ειδών της *Leishmania* πρέπει να ικανοποιεί τα παρακάτω κριτήρια (α) άμεση και γρήγορη ταυτοποίηση των ειδών στους ξενιστές, στους φορείς και σε υλικό από βιοψίες, (β) υψηλή ευαισθησία στη διάκριση των παθογόνων στελεχών, και (γ) χαμηλό κόστος και ευκολία στην εφαρμογή σε χώρες όπου η νόσος έχει ενδημικό χαρακτήρα.

Ενότητα Β: Πειραματικό Μέρος

Β.1 Υλικά και Μέθοδοι

Σε προηγούμενη μελέτη λήφθηκαν δείγματα μυελού των οστών από 81 σκύλους της περιοχής της Θεσσαλίας. Με την πραγματοποίηση μεθόδων απομόνωσης, εκχύλισης και ποσοτικοποίησης του DNA, καθώς και με μοριακές τεχνικές, διαπιστώθηκε ότι 16 από τα δείγματα αυτά ήταν μολυσμένα με το παράσιτο της *Leishmania*. Λάβαμε τα 16 δείγματα και τα επεξεργαστήκαμε με τις ακόλουθες τεχνικές.

Β.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική, η οποία επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (παραγωγή περισσότερων των 10 εκατομμυρίων αντιγράφων μίας αλληλουχίας στόχου από έναν μικρό μόνο αριθμό μορίων). Πρόκειται για μια εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο, καθώς έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μιας αλληλουχίας από ένα μόριο DNA.¹⁷³

Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA (γνωστού ή αγνώστου) με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες.^{174,175} Αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους συντελείται σε διακριτά βήματα. Κάθε βήμα χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία προκειμένου να γίνει η θερμική αποδιάταξη και η αντιγραφή του DNA.¹⁷³

Τα συστατικά που περιέχονται στο μίγμα της αντίδρασης είναι:

Μήτρα DNA: Είναι η προς ενίσχυση αλληλουχία DNA. Η ποσότητα της μήτρας γονιδιωματικού DNA που απαιτείται για την αντίδραση βρίσκεται συνήθως μεταξύ 0,1-1 μg σε τελικό όγκο 50 μl. Μεγαλύτερες ποσότητες DNA συνήθως οδηγούν στην παραγωγή μη ειδικών PCR προϊόντων.¹⁷³

Εναρκτήρια μόρια (εκκινητές): Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα

ενισχυθεί. Η συγκέντρωση των εκκινητών καθορίζεται συνήθως μεταξύ 0.4-0.6 μM ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένη έναρξη, ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων και δημιουργία διμερών (primer-dimer) που χρησιμοποιούνται επίσης ως DNA στόχος, ελαττώνοντας έτσι τη σύνθεση ειδικών προϊόντων. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA.¹⁷⁶

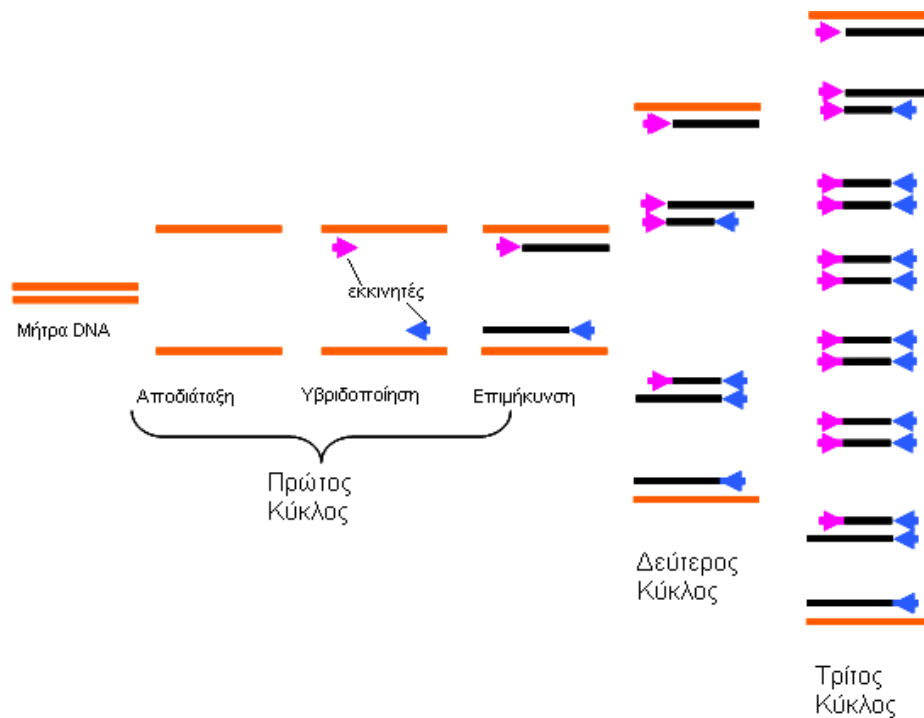
MgCl₂: Τα δισθενή ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), που προέρχονται από το MgCl_2 , είναι απαραίτητα για τη δράση της Taq πολυμεράσης καθώς το ένζυμο αυτό είναι εξαρτώμενο από το μαγνήσιο και το χρειάζεται ως συμπαράγοντα προκειμένου να δράσει.¹⁷⁷

PCR Buffer: Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης, τα οποία παρέχονται από την παρουσία Tris-HCl και NaCl ή KCl, αντίστοιχα, προκειμένου να διευκολυνθεί η υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA στόχο.¹⁷⁸

dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια): Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) σε συγκέντρωση 0.2 mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου.^{176,179}

Taq DNA πολυμεράση: Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η Taq DNA πολυμεράση είναι το θερμικά σταθερό ένζυμο που καταλύει την αντίδραση PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού για την Taq πολυμεράση είναι στους 75-80°C.¹⁷³

Η αντίδραση της PCR αποτελείται συνήθως από μία σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων. Κάθε κύκλος τυπικά αποτελείται από 2-3 διακριτά βήματα, τα οποία πραγματοποιούνται σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία (Εικ. 8). Η θερμοκρασία και ο χρόνος κάθε βήματος εξαρτάται από ποικίλες παραμέτρους, όπως το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, η συγκέντρωση των δισθενών κατιόντων και των dNTPs και το T_m (melting temperature) των εκκινητών.



Εικόνα 8: Τα βήματα της PCR.¹⁸⁰

Πιο αναλυτικά, κατά την αντίδραση PCR πραγματοποιείται:

Αρχική αποδιάταξη: Η αρχική αποδιάταξη του DNA είναι το πρώτο βήμα της αντίδρασης. Η ολοκληρωμένη αποδιάταξη της μήτρας DNA στην αρχή της αντίδρασης είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς μια μη ολοκληρωμένη αποδιάταξη μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή χρησιμοποίηση της μήτρας DNA και επομένως σε χαμηλή απόδοση προϊόντος. Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιείται σε διάστημα 1-9 min στους 94-96°C.¹⁸¹

Αποδιάταξη: Το βήμα της αποδιάταξης για κάθε κύκλο πραγματοποιείται στους 94-98 °C για 20-30 sec. Στο βήμα αυτό λαμβάνει χώρα η θερμική αποδιάταξη των μορίων DNA μέσω της διάσπασης των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι δημιουργούνται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δύο αλυσίδων.¹⁷³

Υβριδοποίηση: Στο βήμα της υβριδοποίησης πραγματοποιείται η σύνδεση των εναρκτήριων μορίων στη μονόκλωνη μήτρα DNA. Συνήθως, η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) είναι 5°C χαμηλότερη από το T_m των εκκινητών και κυμαίνεται μεταξύ 50-65°C. Το βήμα της υβριδοποίησης διαρκεί συνήθως 20-40 sec. Σταθεροί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μήτρας DNA σχηματίζονται μόνο όταν η αλληλουχία του εκκινητή έχει μεγάλη συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία της

μήτρας. Η Taq πολυμεράση προσδένεται στο σύμπλοκο εκκινητή-μήτρας ώστε να ακολουθήσει η σύνθεση του DNA στο επόμενο βήμα.¹⁸²

Επιμήκυνση (πολυμερισμός): Στο βήμα της επιμήκυνσης πραγματοποιείται η σύνθεση DNA από την Taq DNA πολυμεράση (πολυμερισμός), η οποία παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα στους 75-80°C.^{174,175} Συνήθως το βήμα του πολυμερισμού πραγματοποιείται στους 72°C. Ο χρόνος που απαιτείται είναι 1 min για τη σύνθεση τμημάτων DNA μήκους μέχρι και 2 kb. Για την ενίσχυση αλληλουχιών μεγαλύτερου μήκους, ο χρόνος αυτός αυξάνεται περίπου κατά 1 min για κάθε 1000 bp.¹⁷³ Στο βήμα αυτό, Taq πολυμεράση συνθέτει τη νέα αλυσίδα DNA προσθέτοντας dNTPs, που είναι συμπληρωματικά με τη μήτρα, με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Αριθμός κύκλων: Ο αριθμός των κύκλων της PCR εξαρτάται από την ποσότητα της μήτρας DNA στο μίγμα της αντίδρασης αλλά και από την απόδοση του προϊόντος που προσδοκάται. Σε περιπτώσεις που τα αντίγραφα της μήτρας DNA είναι λιγότερα από 10, θα πρέπει να πραγματοποιούνται 40 κύκλοι αντίδρασης. Αντίθετα, όταν η αρχική ποσότητα της μήτρας είναι υψηλότερη, η πραγματοποίηση 25-30 κύκλων είναι συνήθως επαρκής.¹⁷³ Η επιλογή του αριθμού των κύκλων είναι πολύ σημαντική για τη σωστή διεξαγωγή της αντίδρασης, καθώς παραπάνω κύκλοι μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των μη ειδικών προϊόντων, ενώ λιγότεροι κύκλοι παράγουν μικρότερη ποσότητα ειδικού προϊόντος.

Τελική επέκταση: Στο βήμα της τελικής επέκτασης λαμβάνει χώρα η συμπλήρωση των προεξεχόντων άκρων των νεοσυντιθέμενων προϊόντων της αντίδρασης. Επίσης, κατά τη διάρκεια του βήματος αυτού, προστίθενται επιπλέον νουκλεοτίδια αδενίνης (A) στο 3'-άκρο των PCR προϊόντων. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της δράσης τερματικής μεταφοράς που διαθέτει η Taq πολυμεράση.¹⁷³

Το DNA που εξήχθει από τα δείγματα των 16 σκύλων χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR στα πλαίσια της PCR-RFLP.

