

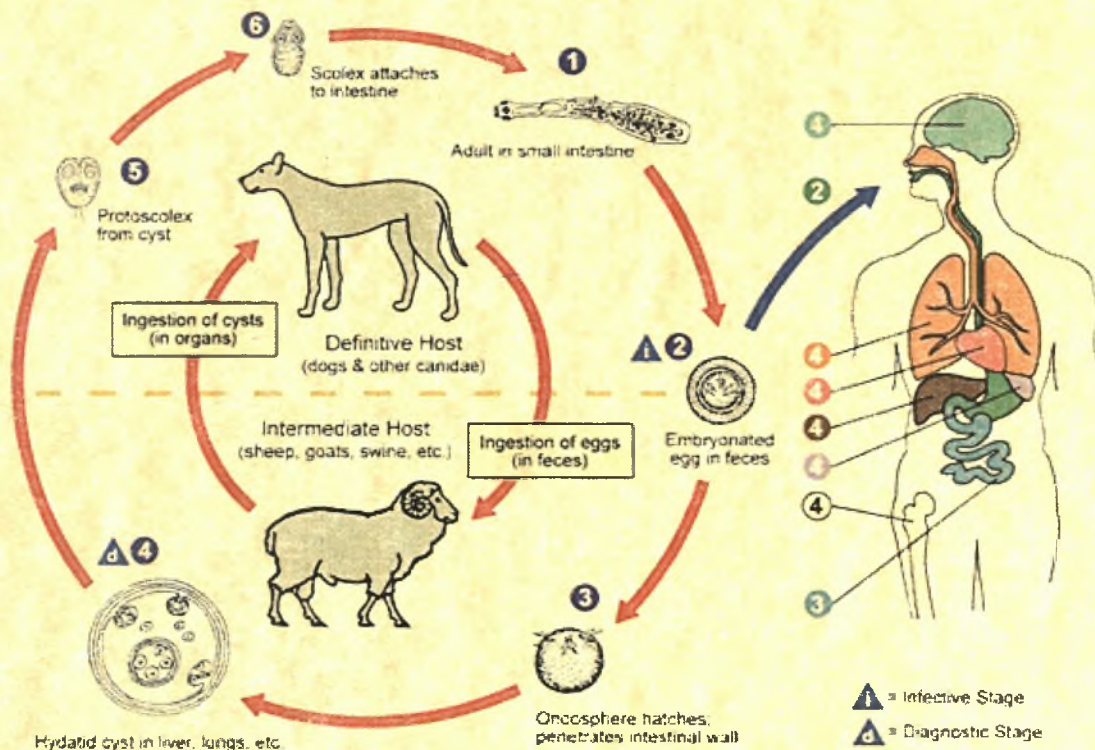


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΛΙΩΡΑ ΑΓΟΡΙΤΣΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ
ECHINOCOCCUS GRANULOSUS
ΣΕ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ, ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ
ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΙΤΑΛΙΑΣ, ΤΗΣ ΣΛΟΒΑΚΙΑΣ, ΤΗΣ
ΑΡΓΕΝΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑΣ



ΛΑΡΙΣΑ, 2006

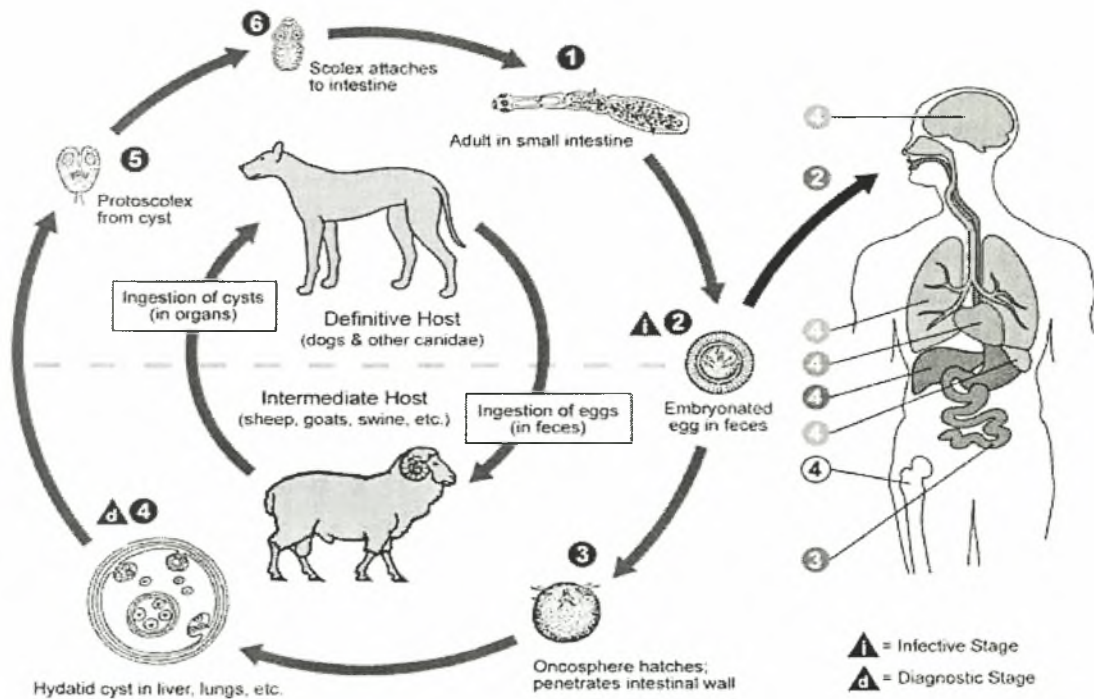


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΛΙΩΡΑ ΑΓΟΡΙΤΣΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ
ECHINOCOCCUS GRANULOSUS
ΣΕ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ, ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ
ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΙΤΑΛΙΑΣ, ΤΗΣ ΣΛΟΒΑΚΙΑΣ, ΤΗΣ
ΑΡΓΕΝΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑΣ



ΛΑΡΙΣΑ, 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4727/1
Ημερ. Εισ.: 28-02-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΚΑΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087836

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος
Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. D' Amelio Stefano
Επίκουρος καθηγητής. Ερευνητής του τμήματος Παρασιτολογίας του Πανεπιστημίου "La Sapienza" της Ρώμης
3. Μαμούρης Ζήσης
Αναπληρωτής καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Dr. Stefano D' Amelio στο τμήμα Παρασιτολογίας του Πανεπιστημίου "La Sapienza" της Ρώμης (Università degli Studi di Roma "La Sapienza", 1a facoltà di Medicina e Chirurgia, Istituto delle Scienze di Sanità Pubblica "Giorgio Sanarelli", Dipartimento di Parassitologia) στα πλαίσια του προγράμματος ανταλλαγής φοιτητών Erasmus.

Για το λόγο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο τον κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο πρόγραμμα αυτό με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, όσο και τον κ. D'Amelio Stefano, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, στο οποίο πραγματοποίησα το πειραματικό μέρος της εργασίας.

Τέλος, ήταν ιδιαίτερα σημαντική η καθοδήγηση και βοήθεια κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, των υπολοίπων μελών του εργαστηρίου: Busi Marina, Dicerbo Laura και Latrofa Stefania, καθώς και η υλική και ηθική υποστήριξη της οικογένειάς μου κατά την πραγματοποίηση και συγγραφή της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1. Κατάταξη του γένους <i>Echinococcus</i>	8
1.2. <i>Echinococcus granulosus</i> : βιολογικός κύκλος.....	9
1.3. Ενδοειδική ποικιλομορφία στελεχών.....	13
1.3.1. Καθορισμός στελέχους.....	13
1.3.2. Ξενιστές και γεωγραφική κατανομή.....	14
1.3.3. Θεωρίες για την προέλευση της ενδοειδικής ποικιλομορφίας.....	17
1.4. Χαρακτηρισμός των διαφόρων στελεχών.....	19
1.4.1. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν.....	19
1.4.1.1. Εξωγενή κριτήρια.....	21
1.4.1.2. Ενδογενή κριτήρια.....	21
1.5. Επιδημιολογία της νόσου.....	25
1.5.1. Αιτίες μόλυνσης.....	26
1.5.2. Εξέλιξη και διάγνωση της νόσου.....	26
1.5.3. Αντιμετώπιση της νόσου.....	30
1.5.4. Πρόληψη της νόσου.....	32
1.6. Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	33
2. Υλικά και μέθοδοι.....	34
2.1. Δείγματα που εξετάστηκαν.....	34
2.2. Απομόνωση DNA.....	36
2.3. Ενίσχυση μέσω PCR.....	37
2.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	37
2.3.2. Αντίδραση της ενίσχυσης.....	38
2.4. Ηλεκτροφόρηση.....	41
2.5. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	42
2.6. Αλληλούχιση και ανάλυση των στοιχείων.....	43
3. Αποτελέσματα.....	44
3.1. Γενετική ενίσχυση με τη βοήθεια PCR.....	44
3.2. Ανάλυση των αλληλουχιών.....	45
3.3. Προσδιορισμός των γενοτύπων του <i>E. granulosus</i>	48
3.4. Φαινοτυπικές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ατόμων.....	50
3.5. Γενετικές αποστάσεις.....	53
3.6. Γενετική ροή.....	54
4. Συζήτηση και συμπεράσματα.....	56
5. Βιβλιογραφία.....	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εχينوκοκκίαση είναι μια παρασιτική λοίμωξη του ανθρώπου, διαδεδομένη παγκοσμίως, που προκαλείται από σκώληκες του γένους *Echinococcus*, που περιλαμβάνει τα είδη *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* και *E. vogeli*. Ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί αν καταπιεί κατά λάθος τα αυγά του παρασίτου, που διασκορπίζονται στο περιβάλλον με τα κόπρανα του σκύλου, που είναι ο πιο κοινός κύριος ξενιστής. Οι ενδιάμεσοι ξενιστές είναι κυρίως πρόβατα, βοοειδή και χοίροι. Η διάγνωση της νόσου είναι δύσκολη γιατί είναι συνήθως ασυμπτωματική και ανακαλύπτεται τυχαία. Η θεραπεία είναι στις περισσότερες των περιπτώσεων η χειρουργική αντιμετώπιση.