Τα βήματα της αντίδρασης PCR της μελέτης μας ήταν τα εξής:

- 1) 94°C για 5 min
- 2) 94°C για 30 sec

- 3) 51°C για 30 sec
- 4) 72°C για 1 min
- 5) πίσω στο βήμα 2 για 40 φορές
- 6) 72°C για 5 min

Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 20μl για κάθε δείγμα. Επειδή, η αντίδραση εκτελέστηκε ταυτόχρονα για όλα τα δείγματα, προετοιμάστηκε αρχικά ένα master mix το οποίο περιείχε νερό, PCR Buffer, MgCl₂, dNTPs, εκκινητές και Taq πολυμεράση. Το μίγμα αυτό διαμοιράστηκε σε PCR tubes (ένα για κάθε δείγμα). Σε κάθε PCR tube προστέθηκαν 19μl master mix και 1μl δείγματος DNA. Όλα τα διαλύματα αναδεύτηκαν ελαφρώς και φυγοκεντρήθηκαν πριν εισαχθούν στα σωληνάκια PCR. Εκτός από τα θετικά δείγματα στην αντίδραση προστέθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας-tube χωρίς την προσθήκη DNA. Στον Πίνακα 5 φαίνεται αναλυτικά η σύσταση του μίγματος της κάθε αντίδρασης.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια PCR

| | <u>Αρχική συγκέντρωση</u> | <u>Τελική συγκέντρωση</u> | <u>Όγκος (μl)</u> |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| DNA | - | - | 1,0 |
| PCR Buffer | 10x | 1x | 2,0 |
| MgCl₂ | 50mM | 1,5mM | 0,6 |
| dNTPs | 10mM | 0,8mM | 1,6 |
| ITSR/kDNAR | 10mM | 0,4mM | 0,8 |
| ITSL/kDNAL | 10mM | 0,4mM | 0,8 |
| Taq polymerase | 5u/μl | 1u | 0,2 |
| H₂O | - | - | 13 |
| Τελικός όγκος | - | - | 20 |

Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού (PCR-RFLP).

B.1.2 Πέψη DNA

Η πέψη του γενετικού υλικού αποτελεί μέθοδο της μοριακής βιολογίας με την οποία επιτυγχάνεται ο τεμαχισμός της αλληλουχίας DNA σε μικρά τμήματα, τα οποία είναι δυνατόν να μελετηθούν χωριστά. Η πέψη πραγματοποιείται με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού, τα οποία είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, αλληλουχίες που ονομάζονται θέσεις περιορισμού. Έτσι, τέμνουν κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA.¹⁸³

Το πρωτόκολλο της πέψης του DNA περιλαμβάνει τα ακόλουθα υλικά και βήματα.¹⁸³

Υλικά:

- 1) Δείγμα DNA
- 2) 10x buffer πέψης κατάλληλο για τα ένζυμα που θα χρησιμοποιήσουμε
- 3) Ένζυμο περιορισμού
- 4) Αποσταγμένο νερό

Διαδικασία:

- 1) Τοποθετούμε τα υλικά στα tubes με τις πιπέτες.
- 2) Αναδεύουμε ελαφρά το μίγμα
- 3) Πραγματοποιούμε Quick Spin για 2-3 δευτερόλεπτα.
- 4) Τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδική συσκευή, για μία ώρα σε θερμοκρασία 37° C.

Η αντίδραση στα πλαίσια της μελέτης μας πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30μl με την προσθήκη 20μl από το προϊόν της PCR. Το buffer της αντίδρασης περιείχε 10mM Tris-HCl (pH 7,5 στους 37°C), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl και 0,1mg/ml BSA. Οι ποσότητες των συστατικών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Αντίδραση πέψης DNA με EcoRI/KpnI .

| | Αρχική συγκέντρωση | Τελική συγκέντρωση | Όγκος (μl) |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| DNA | - | - | 20,0 |
| Buffer | 10x | 1x | 3,0 |
| EcoRI/KpnI | 10 u/μl | 2 units | 0,2 |
| H₂O | - | - | 6,8 |
| Τελικός όγκος | - | - | 30,0 |

Επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

Για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος της αντίδρασης πέψης, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 kV για περίπου 40 min.

B.1.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης μορίων. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος καθώς και το διαχωρισμό μιγμάτων μορίων, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Δείγμα μπορεί να αποτελέσει κάθε μόριο το οποίο φέρνει φορτίο, από ολόκληρα κύτταρα έως πρωτείνες, πεπτίδια, νουκλεικά οξέα (DNA, RNA), αμινοξέα κ.ά.¹⁸⁴

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA να μετακινούνται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου, μέσω ενός πηκτώματος αγαρόζης.¹⁸⁵

Η οπτικοποίηση του DNA στο πήκτωμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική, που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), φθορίζει με πορτοκαλί χρώμα. Η προσθήκη του EtBr γίνεται κατά την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης.

Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται με τη χρήση σκόνης αγαρόζης και ενός ρυθμιστικού διαλύματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το TBE (Tris Borate EDTA), το οποίο περιέχει Tris-βορικό και EDTA.

Σε μία από τις θέσεις του πηκτώματος προστίθεται ένας μοριακός μάρτυρας (*DNA ladder*), το οποίο αποτελείται από μόρια DNA διαφόρων μεγεθών. Κάθε μόριο DNA του ladder μετακινείται με συγκεκριμένη ταχύτητα στο πήκτωμα και η θέση του αποτελεί αναφορά για όλα τα μόρια DNA του ίδιου μεγέθους. Δηλαδή, το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται προκειμένου να γίνεται η εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών DNA που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση.

Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση:¹⁸⁵

Το πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιήσαμε είχε περιεκτικότητα σε αγαρόζη 1% και παρασκευάστηκε ως εξής:

1. Προσθήκη 1,6gr αγαρόζης και 160ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,5x TBE σε κωνική φιάλη και ανάδευση.
2. Θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Επώαση στον πάγκο προκειμένου να μειωθεί η θερμοκρασία του διαλύματος περίπου στους 55-60°C.
4. Προσθήκη 3ml βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα και ανάδευση.
5. Στη συνέχεια ρίξαμε το διάλυμα της αγαρόζης στη βάση όπου θα στερεοποιούνταν το πήκτωμα. Προηγουμένως, είχαμε τοποθετήσει κάθετα στην κατάλληλη θέση τη "χτένα", ώστε να δημιουργηθούν οι θήκες για τη φόρτωση των δειγμάτων μετά την πήξη της αγαρόζης. Επώαση μέχρι τη στερεοποίηση.
6. Προσεκτική αφαίρεση της χτένας. Βύθιση του πηκτώματος στο δοχείο ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 0,5x TBE.
7. Προσθήκη 3ml χρωστικής (loading buffer) στα 30 μl PCR προϊόντος.
8. Φόρτωση των δειγμάτων και του DNA ladder στις θήκες του πηκτώματος.

9. Ηλεκτροφόρηση σε ~100V για περίπου 40 min.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε η οπτικοποίηση των ζωνών του DNA με τη χρήση ακτινοβολίας UV.

B.2 Αποτελέσματα

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να προσδιορίσουμε τα είδη της *Leishmania*, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μόλυνση των σκύλων της Θεσσαλίας. Παρακάτω, παραθέτονται τα αποτελέσματα της μεθόδου PCR-RFLP που εφαρμόσαμε.

B.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως προϋπάρχουσα μελέτη απέδειξε πως 16 από τους 81 σκύλους ήταν θετικοί στην ύπαρξη του παρασίτου. Δηλαδή, περίπου το 20% των σκύλων που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν προσβεβλημένοι από το παράσιτο.

Εφαρμόσαμε τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στο γενετικό υλικό που λάβαμε από τα δείγματα αυτά.

Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Αρχικά μελετήθηκε η ακολουθία του DNA των περιοχών ITS και kDNA και στα τρία είδη *Leishmania* τα οποία προσπαθούμε να ανιχνεύσουμε. Εντοπίστηκε τμήμα των περιοχών αυτών που παρουσίαζε σε όλα τα είδη, μεγάλο βαθμό ομολογίας στην ακολουθία των βάσεων.

Πάνω σε αυτό το τμήμα στηρίχτηκε ο σχεδιασμός των εκκινητών, με σκοπό να επιτευχθεί ενίσχυση των περιοχών και στα τρία πιθανά είδη.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε είναι:

| | |
|--------|-----------------------------|
| ITS-R | 5'-GTCTGTAAACAAAGGTTGTCG-3' |
| ITS-F | 5'-TCATTTCCGATGCTTACACC-3' |
| kDNA-R | 5'-TTTGCAGAACGCCCTACC-3' |
| kDNA-F | 5'-TGGGGGTTGGTGTAATAAGG-3' |

Οι εκκινητές που ονομάζουμε ITS (internal transcribed spacer) οδηγούν στην ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής ITS 1 (internal transcribed spacer region 1)

του ριβοσωμικού RNA του παρασίτου. Οι εκκινητές με την ονομασία kDNA οδηγούν στην ενίσχυση του γονιδιώματος του κινητοπλάστη.

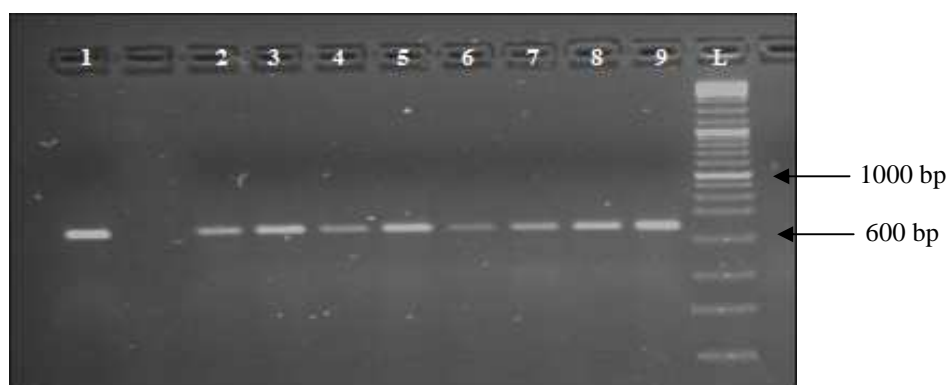
Το προϊόν της αντίδρασης PCR που προκύπτει με την ενίσχυση της ITS περιοχής, είναι για τα είδη του παρασίτου που αναζητούμε τμήμα DNA μεγέθους:

- *L. infantum* 1029 bp
- *L. major* 1118 bp
- *L. tropica* 961 bp

Ενώ μετά την ενίσχυση του kDNA:

- *L. infantum* 713 bp
- *L. tropica* 792 bp
- *L. major* 614 bp

Στη συνέχεια ηλεκτροφορήσαμε σε πήκτωμα αγαρόζης, αρχικά τα προϊόντα της PCR, την οποία πραγματοποιήσαμε με τη χρήση των εκκινητών kDNA. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μας έδωσε στην ηλεκτροφόρηση την ακόλουθη εικόνα:



Εικ.10 Ηλεκτροφόρηση γενετικού υλικού παρασίτου, μετά την ενίσχυση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού του κινητοπλάστη (kDNA primers).