Η παρούσα εργασία αφορά το είδος *Echinococcus granulosus*, που περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό γενετικά διακριτών στελεχών, που διαφέρουν ως προς τον ενδιάμεσο ξενιστή, τη γεωγραφική κατανομή και τη μολυσματικότητα για τον άνθρωπο. Ο ακριβής προσδιορισμός των στελεχών είναι απαραίτητος την καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας της νόσου και για το σχεδιασμό αποτελεσματικών προγραμμάτων ελέγχου. Για το λόγο αυτό συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν μολυσμένα δείγματα από διάφορες περιοχές της Ιταλίας, της Σλοβακίας, της Πορτογαλίας και της Αργεντινής. Ο βαθμός της γενετικής ποικιλομορφίας εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της ανάλυσης των γονιδίων CO1 και ND1, που έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και δίνουν σημαντικές πληροφορίες σε φυλογενετικές μελέτες. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν απομόνωση DNA, ενίσχυση μέσω PCR, ηλεκτροφόρηση και αλληλούχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και καθορίστηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη του είδους *E. granulosus*: G1, G2, G3 και G7. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα, υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις μέσα σε κάθε στέλεχος, αλλά και μεταξύ των στελεχών και η γενετική ροή. Όπως ήταν αναμενόμενο, το στέλεχος G1 ήταν το πιο κοινό, βρέθηκαν όμως και αρκετές περιπτώσεις G3, σε περιοχές που θεωρητικά δεν υπήρχε. Επίσης βρέθηκε ότι τα στελέχη G1 και G3 δε διαφέρουν σαφώς όπως συμβαίνει μεταξύ αυτών και του G7. Το στέλεχος G7 παρουσιάζει τιμές γενετικής διαφοροποίησης πιο ψηλές σε σύγκριση με τα άλλα στελέχη που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή, πιστοποιώντας έτσι τη διαφορετικότητά του.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εχينوκοκκίαση ή υδατιδική νόσος είναι μια ζωνόσος, γνωστή στην Ελλάδα από την αρχαιότητα, από τον Ιπποκράτη (460-370πΧ), (Hosemann, 1928; Safioleas *et al.*, 2004). Είναι παρασιτική λοίμωξη του ανθρώπου, διαδεδομένη παγκοσμίως, με μεγάλη ιατρική, κτηνιατρική και οικονομική σπουδαιότητα (Jenkins *et al.*, 2005). Προκαλείται από το προνυμφικό στάδιο κεστωδών σκωλήκων του γένους *Echinococcus*, που περιλαμβάνει τα είδη *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* και *E. vogeli* (Ράπτης, 1998) και ενδημεί σε κτηνοτροφικές χώρες με κακή υγειονομική υποδομή και εύκρατο κλίμα.

Συνήθως ο άνθρωπος μολύνεται κατά την παιδική ηλικία, ιδίως σε αγροτικές περιοχές, αλλά η νόσος εκδηλώνεται σε μεγαλύτερες ηλικίες. Σε ένα ποσοστό 2.4% η εχينوκοκκίαση διαγιγνώσκεται στην πρώτη δεκαετία της ζωής και σε ποσοστό 11.7% μέχρι την ηλικία των 18 ετών (Σμπαρούνης, 1990). Ωστόσο, σε όλες τις ηλικίες, στις γυναίκες είναι πιο συχνή η εχينوκοκκίαση του ήπατος, ενώ στους άντρες του πνεύμονα (Karpathios *et al.*, 1985; Matsaniotis *et al.*, 1983).

Η ανθρώπινη εχينوκοκκίαση, που προκαλείται από τον *E. granulosus*, είναι πιο συχνή στις κτηνοτροφικές χώρες, επειδή οι πιο εκτεθειμένοι σκύλοι είναι χωρίς αμφιβολία εκείνοι των βοσκών, δεδομένης της επικίνδυνης συνήθειάς τους να σφάζουν τα ζώα χωρίς κτηνιατρικό έλεγχο και να ταΐζουν τους σκύλους με εντόσθια, που πιθανώς είναι μολυσμένα με υδατίδες κύστες. Αυτό ίσχυε ιδιαίτερα στις δεκαετίες του '70 και του '80 στην Ιταλία, κυρίως στο Abruzzo (Lorenzini και Ruggieri, 1987) και στη Σαρδηνία. Ευτυχώς, μετά τη δημιουργία προγραμμάτων ελέγχου και μετά τη σωστή ενημέρωση των κτηνοτρόφων μειώθηκε η διάδοση της εχينوκοκκίασης, αλλά δεν εξαλείφθηκε, παραμένοντας κατά συνέπεια μια ζωνόσος μεγάλης σπουδαιότητας. Σήμερα, η μόνη αποτελεσματική θεραπεία για τον άνθρωπο είναι η χειρουργική αντιμετώπιση, ακολουθούμενη από χημειοθεραπεία, η οποία χρησιμοποιείται προκειμένου να αποτραπεί μια νέα μόλυνση, οφειλόμενη σε πιθανή ρήξη της κύστης κατά τη διάρκεια της εγχείρησης. Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται επίσης, προκειμένου να αποτραπεί η εξέλιξη της νόσου σε περιπτώσεις που δεν μπορούν να χειρουργηθούν.

Δεδομένης λοιπόν της σπουδαιότητας της νόσου, οι έρευνες κατευθύνονται στη δημιουργία κατάλληλων εμβολίων, πιο αποτελεσματικών διαγνωστικών τεχνικών και καλύτερων φαρμάκων. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι το είδος *Echinococcus granulosus* περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό γενετικά διακριτών στελεχών. Αυτά διαφέρουν ως προς τον ενδιάμεσο ξενιστή, τη γεωγραφική κατανομή και τη μολυσματικότητα για τον άνθρωπο. Ο ακριβής προσδιορισμός των στελεχών

αποτελεί μια θεμελιώδη απαίτηση για την καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας της νόσου και για το σχεδιασμό αποτελεσματικών προγραμμάτων ελέγχου.

Μετά από ένα περιστατικό στην Αθήνα, στο οποίο βρέθηκαν 7 από τα 11 μέλη μιας οικογένειας μολυσμένα από τον *E. granulosus*, 5 από τα οποία εγχειρίστηκαν, τέθηκε το ερώτημα αν η εχينوκοκκίαση έχει γενετική βάση. Παρόλ' αυτά, αποδείχθηκε ότι η μετάδοση της νόσου ανάμεσα στα μέλη μιας οικογένειας είναι σπάνια (Musio και Linos, 1989).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να ταυτοποιηθούν γενετικά διάφορα δείγματα *E. granulosus*, που συλλέχθηκαν κατά το παρελθόν, αλλά και κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησής της, από διάφορες περιοχές της Ιταλίας, της Σλοβακίας, της Πορτογαλίας και της Αργεντινής. Χρησιμοποιήθηκαν γενετικές και μοριακές τεχνικές, καθώς η μορφολογία, που αποτελεί μια μέθοδο ταυτοποίησης των παρασίτων, δεν μπορεί να είναι ακριβής στην ταυτοποίηση των διαφόρων στελεχών (Hobbs *et al.*, 1990; Bowles και McManus, 1993c). Παλαιότερα, πριν την ανακάλυψη των μοριακών τεχνικών, χρησιμοποιούνταν βιοχημικές τεχνικές, που περιελάμβαναν ανάλυση των ισοενζύμων (Lymbery και Thompson, 1988; Bowles και McManus, 1993c).

Ο βαθμός της γενετικής ποικιλομορφίας εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της ανάλυσης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών περιοχών του γονιδιώματος, και πιο συγκεκριμένα του γονιδίου του μιτοχονδριακού DNA που κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO1) και εκείνου που κωδικοποιεί την αφυδρογονάση 1 του NADH (ND1). Αυτές οι περιοχές έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και δίνουν σημαντικές πληροφορίες σε φυλογενετικές μελέτες. Ειδικότερα, αναλύθηκαν οι πολυμορφισμοί των νουκλεοτιδικών αυτών αλληλουχιών, με σκοπό να βρεθούν πιθανές διαφορές, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των στελεχών.

1.1. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *ECHINOCOCCUS* (Rudolphi, 1801)

Υπερβασιλείο: *Eukaryota*

Βασιλείο: *Animalia*

Υποβασιλείο: *Metazoa*

Συνομοταξία: *Platyhelminthes*

Εύκαμπτο σώμα, τριπλοβλαστικοί. Εξομαλυσμένα ραχιαίο-κοιλιακά με κυψελοειδή εξωτερική κάλυψη. Απεκκριτικό σύστημα πρωτονεφριδιακό.

Ομοταξία: *Cestoda*

Ενδοπαράσιτα, χωρίς έντερο. Εξωτερικό σώμα που καλύπτει έναν συγκυτιακό υμένα επιβίωσης με μικρολάχνες.