Στην εικόνα 10 παρουσιάζονται τα εννέα πρώτα δείγματα της μελέτης. Η τελευταία θέση L ανήκει στο μάρτυρα.

Η ηλεκτροφόρηση είχε δοκιμαστικό χαρακτήρα, για να επιβεβαιώσουμε ότι μετά τη αντίδραση PCR με τη χρήση των ειδικών εκκινητών, επιτεύχθηκε η ενίσχυση του τμήματος του γενετικού υλικού του παρασίτου που στοχεύαμε.

Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με τη χρήση ενδονουκλεασών (PCR-RFLP), και τα παράγωγά της ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να διαπιστωθούν με ακρίβεια, τα είδη των παρασίτων της *Leishmania* που είχαν προσβάλλει τους υπό μελέτη σκύλους.

B.2.3 Πέψη προϊόντων PCR

Η πέψη έγινε με τη χρήση δύο ενζύμων περιορισμού, του *EcoRI* και του *KpnI*. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης οδήγησε στη δημιουργία δύο προτύπων ζωνών στο πήκτωμα αγαρόζης.

Τα ένζυμα περιορισμού απομονώνονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια, στα οποία ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να παρέχουν προστασία έναντι της εισβολής βακτηριοφάγων. Τα ένζυμα αυτά πέπτουν το ξένο DNA, ενώ το DNA των βακτηρίων προστατεύεται λόγω της μεθυλίωσης που υφίσταται από τα ίδια τα ένζυμα περιορισμού ή από ειδικές μεθυλάσες που παράγονται σε συνδυασμό με τα ένζυμα περιορισμού.¹⁸⁵

Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας (Εικ. 9, Παράδειγμα με ένζυμο *EcoRI* και *KpnI*).

| Ένζυμο | Μικροοργανισμός προέλευσης | Ακολουθία Αναγνώρισης (Recognition Sequence) | Αποτέλεσμα περιοριστικής δράσης στο υπόστρωμα (τρόπος κοψίματος) |
|--------------|-------------------------------|--|--|
| <i>EcoRI</i> | <i>Escherichia coli</i> RY 13 | 5'GAATTC 3'CTTAAG | 5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5' |

| Ένζυμο | Μικροοργανισμός προέλευσης | Ακολουθία Αναγνώρισης (Recognition Sequence) | Αποτέλεσμα περιοριστικής δράσης στο υπόστρωμα (τρόπος κοψίματος) |
|-------------|------------------------------|--|--|
| <i>KpnI</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 5'GGTACC 3'CCATGC | 5'---GGTAC C---3' 3'---C CATGG---5' |

Εικ. 9. Θέση αναγνώρισης *EcoRI* και *KpnI*.

Η δράση του κάθε ενζύμου εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία και τη σύσταση του ρυθμιστικού τους διαλύματος (buffer). Τα περισσότερα ένζυμα δρουν συνήθως στους 37° C. Το ρυθμιστικό διάλυμα καθορίζει το pH και την ιοντική ισχύ του περιβάλλοντος, στο οποίο θα δράσει το ένζυμο. Το pH του διαλύματος διατηρείται σταθερό από την παρουσία Tris-HCl, ενώ η ιοντική ισχύς καθορίζεται κυρίως από ιόντα Mg⁺² και Na⁺ που περιέχονται σε αυτό. Η ιοντική ισχύς του διαλύματος μπορεί να είναι υψηλή, μέση ή χαμηλή. Το ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να περιέχει επίσης σουλφιδρυλικούς παράγοντες όπως η β-μερκαπταιθανόλη και διθειοθρεϊτόλη (DTT), ισχυροί αναγωγικοί παράγοντες, οι οποίοι αποσκοπούν στην αναστολή της δράσης νουκλεασών που ενδεχομένως υπάρχουν καθώς επίσης και σταθεροποιητές ενζύμου, όπως η ορολευκωματίνη (bovine serum albumin-BSA) και μη ιοντικά απορρυπαντικά (Tween 20- , Triton X-100). Η ποσότητα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί αποτελεί συνάρτηση της ενεργότητας του και της ποσότητας και μεγέθους του προς κατάτμηση DNA.^{185,186}

Η πέψη έγινε με τη χρήση δύο ενζύμων περιορισμού, του *EcoRI* και του *KpnI*. Το *EcoRI* είναι μια περιοριστική ενδονουκλεάση τύπου II που απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia Coli*. Τα ένζυμα τύπου II αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA εσωτερικά της αλληλουχίας αυτής. Το ένζυμο *EcoRI* αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GAATTC-3' και διασπά το DNA στην περιοχή μεταξύ των δύο βάσεων GA της αλληλουχίας αυτής. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης περιορισμού από το *EcoRI* είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων Mg²⁺. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η δημιουργία τμημάτων DNA με προεξέχοντα (κολλώδη) άκρα.¹⁸⁶ Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στην πέψη του γενετικού υλικού στο οποίο προηγουμένως είχε ενισχυθεί η ITS περιοχή.

Η περιοριστική ενδονουκλεάση *KpnI* είναι επίσης τύπου II και απομονώθηκε από το Gram (-) βακτήριο *Klebsiella pneumoniae*. Συνδέεται με το DNA απουσία ιόντων μετάλλων και τέμνει την αλληλουχία του DNA 50-GGTAC[^]C-30 παρουσία ιόντων Mg²⁺, δημιουργώντας τμήματα με προεξέχοντα άκρα.¹⁸⁷ Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στην πέψη του ενισχυμένου κατά την PCR, κDNA του παρασίτου. Το ένζυμο *KpnI* έχει την ιδιότητα να δρα μόνο στο είδος *L. major*.

Το ένζυμο *EcoRI* έχει τη δυνατότητα να τέμνει το γενετικό υλικό και των τριών ειδών *Leishmania* που αναζητούμε. Τα τμήματα που προκύπτουν μετά από το πέρας της διαδικασίας της πέψης παρουσιάζουν τα ακόλουθα μεγέθη:

| | | | |
|--------------------|---------|--------------------|-----------|
| <i>L. infantum</i> | 1029 bp | <i>EcoRI</i> Fragm | 785 / 244 |
| <i>L. major</i> | 1118 bp | <i>EcoRI</i> Fragm | 821 / 297 |
| <i>L. tropica</i> | 961 bp | <i>EcoRI</i> Fragm | 793 / 168 |

Αντίστοιχα, το ένζυμο *KpnI* έχει τη δυνατότητα να τέμνει μόνο το γενετικό υλικό της *L. major*, δημιουργώντας τα τμήματα γενετικού υλικού που φαίνονται παρακάτω:

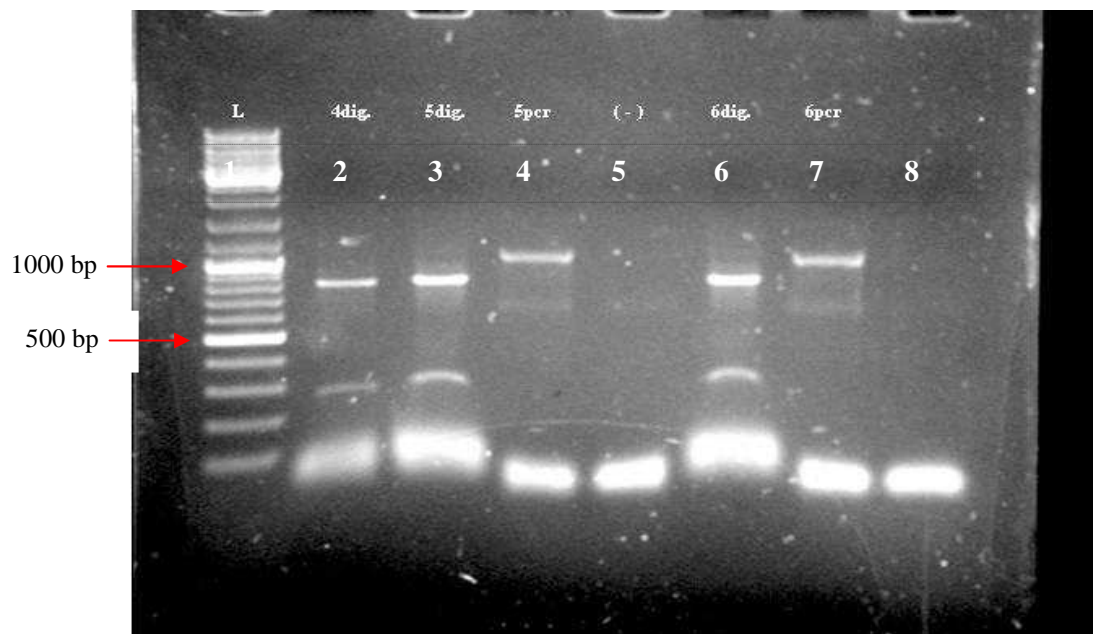
| | | | |
|--------------------|--------|--------------------|-----------|
| <i>L. infantum</i> | 713 bp | | |
| <i>L. major</i> | 614 bp | <i>KpnI</i> Fragm | 270 / 344 |
| <i>L. tropica</i> | 792 bp | <i>XhoI</i> Fragm | 624 / 69 |
| | | <i>EcoRV</i> Fragm | 396 / 396 |

Τα ένζυμα *XhoI* και *EcoRV* δρουν μόνο στο είδος της *L. tropica*. Εφόσον παρουσιάζουν ειδικότητα για το συγκεκριμένο είδος, μας δίνουν τη δυνατότητα να το ταυτοποιήσουμε στην περίπτωση που η χρήση των προηγούμενων ενζύμων δεν είναι αρκετή ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των ειδών.

Στις παρακάτω φωτογραφίες απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της πέψης που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων (Εικ. 11-14).