Υποομοταξία: *Eucestoda*

Κεστοειδείς σκώληκες. Ενήλικοι με το χαρακτηριστικά επιμηκυμένο σώμα που αποτελείται από τα γραμμικά σύνολα αναπαραγωγικών οργάνων (προγλωττίδες). Ερμαφρόδιτοι με έμμεσους κύκλους ζωής.

Τάξη: *Cyclophyllidea*

Σκώληκες με τέσσερις μυϊκές παραφυάδες και ένα ρύγχος που οπλίζεται συνήθως με άγκιστρα. Το σώμα αποτελείται από προγλωττίδες σε διάφορα στάδια ανάπτυξης και κάθε προγλωττίδα σαφώς οριοθετημένη με εξωτερική αυλάκωση. Αυγά κυκλικά, όχι επικαλυμμένα, που περιέχουν μη τριχοφόρες ογκόσφαιρες με έξι άγκιστρα.

Οικογένεια: *Taeniidae*

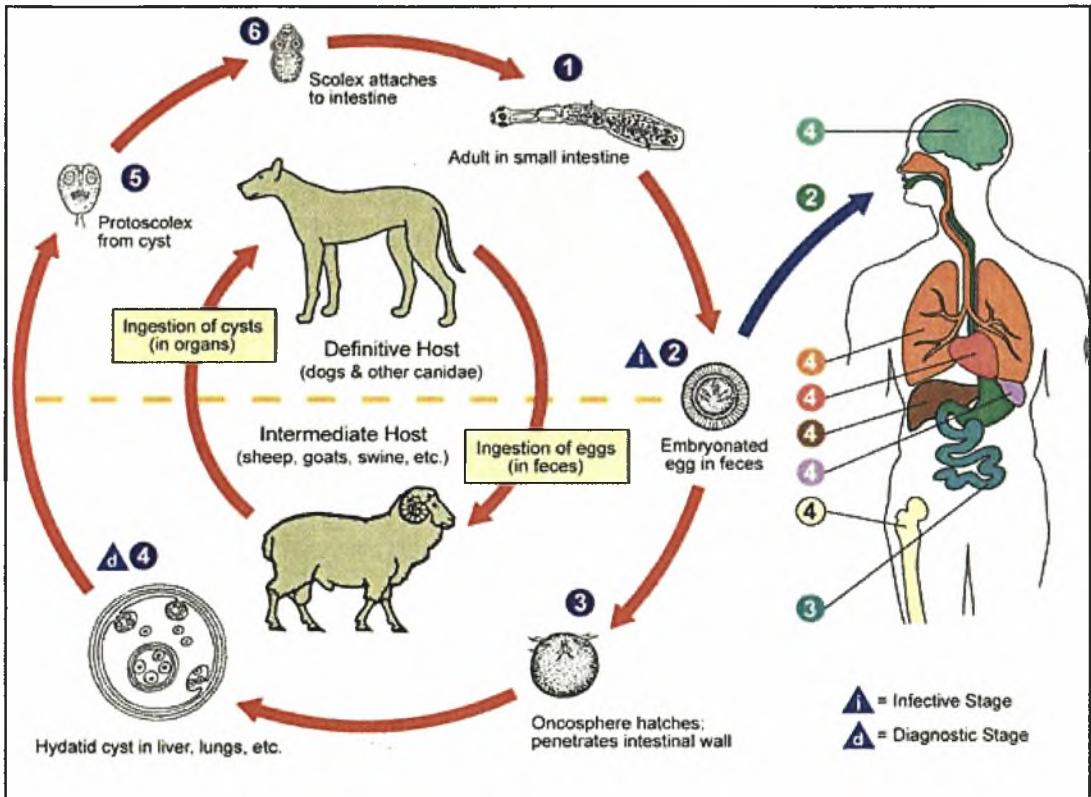
Ενήλικοι στο λεπτό έντερο των σαρκοφάγων και του ανθρώπου. Ενδιάμεσοι ξενιστές, όλοι θηλασικά. Σκώληκες με ρύγχος, που οπλίζεται συνήθως με διπλή σειρά αγκίστρων. Αυγά με ακτινωτό αυλακωτό σκληρό κέλυφος.

Γένος: *Echinococcus*

Ο *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) είναι ένα από τα τέσσερα είδη, που περιλαμβάνονται στο γένος *Echinococcus*, τα άλλα τρία είναι *E. multilocularis* (Leuckart, 1863), *E. oligarthrus* (Diesing, 1863) και *E. vogeli* (Rausch και Bernstein, 1972). Διακρίνονται μεταξύ τους λόγω γεωγραφικής κατανομής, ξενιστή, προνομφικής μορφής (τύπος και εντοπισμός) και διαφορετικών χαρακτηριστικών της ενήλικης μορφής.

1.2. ECHINOCOCCUS GRANULOSUS: ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο βιολογικός κύκλος του *E. granulosus* απαιτεί δύο ξενιστές προκειμένου να ολοκληρωθεί, έναν κύριο και έναν ενδιάμεσο (Εικ.1).



Εικόνα 1: Βιολογικός κύκλος του *E. granulosus* (Centre for Disease Control. www.cdc.it). Ο ενήλικας *E. granulosus* ① κατοικεί στο λεπτό έντερο των κύριων ξενιστών. Οι κυοφορούσες προγλωττίδες απελευθερώνουν αυγά ② που περνούν στα κόπρανα. Μετά την κατάποσή τους από ενδιάμεσο ξενιστή, εκκολάπτονται στο λεπτό έντερο και απελευθερώνουν ογκόσφαιρες ③ που διαπερνούν το εντερικό τοίχωμα και μεταναστεύουν μέσω του κυκλοφορικού συστήματος στα διάφορα όργανα, στα οποία δημιουργούν κύστεις ④ που μεγαλώνουν σταδιακά παράγοντας πρωτοσκώληκες και θυγατρικές κύστεις που γεμίζουν το περιεχόμενο της κύστης. Ο κύριος ξενιστής μολύνεται καταπίνοντας μολυσμένα όργανα του ενδιάμεσου ξενιστή. Μετά την κατάποση, οι πρωτοσκώληκες ⑤ προσκολλώνται στον εντερικό βλεννογόνο ⑥ και μετατρέπονται σε ενήλικες ① σε 32 με 80 ημέρες. Οι άνθρωποι μολύνονται καταπίνοντας αυγά ②, με επακόλουθη απελευθέρωση ογκοσφαιρών ③ στο έντερο και ανάπτυξη κύστεων ④, ④, ④, ④, ④, ④ σε διάφορα όργανα.

Ο μήκος 5mm ενήλικας σκώλικας του *E. granulosus* ενοικεί στη νήστιδα του σκύλου (κύριος ξενιστής), όπου ζει για 5-20 μήνες. Αποτελείται από σκληροκεφαλή, αυχένα και τρεις προγλωττίδες: μία άωρη, μία ώριμη και μία κυοφορούσα (Εικ.2).



Εικόνα 2: Ενήλικας του *E. granulosus* (www.2.mf.nhi.lj.si/mil/helm1/jpeg/4b3.jpg). Διακρίνονται οι τρεις προγλωττίδες: άωρη, ώριμη και κυοφορούσα.

Η τελευταία απελευθερώνει εμβρυοφόρα αυγά (διαμέτρου 34x28μm), με τρία ζεύγη ακκίστρων (Morseth, 1965; Sakamoto, 1981; Swiderski, 1982), (Εικ.3), που περιβάλλονται από μία σειρά μεμβρανών.

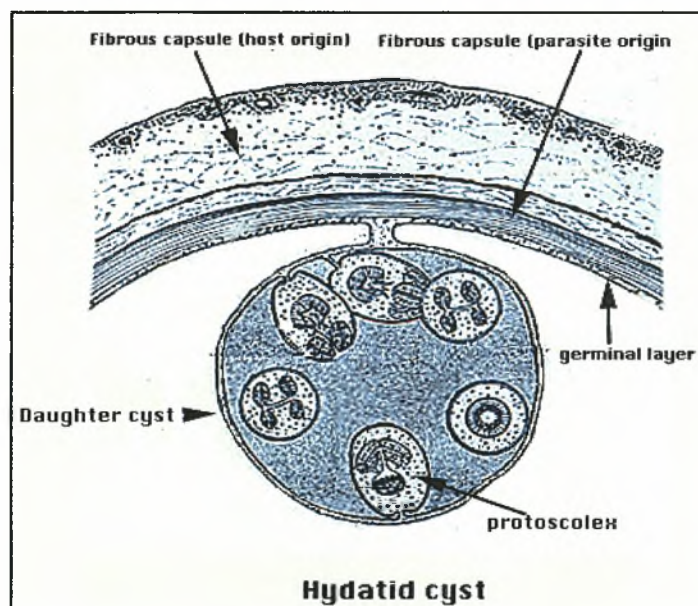


Εικόνα 3: Αυγό του *E. granulosus* (www.biosci.ohio-state.edu/.../echinococcus-egg-1.gif)

Η πιο εξωτερική χάνεται πριν απελευθερωθεί το αυγό από την προγλωττίδα και είναι αυτή που το προστατεύει, καθώς είναι πολύ ανθεκτική και αδιαπέραστη (Gemmel και Lawson, 1986). Τα αυγά αυτά αποβάλλονται με τα κόπρανα του σκύλου και είναι ανθεκτικά στο περιβάλλον, εκτός από τις πολύ υψηλές θερμοκρασίες, στις οποίες δεν αντέχουν πάνω από δύο ώρες. Όταν καταποθούν από ενδιάμεσο ξενιστή (άνθρωπο, βοοειδή, πρόβατο, χοίρο, ίππο), φτάνουν στο στομάχι και μετά στο δωδεκαδάκτυλο, όπου με την επίδραση διαφόρων ενζύμων