Εικ. 11 Στο πρώτο και τέταρτο "πηγαδάκι" έχουμε το αποτέλεσμα αρνητικών μαρτύρων. Το υλικό αυτό προέρχεται από σκύλους οι οποίοι δεν είχαν μολυνθεί από το παράσιτο. Στο δεύτερο και τρίτο πηγαδάκι βλέπουμε το αποτέλεσμα της PCR και της πέψης του πρώτου θετικού δείγματος, στο πέμπτο και έκτο το αποτέλεσμα της PCR και της πέψης του δεύτερου θετικού δείγματος και τέλος στο έβδομο το αποτέλεσμα της πέψης του τρίτου θετικού δείγματος. Η πέψη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου *EcoRI* πάνω στα προϊόντα της PCR με τη χρήση των εκκινητών ITS.



Εικ. 12. Συνέχεια των αποτελεσμάτων ITS. Στο δεύτερο, τρίτο και έκτο "πηγαδάκι" βλέπουμε τα αποτελέσματα της πέψης με *EcoRI* στα τρία επόμενα θετικά δείγματα ενώ στο τέταρτο, πέμπτο και έβδομο βλέπουμε τα αποτελέσματα PCR των δειγμάτων 5,6 καθώς και το αρνητικό αποτέλεσμα που μας έδωσε ο αρνητικός μάρτυρας (θέση 5).



Εικ. 13. Η πέψη των επόμενων 7 δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με ITS. Ανάμεσα στα θετικά δείγματα παρεμβάλλονται αρνητικοί μάρτυρες-δείγματα.



Εικόνα 14: Ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων πέψης του kDNA με την περιοριστική ενδονουκLEASE KpnI. Παρουσιάζονται όλα τα θετικά στη *Leishmania* δείγματα.

Από τα αποτελέσματα της πέψης και γνωρίζοντας τις ιδιότητες των ενζύμων που χρησιμοποιήσαμε, έγινε αντιληπτό πως το είδος του παρασίτου που είχε προσβάλλει τους σκύλους-δότες της μελέτης, ήταν σε όλες τις περιπτώσεις η *L. major*.

Ενότητα Γ: Συζήτηση

Η λείσμανίαση είναι μια παρασιτική ζωονόσος η οποία είναι ενδημική σε πολλά μέρη του κόσμου (Ευρώπη, Β. Αφρική, Μέση Ανατολή, Κεντρική και Ν. Αμερική, κ.α.), επικρατεί κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές και μπορεί να βρεθεί σε περίπου 88 διαφορετικές χώρες. Μπορεί να προσβάλλει τόσο τον άνθρωπο όσο και τον σκύλο, την αλεπού και τα τρωκτικά. Στην ουσία αποτελεί ένα σύμπλεγμα ασθενειών που προκαλούνται από διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania* και μεταδίδεται με το τσίμπημα της θηλυκής σκνίπας του γένους *Phlebotomus*.¹

Οι σκύλοι είναι οι πιο σημαντικοί ξενιστές του παρασίτου. Είναι οι κυρίως υπεύθυνοι για τη διατήρηση της λείσμανίασης τόσο των ίδιων των σκύλων, όσο και των ανθρώπων σε πολλές ενδημικές περιοχές. Παρά το γεγονός ότι έχουν βρεθεί και άλλα ζώα να έχουν μολυνθεί (τρωκτικά, μαρσιποφόρα, κ.ά.) ή να είναι οροθετικά, φαίνεται απίθανο να μπορούν να λειτουργήσουν ως αποτελεσματικοί ξενιστές-δεξαμενές.⁵²

Οι δύο βασικές μορφές της νόσου στους σκύλους είναι η σπλαγχνική και η δερματική λείσμανίαση. Η διάκριση μεταξύ των δύο μορφών είναι σχετικά δύσκολη σε σύγκριση με τους ανθρώπους καθώς η σπλαγχνική λείσμανίαση των σκύλων εμπεριέχει και συμπτώματα της δερματικής μορφής.

Η διάγνωση της λείσμανίασης μπορεί να βασιστεί σε κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα, αλλά θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με την ταυτοποίηση του παρασίτου ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα λάθους.²⁹ Εξαιτίας των διαφορών μεταξύ των ειδών της *Leishmania*, που σχετίζονται με την παθογόνο δράση τους και την ανθεκτικότητά τους σε διάφορα θεραπευτικά σχήματα, ο ακριβής προσδιορισμός των ειδών είναι εξαιρετικά σημαντικός ώστε να καθοριστεί η πρόγνωση της νόσου και να προσδιοριστεί το καταλληλότερο πρωτόκολλο θεραπείας.¹⁸⁸ Η διαφοροποίηση των ειδών είναι σημαντική επίσης για επιδημιολογικούς σκοπούς.

Η αρχική ταξινόμηση των ειδών της *Leishmania* έγινε βασισμένη στην γεωγραφική τους κατανομή, στην κλινική εικόνα των ασθενειών που προκαλούν, καθώς και στην επιδημιολογία, στους ξενιστές ή ακόμη και στα ζώα που αποτελούν δεξαμενές τους.³⁶

Καθώς δεν είναι δυνατός ο μορφολογικός διαχωρισμός των ειδών της *Leishmania*, μια ποικιλία βιοχημικών, ανοσολογικών και μοριακών τεχνικών έχει αναπτυχθεί για

την διαφοροποίηση των παθογόνων ειδών, όπως η ισοενζυμική, η ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων και τεχνικές υβριδισμού του DNA.^{189,190} Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την άμεση ανίχνευση του παρασίτου (μικροσκοπική εξέταση με χρώση Giemsa σε *in vitro* καλλιέργειες) παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία, εξαιτίας της μικρής συχνότητας με την οποία εμφανίζεται το παράσιτο σε ορισμένα δείγματα¹⁹¹ ή παρουσιάζουν προβλήματα επιμόλυνσης¹⁸⁸. Οι έμμεσες μέθοδοι (ανίχνευση αντισωμάτων έναντι στη *Leishmania* με ορολογικές μεθόδους) έχουν επίσης περιορισμένη ευαισθησία και δεν μπορούν να διαφοροδιαγνώσουν ενεργές και παλαιές λοιμώξεις.

Είναι σαφές ότι οι καλύτερες μέθοδοι για τον ακριβή διαχωρισμό των ειδών της *Leishmania* θα πρέπει να ικανοποιούν τα παρακάτω κριτήρια (α) άμεση και γρήγορη ταυτοποίηση των ειδών στους ξενιστές, στους φορείς και σε υλικό από βιοψίες, ιδιαίτερα σε βιοψίες από πρώιμες βλάβες, (β) ικανότητα για διάκριση ανάμεσα στα διάφορα παθογόνα στελέχη, και (γ) ευκολία στην εφαρμογή σε χώρες όπου η νόσος έχει ενδημικό χαρακτήρα.

Με την πρόοδο των μοριακών τεχνικών, έχει καθιερωθεί ένας σημαντικός αριθμός διαφορετικών μοριακών δεικτών και πρωτοκόλλων PCR για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των ειδών της *Leishmania*, που στηρίζονται σε διαφορετικά κριτήρια ταξινόμησης.^{191,192} Οι αλληλουχίες στόχοι περιλαμβάνουν είτε πυρηνικό DNA, όπως η μικρή υπομονάδα rRNA (SSU rRNA),¹⁹³ μια επαναλαμβανόμενη γονιδιακή αλληλουχία,¹⁹⁴ η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία *miniexon*,¹⁹⁵ η γενετική περιοχή *beta-tubulin*,¹⁹⁶ η γενετική θέση *gp63*,¹⁹⁷ οι περιοχές ITS,¹⁹⁸ το μικροδορυφορικό DNA,^{199,200} ή το DNA του κινητοπλάστη με τις αλληλουχίες των μικροκύκλων.¹⁵⁵

Ενώ οι παραπάνω μέθοδοι παρέχουν μια ποικιλία αξιόπιστων χαρακτηριστικών ταξινόμησης, συνοδεύονται από έναν αριθμό παραγόντων που περιορίζουν τη χρήση τους στο εργαστήριο. Κάποιες από τις μεθόδους περιορίζονται στην ανίχνευση της *Leishmania* στο επίπεδο του γένους και δεν επιτρέπουν τη διαφοροποίηση των ειδών,^{201,202} ενώ άλλες είναι προσαρμοσμένες σε ειδικά χαρακτηριστικά,^{203,204} που περιορίζουν την εφαρμογή τους σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Άλλες προσεγγίσεις σε μοριακό επίπεδο συνδυάζουν την ενίσχυση με PCR με τον υβριδισμό του DNA, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου,^{205,206} μια διαδικασία περίπλοκη και χρονοβόρα. Μέθοδοι βασισμένες στην τεχνική της πολλαπλής PCR

αποτελούν ακόμη μία προσέγγιση,²⁰⁷ αλλά περιέχουν τον κίνδυνο μειωμένης ευαισθησίας λόγω του σχηματισμού διμερών.

Στη μελέτη αυτή έγινε μια προσπάθεια με τη χρήση μοριακών τεχνικών, να ταυτοποιηθούν τα είδη της *Leishmania* που μολύνουν σκύλους της ευρύτερης περιοχής της Θεσσαλίας, καθώς οι μέχρι τώρα μελέτες αφορούσαν άλλες περιοχές της Ελλάδας, όπως την Κρήτη, την ευρύτερη περιοχή των Αθηνών, τα Ιόνια νησιά και τη Βορειοδυτική Ελλάδα.^{43,45,46,208}

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR-RFLP η οποία αποτελεί μία αξιόπιστη, γρήγορη και εύκολη στην εφαρμογή μέθοδο, με εξαιρετικά αποτελέσματα στη διάγνωση και διάκριση των ειδών της *Leishmania* σε μολυσμένους σκύλους.^{169,170,209,210}

Η μελέτη μας χρησιμοποίησε ως υλικό 16 δείγματα γενετικού υλικού από σκύλους, οι οποίοι είχαν προσβληθεί από το παράσιτο *Leishmania*. Προηγούμενη μελέτη είχε αποδείξει επίσης με μοριακές μεθόδους ότι 16 από τα αρχικά 81 δείγματα που λήφθηκαν από σκύλους της Θεσσαλίας ήταν θετικά στο παράσιτο, αριθμός που αντιστοιχεί στο 20% των δοτών.

Στα πλαίσια της μοριακής μεθόδου που σχεδιάσαμε, μελετήσαμε την ακολουθία των νουκλεοτιδίων που συγκροτούν τις αλυσίδες DNA και των τριών ειδών της *Leishmania*, τα οποία μπορούν να ευθύνονται για τη μόλυνση των σκύλων, δηλαδή της *L. infantum*, *L. major* και *L. tropica*. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν αποτέλεσαν τη βάση για το σχεδιασμό δύο ζευγών εκκινητών.