εκκολάπτονται, διασπάται το κέλυφος και τα έμβρυα που απελευθερώνονται (ογκόσφαιρες) διαπερνούν τον εντερικό βλεννογόνο και μέσω της πυλαίας (Smyth, 1969a) φθάνουν αρχικά στον πρώτο σταθμό, το ήπαρ, στο οποίο εντοπίζονται στις περισσότερες των περιπτώσεων, και μετά, στην περίπτωση που τα έμβρυα περάσουν τα τριχοειδή της πυλαίας, μέσω της κάτω κοίλης φλέβας καταλήγουν στον επόμενο σταθμό, τον οποίον αποτελούν τα τριχοειδή του πνεύμονα (στον άνθρωπο το 80-95% των υδατίδων εντοπίζονται σε αυτά τα δύο όργανα). Αν δεν εγκατασταθούν στον πνεύμονα, τότε με την αρτηριακή κυκλοφορία μπορούν να εγκατασταθούν σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος, σε άλλα όργανα και ιστούς, και να δημιουργήσουν κύστες (Lethbridge, 1980 Fairweather και Threadgold, 1981; Σέχας, 1996). Εκεί εξακολουθούν να αναπτύσσονται βραδέως και τελικά δημιουργείται κύστη γεμάτη με υγρό (υδατίδα κύστη), (Εικ.4).

Στατιστικά, κατά σειρά συχνότητας της εντόπισης, η εχينوκοκκίαση ανευρίσκεται στο ήπαρ (70-75%), στους πνεύμονες (20-25%) και στα υπόλοιπα όργανα (5%). Έχει παρατηρηθεί συνύπαρξη εχينوκοκκίασης ήπατος-πνεύμονα (25%) και πνεύμονα-ήπατος (40%), ενώ στο 1/4 των περιπτώσεων, όταν η κύστη αποπιτανώνεται (επασβεστώνεται), τα παράσιτα καταστρέφονται και δεν απαιτείται περαιτέρω θεραπεία. Όταν η νόσος εντοπίζεται στο ήπαρ, το 80% περίπου αφορά το δεξιό λοβό και συνηθέστερα την πρόσθια άνω επιφάνεια. Συνήθως οι κύστες είναι μονήρεις, ενώ στο 25-30% των περιπτώσεων υπάρχουν δύο ή περισσότερες στον ίδιο λοβό και σπανιότερα και στον άλλον. Οι διαστάσεις κυμαίνονται από 2-4cm μέχρι και 30-50cm (Σέχας, 1996).

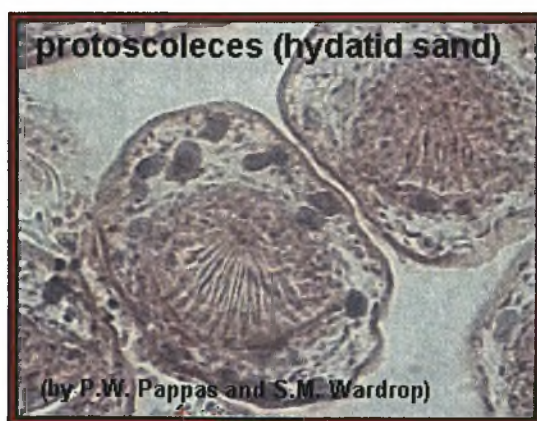


Εικόνα 4: Υδατίδα κύστη (www.cal.nbc.upum.edu/paralab/labs/hydatid1.gif)

Η εχινόκοκκος κύστη μεγαθύνεται σταδιακά 2-3cm κατ' έτος, ανάλογα με το όργανο στο οποίο έχει εγκατασταθεί. Όταν η κύστη φθάσει σε μέγεθος 1cm το

τοίχωμά της διαφοροποιείται και επαλείφεται εσωτερικά μεν από τη μητρική μεμβράνη ή κάψα, που αποτελείται από την εξωτερική και την εσωτερική (ή γονιμοποιό ή βλαστική) μεμβράνη, εξωτερικά δε περιβάλλεται από παχιά αφοριστική μεμβράνη από συνδετικό ιστό (ινώδης κάψα), που είναι προσκολλημένη σταθερά στο όργανο, στο οποίο έχει αναπτυχθεί η κύστη. Εσωτερικά, υπάρχει το υγρό της εχινόκοκκου κύστης, που δεν έχει διαπυκνωθεί, είναι άφθονο και διαυγές, δίνει το όνομα της «υδατιδικής κύστης» και περιέχει σκώληκες και σκωληκοκεφαλές, που προέρχονται από τις θυγατρικές κύστεις (Σέχας, 1996).