Το πρώτο ζεύγος είχε την ικανότητα να ενισχύει την περιοχή ITS (internal transcribed spacer region) του ριβοσωμικού RNA (rDNA) του παρασίτου. Η ITS επιλέχθηκε ως στόχος καθώς έχει ήδη χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση και τη διαφοροποίηση των ειδών της *Leishmania*. Μετά την εργασία των Cupolillo et al.²⁰⁹ οι μέθοδοι PCR-RFLP που στηρίζονται στα χαρακτηριστικά της περιοχής ITS του ριβοσωμικού γονιδιώματος, έχουν εφαρμοστεί στα είδη της *Leishmania* του Νέου Κόσμου,^{158,209-211} αλλά πολύ περισσότερο στα είδη του Παλαιού Κόσμου.^{162,212-215}

Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών οδήγησε στην ενίσχυση του γονιδιώματος του κινητοπλάστη⁸. Οι μικρόκυκλοι του kDNA αποτελούν ιδανικούς μοριακούς στόχους

για τη διάγνωση της *Leishmania* με τη χρήση της μεθόδου PCR εξαιτίας του μεγάλου αριθμού αντιγράφων σε κάθε παράσιτο και τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη περιοχή για ενίσχυση, ξεκινώντας από ένα μοναδικό τμήμα μεγέθους περίπου 120 bp.^{155,192}

Το πλεονέκτημα της χρήσης των συγκεκριμένων εκκινητών έγκειται στη δυνατότητα που παρουσιάζουν να ενισχύουν μια περιοχή του DNA, η οποία είναι παρούσα σε όλα τα είδη της *Leishmania*. Με τον τρόπο αυτό, μετά την πραγματοποίηση της PCR λαμβάνουμε μεγάλο αριθμό αντιγράφων της συγκεκριμένης περιοχής του γενετικού υλικού και είμαστε σε θέση να επεξεργαστούμε τα προϊόντα με μεγαλύτερη ευχέρεια και ακρίβεια.

Στη δεύτερη φάση, τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης υποβλήθηκαν σε πέψη με τη χρήση ενζύμων περιορισμού. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *EcoRI* και το *KpnI*. Τα παράγωγα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να διαπιστωθούν τα είδη των παρασίτων της *Leishmania* που είχαν προσβάλλει τους υπό μελέτη σκύλους.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση, οδήγησε στο συμπέρασμα πως τα παράσιτα της *Leishmania* τα οποία μόλυναν τους σκύλους της περιοχής της Θεσσαλίας, οι οποίοι αποτέλεσαν και το δείγμα της μελέτης μας, ανήκουν στο είδος *L. major*.

Στο παρελθόν πραγματοποιήθηκαν μελέτες οι οποίες επικεντρώνονταν στην ταυτοποίηση και τον ακριβή προσδιορισμό των ειδών της *Leishmania* στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Τα αποτελέσματά τους οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η συντριπτική πλειοψηφία των παρασίτων που ενδημούν στην περιοχή ανήκουν στο είδος της *L. infantum*.^{38,43-47,69,110,208,216} Έχουν ακόμη απομονωθεί στελέχη που ανήκουν στο είδος *L. tropica*²¹⁷ ενώ η *L. major* είναι εξαιρετικά σπάνια και προκαλεί στις περιοχές που εντοπίζεται κρούσματα δερματικής λεϊσμανίασης.⁴⁷

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς εντοπίζουν με αξιοπιστία την ύπαρξη του παρασίτου στους σκύλους της περιοχής της Θεσσαλίας. Το ποσοστό με το οποίο η *L. major* εμφανίζεται στα δείγματα που μελετήσαμε, αποτελεί ένα δείκτη της παρουσίας του παρασίτου στην περιοχή της

έρευνας. Ταυτόχρονα μας οδηγεί σε μια σειρά από προβληματισμούς και διαπιστώσεις που αξίζει να αναφέρουμε.

Είναι γνωστό από πειραματικά δεδομένα ότι η *L. major* προκαλεί ελάχιστα κρούσματα λειψμανίασης στον άνθρωπο.^{47,109} Η ύπαρξή της σε σημαντικό ποσοστό στα δείγματα των σκύλων μπορεί να δικαιολογηθεί, καθώς η μετάδοσή της από το σκύλο στον άνθρωπο είναι εξαιρετικά σπάνια. Δεν υπάρχει συνεπώς αναλογία ανάμεσα στα κρούσματα λειψμανίασης που παρουσιάζονται στον άνθρωπο και τον αριθμό των σκύλων που νοσοούν ή αποτελούν ασυμπτωματικούς φορείς.

Το δείγμα των σκύλων που χρησιμοποιήσαμε αποδεικνύει την ύπαρξη του παρασίτου στην περιοχή της Θεσσαλίας, αλλά δεν μπορούμε να αγνοήσουμε το γεγονός ότι αποτελεί αριθμητικά ένα μικρό δείγμα, από το οποίο είναι παρακινδυνευμένο να εξάγουμε γενικευμένα συμπεράσματα. Η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση πάνω στην οποία θα στηριχτούν εκτεταμένες έρευνες οι οποίες θα επιβεβαιώσουν με ασφάλεια και με στατιστική ακρίβεια την ύπαρξη της *L. major* στην ευρύτερη περιοχή.

Ακόμη είναι γνωστό πως κάθε εργαστηριακή μέθοδος περιέχει την πιθανότητα λάθους, το οποίο οφείλεται σε αστοχία των υλικών ή σε χειρισμούς που μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή των ιδανικών συνθηκών κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται ένα πείραμα. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να επιμείνουμε στην προσεκτική περάτωση του πειράματος και τη δυνατότητα να επαναληφθεί αναπαράγοντας με ακρίβεια τα αποτελέσματα.

Τέλος, προχωρώντας ένα βήμα στην εφαρμογή των μοριακών μεθόδων, θα μπορούσαμε να εκμεταλλευτούμε τις δυνατότητες που μας προσφέρει ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γενετικού υλικού - sequencing. Με την τεχνική αυτή το γενετικό υλικό των 16 δειγμάτων που λάβαμε και ενισχύσαμε με την PCR, αναλύεται διεξοδικά έτσι ώστε τελικά να αποκαλυφθεί η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που το συγκροτούν. Συγκρίνοντας τα ευρήματα με αλληλουχίες που είναι αποθηκευμένες σε γενετικές τράπεζες μπορούμε να διαπιστώσουμε με ακρίβεια το είδος του υπό έρευνα παρασίτου.

Η μελέτη που πραγματοποιήσαμε αποτελεί κομμάτι της συνολικής προσπάθειας για την αποτελεσματική αντιμετώπιση νόσων, που προσβάλλουν τόσο τους ανθρώπους

όσο και τα ζώα καθώς και για τον περιορισμό των επιπτώσεών τους στο επίπεδο της δημόσιας υγείας αλλά και κοινωνικής και οικονομικής ζωής. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας προτείνει τρεις βασικές προσεγγίσεις της λείσμανίασης:

1. διάγνωση και θεραπεία περιστατικών λείσμανίασης σε ανθρώπους
2. διάγνωση και θεραπεία ή εξόντωση των μολυσμένων σκύλων
3. έλεγχο των φορέων-μεταδοτών του παρασίτου.

Ακολουθώντας τις βασικές αυτές αρχές μπορούμε να σταδιακά να ελέγξουμε και να περιορίσουμε την εμφάνιση μιας νόσου η οποία ταλαιπωρεί τη ανθρωπότητα εδώ και εκατοντάδες χρόνια.

Βιβλιογραφία:

1. Herwaldt BL. *Leishmaniasis. Lancet* 1999;354:1191-9.
2. Pearson RD, Sousa AQ. *Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infect Dis* 1996; 22: 1-13.
3. World Health Organization (WHO). *Leishmaniasis: background information. A brief history of the disease. WHO* 2009. Available from: www.who.int/leishmaniasis/en/
4. Ready P.D. *Leishmaniasis emergence and climate change. In: S de la Roque, editor. Climate change: the impact on the epidemiology and control of animal diseases. Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2008; 27(2):399-412.
5. Killick-Kendrick R. *Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med Vet Entomol.* 1990; 4(1):1-24.
6. Desjeux P. *The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(3):239-43.
7. Singh S. *New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res* 2006; 123: 311–30.
8. Leishmania Dictionary. Available at <http://encyclopedia.laborlawtalk.com/Leishmania>.
9. Manson-Bahr, P. E. C. 1996. *Old World leishmaniasis, p. 206-217. In F. E. G. Cox (ed.), The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. The Wellcome Trust, London, United Kingdom.*
10. Ross, R. 1899. *Report on the nature of kala azar. Office of the Superintendent of Government Printing, Calcutta, India.*
11. Hoare, C. A. 1938. *Early discoveries regarding the parasites of oriental sore. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 32:67-92.
12. Wenyon, C. M. 1926. *Protozoology. A manual for medical Men, veterinarians and zoologists, vol. 1. Ballière and Co., London, United Kingdom.*
13. Kean, B. H., K. E. Mott, and A. J. Russell (ed.). 1978. *Tropical medicine and parasitology: classic investigations. Cornell University Press, Ithaca, N.Y.*

14. Wright, J. H. 1903. *Protozoa in a case of tropical ulcer*. *J. Med. Res.* 10:472-482.
15. Cunningham, D. D. 1885. *On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil*. *Sci. Mem. Med. Offic. Army India* 1:21-31.
16. Leishman, W. B. 1903. *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India*. *Br. Med. J.* i: 1252-1254.
17. Donovan, C. 1903. *The etiology of the heterogeneous fevers in India*, *Br. Med. J.* ii: 1401.
18. Lainson, R. 1996. *New World leishmaniasis*, p. 218-229. In F. E. G. Cox (ed.), *The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases*. The Wellcome Trust, London, United Kingdom.
19. "Leonard Goodwin - Telegraph". *The Daily Telegraph*. 14 January 2009. <http://www.telegraph.co.uk/news/obituaries/4241645/Leonard-Goodwin.html>. Retrieved on 2009-01-18.
20. Vianna, G. 1911. *Sobre uma nova espécie de Leishmania*. *Bras. Med.* 25:411.
21. Sergent, Edm, et al. *Revue historique du problème de la transmission des leishmanioses*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 26 :224-248, 1934
22. Napier L. E., et al. *The transmission of kala azar to hamsters by the bite of the sandfly, Phlebotomus argentipes*. *Ind. JI. Med. Res.*, 21: 299-304, 1933
23. Smith, R. O. A., Halder, K. C. and Ahmed J. *Further investigations on the transmission of kala azar*. I-IV, VI. *Ibid.*, 28:575-579, 581-584, 585-591,1940; 29: 783-787, 799-802,1941.
24. Swanimath, C.S., Shortt, H.E., and Anderson, L.A.P. *Transmission of Indian kala-azar to man by the bites of Phlebotomus argentipes*. *Ind. JI. Med. Res.*, 30:473-477, 1942. (First successful transmission from man to man)
25. Gossage SM., Rogers ME., Bates PA. *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. *Int. J Parasitol* 2003 33:1027-34
26. Walters LL. 1993. *Leishmania differentiation in natural and unnatural sandfly hosts*. *J. Euk Microbiol* 40:196-206.

27. Lainson R. and Shaw JJ. 1979. *The role of animals in epidemiology of South American leishmaniasis*. In.: Lumsden WHR, Evans DA, eds *Biology of the Kinetoplastida*, London: Academic Press 2:1-116
28. LEISHMANIA, World Class Parasites. Volume 4, Jay P. Farrell, Series Editors: Samuel J. Black and J. Richard Seed, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS.
29. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm>
30. www.vet.uga.edu/.../leishmania/images/F12373.jpg
31. <http://www.med.cmu.ac.th/dept/parasite/framepro.htm>
32. Lumsden, WHR 1974. *Biochemical taxonomy of Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68:74-75
33. Rioux JA, Lannote G., Serres E., et al. 1990 *Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification*. *Ann Parasitol. hum. comp.* 65:111-125
34. Rioux JA and Lannote G., 1993. *Apport de la cladistique a l'analyse du genre Leishmania*. *Ross, 1903 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Corollaires épidémiologique. Biosystema.* 8: 79-90
35. Ross R. *Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan*. *Brit Med J* 1903; 2:1261-1262.
36. Lainson R, Shaw JJ. *Evolution, classification and geographical distribution*. In: *Peters W, Killick-Kendrick R, eds. The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987; 1:1-120.
37. Slappendel R. J., Ferrer L. *Leishmaniasis*. In: Green, C. E. (ed). *Infectious Diseases of the Dog and Cat, 2nd edn*. Philadelphia: Saunders, 1998:450-458
38. Kontos V. J., Koutinas, A. F. *Old World Canine Leishmaniasis*. *Compendium* 1993; 7: 949-959
39. Bravo, L., Frank, L. A., Brenneman, K. A. *Canine leishmaniasis in the United States*. *The Compendium on Continuing Education* 1993; 15:699-705

40. Gabriel Grimaldi Jr, John R. David and Diane McMahon-Pratt. *Identification and Distribution of New World Leishmania Species Characterized by Serodeme Analysis Using Monoclonal Antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36(2), 1987, pp. 270-287*
41. Stinson S, Sombre JR, Blum J. *Morphology of L. braziliensis changes. J Parasitol 1989; 75: 431-40*
42. Umakant Sharma & Sarman Singh. *Review Article: Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis 45, December 2008, pp. 255–272.*
43. V.Sideris, G. Papadopoulou, E. Dotsika & E. Karagouni. *Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. European Journal of Epidemiology 15: 271±276, 1999.*
44. Garifallou A, Schnur LF, Stratigos JD, Hadziandoniou M, Savigos M, Stavrianeas N, et al. *Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. Ann Trop Med Parasitol. 1984;78:369–75.*
45. Adler S., Theodor O., Witenberg G. 1938: *Investigations on Mediterranean Kala Azar XI. A study of leishmaniasis in Canea (Crete). Proc. R. Soc. Lond., Ser. B., 125: 491–516.*
46. Tselentis, Y., A. Gikas, and B. Chaniotis. 1994. *Kala-azar in Athens basin. Lancet 343:1635*
47. Aristarco Seimenis, Daniella Morelli, Andriano Mantovani. 2006. *Zoonoses in the Mediterranean Region. Ann Ist Super Sanita. Vol. 42, No 4:437-445*
48. Ward RD. 1985. *Vector biology and control. In.: Chag KP, Bray RS eds. Leishmaniasis. Amsterdam: Elsevier 199-212*
49. Quate LW. *Phlebotomus sandflies of the Paloich area in the Sudan. J Med Ent 1964;1: 213–68.*
50. Yuval B, Warburg A, Schlein Y. *Leishmaniasis in the Jordan Valley. V. Dispersal characteristics of the sandfly Phlebotomus papatasi. Med Vet Ent 1988; 2:391–5.*

51. Doha S, Shehata MG, El Said SM, et al. *Dispersal of Phlebotomus papatasi (Scopoli) and P. langeroni Nitzulescu in El Hammam, Matrouh Governorate, Egypt. Ann Parasitol Hum Comp 1991; 66:69–76.*
52. Killick-Kendrick R, Wilkes TJ, Bailly M, et al. *Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80:138–42.*
53. Rondani C 1840. *Sopra una Specie di Insetto Dittero, Memoria prima per servire alla ditterologia italiana^o1, Donati, Parma, 16 pp.*
54. Theodor O 1948. *Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Bull Ent Res 39: 85-115.*
55. Lewis, D.J.: *A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera, Psychodidae). Bull. Br. Mus. Nat. His. 45, 121-209, 1982*
56. Nitzulescu V 1931. *Essai de classification des Phlébotomes. Annals Parasit Hum Comp 9: 271-275.*
57. Artemiev MM, Neronov VM 1984. *Distribution and Ecology of Sandflies of the Old World (genus Phlebotomus), (USRR Com UNESCO Prog ManBiosph), Inst Evol Morphol Anim Ecol, USSR AcadSci, Moscow: 1-208. [in Russian]*
58. Lewis D. J. *Phlebotomid sandflies. Bull World Health Organ. 1971; 44(4): 535–551*
59. Rioux, J.A., E. Guilvard, J. Dereure, G. Lanotte, M. Denial, F. Pratlong, E. Serres and A. Belmonte: *Infestation naturelle de Phlebotomus papatasi (Scopoli, 1786) par Leishmania major MON-25 A propos de 28 souches isolées dans un foye du Sud marocain. In Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Application Eco épidémiologiques, Int. Coll. CNRS/INSERM/OMS, Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques, Montpellier, France, 1984, pp 471-480, 1986a*
60. Killick-Kendrick, R.: *The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin. Dermatol. 17, 279-289, 1999*
61. Guilvard, E., J.A. Rioux, M. Gallego, F. Pratlong, J. Mahjour, E. Martinez-Ortega, J. Dereure, A. Saddiki and A. Martin: *Leishmania tropica au Maroc. III – Rôle vecteur de Phlebotomus sergenti. a propos de 89 isolats. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 66, 96-99, 1991*

62. Depaquit J, Ferte H, Leger N, Lefranc F, Alves Pires C, Hanafi H, Maroli M, Morillas-Marquez F, Rioux JA, Svobodova M, Volf P. (2002) *ITS 2 sequences heterogeneity in Phlebotomus sergenti; and Phlebotomus simi/is (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit Leishmania tropica. Int J Parasitol 32:1123-1131*
63. Killick-Kendrick, R.: *Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med. Vet. Entomol. 4, 1-24, 1990a*
64. Rioux, J.A., D.M. Jarry, G. Lanotte, R. Maazoun and R. Killick-Kendrick: *Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 18. Identification enzymatique de Leishmania infantum Nicolle, 1908, isolé de Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921 spontanément infesté en Cévennes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 331-333, 1984*
65. Gemetchu T, Laskay T, Frommel D. *Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) of Ochollo, southwestern Ethiopia: species composition and natural infection of Phlebotomus pedifer with Leishmania aethiopia. 1990; Ethiop J Sci 13:43-50*
66. Darchenkova NN, Dergacheva TI. *Patterns in the distribution of visceral leishmaniasis in Transcaucasia]. Med Parazitol (Mosk). 1989 Jul-Aug; (4):28-33.*
67. Léger, N., Depaquit, J., Ferte, H. et al. (2000) *Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the isle of Cyprus. II. Isolation and typing of Leishmania (Leishmania infantum Nicolle, 1908 (zymodeme MON1) from Phlebotomus (Larrousius) tobbi Adler and Theodor, 1930. Parasite, 7: 143-146*
68. Umakant Sharma & Sarman Singh. *Review Article: Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis 45, December 2008, pp. 255–272*
69. Iovic V., Patakakis M., Tselentis Y., Chaniotis B. (2007) *Faunistic study of sandflies in Greece. Med. and Vet. Entomol. 21:121-124*
70. Ashford, RW. 1996. *Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin. Dermatol. 14:1-24*
71. Slappendel, R.J., and E. Teske in: Killick-Kendrick, R. (ed.): *Canine leishmaniasis: an update. Proc. Int. Can. Leishm. Forum, Barcelona, Spain, 1999, Intervet Int., Boxmeer, The Netherlands, 1999, 54-59*

72. <http://www.liv.uk/researchintelligense/issue18/shabbydog.html>
73. França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E (2003) *Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil Vet Parasitol 111:161-173.*
74. Herrer A., Christensen HA. *Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. Ann. J. Trop. Med. Hyg. 1976. 25:59-63.*
75. Ciaramella P, Oliva G, De Luna R, et al: *A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. Vet Rec 141:539-543, 1997.*
76. McConnell EE, Chaffee EF, Cashell IG, Garner FM: *Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. JAVMA156:197-201, 1970*
77. Ciaramella P, Papparella S, Oliva G: *Panofthalmite granulomatosabilaterale in corso di leishmaniosi del cane. Acta Medica Veterinaria (Napoli) 40:313-320, 1994.*
78. Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Lazaridis V, Leontides LS, Kostoulas P, Koutinas AF. *A retrospective study of 61 cases of spontaneous canine epistaxis (1998 to 2001). J Small Anim Pract Apr; 49 (4):191-6.*
79. Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E: *Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with Leishmania donovani infection in a dog. J Small Anim Practice 39:29-31, 1997.*
80. Cucinotta G, Ianelli N, Musicò M, et al: *La malattia articolare da Leishmania nel cane. ODV 11:73-76, 1995*
81. Koutinas AF, Kontos V, Kaldrimidou H, et al: *Canine leishmaniasis associated nephropathy: A clinicopathologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria. Europ J Comp Anim Pract 5:31-38, 1995.*
82. Ferrer L, Juanola B, Ramos A, Ramis A: *Chronic colitis due to Leishmania infection in two dogs. Vet Pathol 28:342-343, 1991*
83. Ferrer L: Leishmaniasis, in Kirk RW, Bonagura JD (eds): *Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia, WB Saunders, 1992, p 266.*

84. Mónica López-Peña, Nuria Alemañ, Fernando Muñoz, Dolors Fondevila, María Luisa Suárez, Ana Goicoa and Jose María Nieto. *Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. Acta Veterinaria Scandinavica 2009, 51:20*
85. <http://www.i-perros.com> kai <http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/joiner/>
86. <http://www.flickr.com/photos/19187511@N00/page5>
87. Saint-André Marchal, I., Marchal, T., Moore, P. F., Magnol, J. P., Bourdoiseau, G. *Infection of canine Langerhans cells and interdigitating dendritic cells by Leishmania infantum in spontaneous canine leishmaniasis. Revue de Médecine Vétérinaire 1997; 148:29-36*
88. Fondevila, D., Vilafranca, M., Ferrer, L. *Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. Veterinary Immunology and Immunopathology 1997; 56: 319–327.*
89. Slappendel, R. J., Ferrer, L. *Leishmaniasis. In: Green, C. E. (ed). Infectious Diseases of the Dog and Cat, 2nd edn. Philadelphia: Saunders, 1998: 450–458.*
90. Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J. et al. *Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum. Infection and Immunity 1994; 62:229–235.*
91. Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E. et al. *Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally Leishmania infantum-infected treated and untreated dogs. Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology 1997; 59: 21–30.*
92. Chiara Noli. *Canine leishmaniasis. Waltham Focus® Vol 9 NO 2. (1999)*
93. Titus, R. G., and J. M. C. Ribeiro. 1988. *Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. Science 239:1306-1308.*
94. Maria Thiakaki, Iva Rohousova, Vera Volfova, Petr Volf, Kwang-Poo Chang and Ketty Soteriadou. *Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in Leishmania amazonensis-BALB/c mouse model. Microbes Infect. 2005 Apr; 7(4): 760-6. Epub 2005 Apr*
95. Titus, R. G., and J. M. C. Ribeiro. 1990. *The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. Parasitol. Today 6:157-160.*

96. Rogers K.A., Titus R.G. 2003: *Immunomodulatory effects of Maxadilan and Phlebotomus papatasi sandfly salivary gland lysates on human primary in vitro immuneresponses. Parasite Immunol. 25: 127–134.*
97. Rogers K.A., Dekrey G.K., Mbow M.L., Gillespie D, Brodskyn C.I, Titus R.G. 2002a: *Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. FEMS Microbiol.Lett. 209: 1–7.*
98. Lehn M., Weiser W.Y., Engelhorn S., Gillis S., Remold H.G. 1989: *IL-4 inhibits H₂O₂ production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN- γ . J. Immunol. 143: 3020–3024*
99. Norsworthy N.B, Sun J.R, Elnaiem D, Lanzarog, Soong L. 2004: *Sand fly saliva enhances Leishmania amazonensis infection by modulation interleukin-10 production. Infect. Immun. 72: 1240–1247.*
100. Hall L.R, Titus R.G. 1995: *Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania major and nitric oxide production. J.Immunol. 155: 3501–3506.*
101. Mbow M.L, Bleyenbergh J.A, Hall L.R, Titus R.G.1998: *Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with Leishmania major. J. Immunol. 161:5571–5577.*
102. Katz O, Waitumbi J.N, Zer R, Warburg A. 2000: *Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62: 145–150.*
103. Desjeux, P. 1999. *Global control and Leishmania/HIV co-infection. Clin. Dermatol. 17:317-325*
104. Travi BL Cerro C, Cadena H, Montoya-Lerma, Adler GH. *Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sandflies from non-endemic areas. Res Vet Sci 2002, 72:83-86*
105. Lane RP. Sandflies (Phlebotominae) In: Lane RP, Crosskey RW editors. *Medical Insects and Arachnids, 1st edition. London; New York: Chapman and Hall; 1993. p. 78-119.*
106. Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter-Winter LM, Shaw JJ: *The first records of Leishmania (Leishmania)*

amazonensis in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2007, 149:280-284.

107. Reithinger R, Davies CR: *Is the domestic dog (Canis familiaris) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence.* *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61:530-541.
108. Filipe Dantas-Torres. *Canine leishmaniosis in South America.* *Parasites & Vectors* 2009, 2(Suppl 1):S1. <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S1>
109. P D Ready. *Eurosurveillance*, Volume 15, Issue 10, 11 March 2010. Review articles. *Leishmaniasis emergence in Europe.*
110. Chaniotis B., Gozalo-Garcia G., Tselentis Y. (1994). *Leishmaniasis in the large urban area of Athens, Greece. Entomological studies. Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88: 659-663.
111. Papadopoulos B. & Tselentis Y. (1994) *Sandflies in the greater area of Athens. Parasite*, 1: 131-140.
112. Coutinho, M.T.Z. et al. (2005) *Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis.* *Vet. Parasitol.* 128, 149–155
113. Coutinho, M.T.Z. and Linardi, P.M. (2007) *Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?* *Vet. Parasitol.* 147, 320–325
114. Rosypal, A.C. et al. (2005). *Transplacental transmission of a North American isolate of Leishmania infantum in an experimentally infected beagle.* *J. Parasitol.* 91, 970–972
115. Andrade, H.M. et al. (2002) *Leishmania (Leishmania) chagasi is not vertically transmitted in dogs.* *Vet. Parasitol.* 103, 71–81
116. Diniz, S.A. et al. (2005) *Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of Leishmania sp. in the semen of naturally infected dogs.* *Vet. Pathol.* 42, 650–658

117. De Freitas, E. et al. (2006) *Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors*. *Vet. Parasitol.* 137, 159–167
118. Duprey, Z.H. et al. (2006) *Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003*. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 440–446.
119. Oliva G, Gradoni L, Cortese L, et al: *Comparative efficacy of meglumine antimonite and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis*. *Ann Trop Med Parasitol* 92:165–171, 1998.
120. Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, et al: *A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis*. *Vet Parasitol* 98:247–261, 2001.
121. Shapiro TA, Were JBO, Danso K, et al: *Pharmacokinetics and metabolism of allopurinol riboside*. *Clin Pharmacol Ther* 49:506–514, 1991.
122. Solano-Gallego, et al. 2009. *Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis*. *Vet. Parasitol.* 165: 1-18.
123. Miro, et al. 2008. *Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis-part two*. *Trends Parasitol.* 24: 371-377.
124. D'Ambrosio F, Gallo C, Agresti A: *The ketoconazole in the therapy of canine leishmaniasis*. *Proc Italian Soc Vet Sci* 40:492–496, 1986.
125. Pennisi MG, De Majo M, Masucci M, et al: *Efficacia della terapia combinata metronidazolo–spiramicina nel trattamento della leishmaniosi canina*. *Proc 2nd World Congr Leishmaniasis*, 2001.
126. Rhalem A, Sahibi H, Lasri S: *Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before and after drug treatment*. *Vet Immunol Immunopathol* 71:69–76, 1999.
127. Greene EC: *Antiprotozoal chemotherapy*, in Green CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia, WB Saunders, 1990, pp 758–762.

128. Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux C. et al. *Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology* 1997; 11: 105–111.
129. McMahon-Pratt D, Alexander J (October 2004). "Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?". *Immunol. Rev.* 201: 206–24.
130. Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, et al. (September 2005). "Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs". *Vaccine* 23 (40): 4805–10.
131. Parra LE, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Souza LO, Palatnik-de-Sousa CB, Menz I (March 2007). "Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil". *Vaccine* 25 (12): 2180–6
132. Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H. 2006. *Drug resistance in leishmaniasis. Clin. Microbiol. Rev.* 19:111-126.
133. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. "Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies," *Science*, vol. 290, no. 5495, pp.1351–1354, 2000.
134. Morris R.V, Shoemaker C.B, David J.R, Lanzaro G.C, and Titus R.G, "Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection," *The Journal of Immunology*, vol. 167,no. 9, pp. 5226–5230, 2001.
135. Valenzuela J.G, Belkaid Y, Garfield M.K et al., "Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 3, pp. 331–342, 2001.

136. Anderson J.M, Oliveira F, Kamhawi S et al., “Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis,” *BMC Genomics*, vol. 7, p. 52, 2006.
137. Valenzuela J.G, Garfield M, Rowton E.D, Pham V.M. “Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*,” *The Journal of Experimental Biology*, vol. 207, no. 21, pp. 3717–3729, 2004.
138. Elnaiem A, Meneses C, Slotman M, Lanzaro G.C. “Genetic variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania major*,” *Insect Molecular Biology*, vol. 14, no. 2, pp. 145–150, 2005.
139. Milleron R.S, Mutebi J.P, Valle S. et al., “Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis,” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 70, no. 3, pp. 286–293, 2004.
140. Singh S, New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, March 2006, pp 311-330
141. Singh S, Dey A, Sivakumar R. *Applications of molecular methods for Leishmania control. Rev Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 251-65.
142. Liarte DB, Mendonca IL, Luz FC, Abreu EA, Mello GW, Farias TJ, et al. *QBC® for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis : preliminary data. Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 577-81.
143. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. *Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. Acta Trop.* 2006 Aug; 99(1):55-61.
144. Ashford RW, Bates PA. Leishmaniasis in the Old World. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson’s microbiology and microbial infections*. Vol.5. *Parasitology*. 9th ed. New York, USA: Oxford University Press; 1998 p. 215-40.

145. Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis - *The Neotropical Leishmania species.*. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections (volume 5), Parasitology. 9th ed.* New York: Oxford University Press; 1998 p. 241-82.
146. Denerolle, P. *Leishmaniose canine: difficulté du diagnostic et du traitement. Pratique Médicale et Chirurgienne des Animaux de Compagnie* 1996; 31: 137–145.
147. Ferrer, L. *Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy.* In: *Proceedings of the Fourteenth Annual Congress of the European Society of Veterinary Dermatology, Pisa, 1997:* 33–36.
148. Mancianti, F., Pedonese, F., Poli, A. *Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescent assay.* *Veterinary Parasitology* 1996; 65: 1–9.
149. Ferrer, L., Aisa, M. J., Roura, X., Portus, M. *Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis.* *Veterinary Record* 1995; 136: 514–516.
150. Harith, A. E., Slappendel, R. J., Reiter, I. et al. *Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-leishmania antibodies in the canine reservoir.* *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 2252–2257.
151. Vercammen, F., De Deken, R. *Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis.* *The Veterinary Record* 1996; 139: 264.
152. Amaral V, Pirmez C, Goncalves A, Ferreira V, Grimaldi G Jr. *Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of Leishmania (L.) amazonensis- infected rhesus macaques, Macaca mulatta.* *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 209-16.
153. Ahluwalia S, Lawn SD, Kanagalingam J, Grant H, Lockwood DN. *Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America.* *BMJ* 2004; 329: 842-4.
154. Boelaert M, Rijal S, Regmi S, et al. *Comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis.* *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70: 72-7.

155. Rodgers, M. R., Popper, S. J., Wirth, D. F. *Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. Experimental Parasitology* 1990; 71: 267–275.
156. Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN. *Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3: 657-67.
157. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. *Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. Acta Trop.* 2006 Aug; 99(1):55-61.
158. Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Pérez-Montfort R, Becker I. *Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of Leishmania mexicana.* *Parasitol Res.* 2002 Oct; 88 (10):918-25
159. Fryauff DJ, Hanafi HA, Klena JD, Hoel DF, Appawu M, Rogers W, Pupilampu N, Odoom S, Kweku M, Koram K, Wilson MD, Racznik G, Boakye D. *Short report: ITS-1 DNA sequence confirmation of Leishmania major as a cause of cutaneous leishmaniasis from an outbreak focus in the Ho district, southeastern Ghana. Am J Trop Med Hyg.* 2006 Sep; 75(3): 502-4.
160. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. *Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the Leishmania donovani complex. Microbes Infect.* 2005 Aug-Sep; 7(11-12):1224-34.
161. Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, Carme B. *Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. J Clin Microbiol.* 2006 Feb; 44(2):459-67.
162. Schönian G, El Fari M, Lewin S, Schweynoch C, Presber W. *Molecular epidemiology and population genetics in Leishmania. Med Microbiol Immunol.* 2001 Nov; 190(1-2):61-3.
163. Schönian G, Schnur L, el Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Köhler W, Presber W. *Genetic heterogeneity in the species Leishmania tropica revealed*

- by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 Mar-Apr; 95(2):217-24.
164. Hersckovitz MA, Lewis LA. Deep-level diagnostic value of the r DNA region. *Mol Biol Evol* 1996 Nov; 13(9): 1276-95
165. Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome* 1994 Feb; 37(1): 112-20
166. Mahboudi F, Abolhassani M, Tehrani SR, Azimi M, Asmar M. *Differentiation of old and new world leishmania species at complex and species levels by PCR.* *Scand J Infect Dis.* 2002; 34(10):756-8.
167. Mahboudi F, Abolhassan M, Yaran M, Mobtaker H, Azizi M. *Identification and differentiation of Iranian Leishmania species by PCR amplification of kDNA.* *Scand J Infect Dis.* 2001; 33(8):596-8.
168. Simpson I. *The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa, genomic organization, transcription, replication and evolution.* *Ann Rev Microb* 1987; 41: 363-82
169. Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. *PCR-RFLP to identify Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (Leishmania) amazonensis causing American cutaneous leishmaniasis.* *Acta Trop.* 2004 Mar; 90(1):31-7.
170. De Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. *Use of PCR-RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs.* *Vet Parasitol.* 2006 Sep 10; 140 (3-4):231-8.
171. Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. *Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR.* *Acta Trop.* 2009 Sep; 111(3): 289-94.
172. Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Fliemetakis A, Vakalis NC. *Detection and species identification of Old World Leishmania in clinical samples using a PCR-based method.* *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Jan; 102(1): 46-53.

173. *Protocol for PCR with Taq DNA Polymerase.*
<http://www.fermentas.com/techinfo/pcr/dnaamplprotocol.htm>
174. Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*". *J. Bacteriol* 174: 1550–1557. PMID 8432.
175. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH (1993). "High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity". *PCR Methods Appl.* 2: 275–287. PMID 8324500.
176. *Nucleic acid amplification protocols and guidelines.*
<http://www.promega.com/paguide/chap1.htm>.
177. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M (2002). "Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach". *J. Clin. Lab. Anal.* 16 (1): 47–51.
doi:10.1002/jcla.2058.
178. *PCR Buffers and MgCl₂.* <http://www.studentsguide.in/animal-biotechnology/PCR-polymerase-chain-reaction/PCR-buffers-MGcl2.html>
179. Kunz BA, Kohalmi SE (1991). "Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels". *Annu. Rev. Genet.* 25: 339–59.
180. <http://www.obgynacademy.com/basicsciences/fetology/genetics/>
181. D.J. Sharkey, E.R. Scalice, K.G. Christy Jr., S.M. Atwood, and J.L. Daiss (1994). "Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction". *Bio/Technology* 12: 506–509.
182. Bartlett & Stirling (2003). *A Short History of the Polymerase Chain Reaction.* In: *Methods Mol Biol.* 226:3-6
183. Roberts RJ (November 1976). "Restriction endonucleases". *CRC Crit. Rev. Biochem.* 4 (2): 123–64.
184. Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

185. Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. *Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J Virol.* 1974 Nov; 14(5): 1235-44.
186. Gingeras T. R., Greenough L., Schildkraut I., Roberts R.J. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9:4525–4536.
187. Matheshwaran Saravanan, Janusz M. Bujnicki, Iwona A. Cymerman, Desirazu N. Rao, Valakunja Nagaraja. *Type II restriction endonuclease R.KpnI is a member of the HNH nuclease superfamily. Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 20 6129–6135.*
188. Berman, J. D. 1997. *Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin. Infect. Dis.* 24:684–703.
189. Grimaldi, G., Jr., J. R. David, and D. McMahon-Pratt. 1987. *Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 270–287.
190. Wilson, S. M. 1995. *DNA-based methods in the detection of Leishmania parasites: field applications and practicalities. Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89(Suppl. 1):95–100.
191. Weigle, K. A., M. de Davalos, P. Heredia, R. Molineros, N. G. Saravia, and A. D'Alessandro. 1987. *Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36:489–496.
192. Degraeve, W., O. Fernandes, D. Campbell, M. Bozza, and U. Lopes. 1994. *Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania—a mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89:463–469.
193. Van Eys, G. J., G. J. Schoone, N. C. Kroon, and S. B. Ebeling. 1992. *Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. Mol. Biochem. Parasitol.* 51: 133–142.
194. Piarroux, R., M. Fontes, R. Perasso, F. Gambarelli, C. Joblet, H. Dumon, and M. Quilici. 1995. *Phylogenetic relationships between Old World Leishmania strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 249–252.

195. Hassan, M. Q., A. Ghosh, S. S. Ghosh, M. Gupta, D. Basu, K. K. Mallik, and S. Adhya. 1993. *Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of Leishmania donovani: primers and probes for DNA diagnosis. Parasitology 107(Pt. 5): 509–517.*
196. Luis, L., A. Ramirez, C. M. Aguilar, S. Eresh, D. C. Barker, and A. Mendoza-Leon. 1998. *The genomic fingerprinting of the coding region of the betatubulin gene in Leishmania identification. Acta Trop. 69: 193–204.*
197. Victoir, K., A. L. Banuls, J. Arevalo, A. Llanos-Cuentas, R. Hamers, S. Noel, S. De Doncker, D. Le Ray, M. Tibayrenc, and J. C. Dujardin. 1998. *The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of Leishmania belonging to subgenus Viannia. Parasitology 117(Pt. 1): 1–13.*
198. Davila, A. M., and H. Momen. 2000. *Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within Leishmania. Ann. Trop. Med. Parasitol. 94: 651–654.*
199. Rossi, V., P. Wincker, C. Ravel, C. Blaineau, M. Pages, and P. Bastien. 1994. *Structural organisation of microsatellite families in the Leishmania genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. Mol. Biochem. Parasitol. 65: 271–282.*
200. Russell, R., M. P. Iribar, B. Lambson, S. Brewster, J. M. Blackwell, C. Dye, and J. W. Ajioka. 1999. *Intra and inter-specific microsatellite variation in the Leishmania subgenus Viannia. Mol. Biochem. Parasitol. 103:71–77.*
201. Bhattacharyya, R., K. Das, S. Sen, S. Roy, and H. K. Majumder. 1996. *Development of a genus specific primer set for detection of Leishmania parasites by polymerase chain reaction. FEMS Microbiol. Lett. 135:195–200.*
202. Mathis, A., and P. Deplazes. 1995. *PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. in diagnostic samples from humans and dogs. J. Clin. Microbiol. 33: 1145–1149.*
203. De Bruijn, M.H., and D.C.Barker. 1992. *Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the Leishmania braziliensis complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Trop. 52: 45–58.*

204. Eresh, S., S. M. McCallum, and D. C. Barker. 1994. *Identification and diagnosis of Leishmania mexicana complex isolates by polymerase chain reaction. Parasitology 109 (Pt. 4): 423–433.*
205. Ramos, A., D. A. Maslov, O. Fernandes, D. A. Campbell, and L. Simpson. 1996. *Detection and identification of human pathogenic Leishmania and Trypanosoma species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. Exp. Parasitol. 82: 242–250.*
206. Rodriguez, N., B. Guzman, A. Rodas, H. Takiff, B. R. Bloom, and J. Convit. 1994. *Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J. Clin. Microbiol. 32: 2246–2252.*
207. Harris, E., G. Kropp, A. Belli, B. Rodriguez, and N. Agabian. 1998. *Singlestep multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes. J. Clin. Microbiol. 36: 1989–1995.*
208. Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis GJ. *Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. J Infect 2005; 50: 53-60.*
209. Cupolillo, E., G. Grimaldi, Jr., H. Momen, and S. M. Beverley. 1995. *Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. Mol. Biochem. Parasitol. 73: 145–155.*
210. Garcia, A. L., A. Kindt, K. W. Quispe-Tintaya, H. Bermudez, A. Llanos, J. Arevalo, A. L. Banuls, S. De Doncker, D. Le Ray, and J. C. Dujardin. 2005. *American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. Infect. Genet. Evol. 5: 109–116.*
211. Rodriguez-Bonfante, C., R. Bonfante-Garrido, G. Grimaldi, Jr., H. Momen, and E. Cupolillo. 2003. *Genotypically distinct Leishmania colombiensis isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. Infect. Genet. Evol. 3: 119–124.*
212. Chicharro, C., M. A. Morales, T. Serra, M. Ares, A. Salas, and J. Alvar. 2002. *Molecular epidemiology of Leishmania infantum on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96(Suppl. 1): S93–S99.*

213. El Tai, N. O., M. El Fari, I. Mauricio, M. A. Miles, L. Oskam, S. H. El Safi, W. H. Presber, and G. Schonian. 2001. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp. Parasitol.* 97:35–44.
214. Nimri, L. F., and H. D. Schallig. 2003. Application of riboprinting for the identification of isolates of cutaneous *Leishmania* spp. *Parasitology* 127:201–205.
215. Schonian, G., A. Nasereddin, N. Dinse, C. Schweynoch, H. D. Schallig, W. Presber, and C. L. Jaffe. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47:349–358.
216. Argyriadis D, Litke O. Epizootiological study of dog leishmaniasis in central and eastern Macedonia and in Thessaly. *Bull Hellenic Vet Med Soc.* 1991;42:30–4.
217. Raymond L. Jacobson. *Leishmania tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) – a perplexing parasite. *FOLIA PARASITOLOGICA* 50: 241–250, 2003