Καθώς η κύστη αναπτύσσεται, βλαστάνουν προς το εσωτερικό της προσεκβολές από μάζες κυττάρων που περιβάλλονται και οι ίδιες από τη βλαστική μεμβράνη, από την οποία παράγονται νέες προνύμφες, οι πρωτοσκώληκες, που μοιάζουν με τη σκωληκοκεφαλή του ενήλικου σκώληκα. Οι πρωτοσκώληκες αυτοί μπορούν να ακολουθήσουν δύο δρόμους. Αν αφενός υπάρξει ρήξη μιας κύστης στον ενδιάμεσο ξενιστή, κάθε πρωτοσκώληκας έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιηθεί σε μία νέα κύστη, προκαλώντας έτσι μια δευτερεύουσα εχινόκοκκίαση. Αν αφετέρου οι πρωτοσκώληκες βρεθούν στο έντερο του κύριου ξενιστή, γεγονός που συμβαίνει όταν αυτός φάει ιστούς από πρόβατο ή βοοειδή μολυσμένους με κύστεις, οι οποίες θα διασπαστούν κατά τη διαδικασία της πέψης στο στομάχι, θα ελευθερώσουν τους πρωτοσκώληκες κι αυτοί θα εξελιχθούν σε ώριμους σκώληκες (Smyth, 1969a). Θυγατρικές κύστεις παράγονται επίσης από το βλαστικό επιθήλιο που προβάλλουν επί τα εντός ή επί τα εκτός της αφοριστικής μεμβράνης, ανάλογα με το είδος του παράσιτου. Οι θυγατρικές κύστεις είναι μικρογραφία της υδατίδας, περιβάλλονται κι αυτές από εξωτερική αφοριστική μεμβράνη και παράγουν πρωτοσκώληκες. Με την πάροδο του χρόνου, οι βλαστικές προσεκβολές και οι θυγατρικές κύστεις κατακερματίζονται, ώστε υδατίδες που υπάρχουν επί αρκετό χρόνο να περιέχουν κοκκώδες περιεχόμενο (υδατιδική άμμος, Εικ.5) που συνίσταται από πρωτοσκώληκες, θυγατρικές κύστεις και άμορφα υλικά.



Εικόνα 5: Πρωτοσκώληκες, υδατιδική άμμος (www.biosci.ohio-state.edu/parasite/echinococcus.html)

Οι υδατίδες κύστες αναπτύσσονται βραδέως (περίπου 1-4 cm), ώστε σε μερικά χρόνια το περιεχόμενό τους να είναι πολλά λίτρα. Ο βιολογικός κύκλος που περιγράφηκε πιο πάνω ονομάζεται ποιμενικός και οι ενδιάμεσοι ξενιστές είναι κυρίως χορτοφάγα ζώα, στους ιστούς των οποίων αναπτύσσονται μονόχωρες υδατίδες κύστες. Ο πιο σημαντικός από τους ενδιάμεσους ξενιστές είναι το πρόβατο, αλλά σε μερικές περιοχές ο *E. granulosus* είναι συχνό παράσιτο των αιγών, χοίρων, βοοειδών, ίππων και καμήλου (Ράπτης, 1998).



Εικόνα 6: Λεπτό έντερο του σκύλου με ενήλικες εχινόκοκκους (λευκοί), (F. Rochette, 1999).

1.3. ΕΝΔΟΕΙΔΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

1.3.1. Καθορισμός στελέχους

Η ταξινόμηση εντός του γένους *Echinococcus* ήταν αμφισβητούμενη για πολλά χρόνια, ώσπου έγιναν αποδεκτά τέσσερα είδη. Σύμφωνα με τον Διεθνή Κώδικα της Ζωικής Ονοματολογίας, υπάρχει μόνο μια κατηγορία κάτω από αυτή του είδους, το υποείδος, που όμως δεν θεωρείται έγκυρη για κάποιους πληθυσμούς του *E. granulosus*. Επομένως, για αυτούς έχει καθιερωθεί ο νέος άτυπος όρος του στελέχους (Smyth και Smyth, 1964; Rausch, 1967a), με τον οποίο φαίνεται η ενδοειδική ποικιλομορφία (Thompson, 1986). Ένας ορισμός έχει δοθεί από τους Thompson και Lymbery (1988): "ένα στέλεχος του *Echinococcus granulosus* είναι μία ομάδα ατόμων που διαφέρει στατιστικά από άλλες ομάδες του ίδιου είδους στις γενετικές συχνότητες και σε ένα ή περισσότερα γενετικά καθορισμένα

χαρακτηριστικά, πιθανής ή πραγματικής σημασίας για την επιδημιολογία και τον έλεγχο της νόσου". Επομένως αυτός ο όρος δεν είναι ούτε μια εξελικτική μονάδα, ούτε μια ταξινομική κατηγορία, είναι ίσως ο πρακτικότερος τρόπος διαχωρισμού διαφορετικών ατόμων, που ανήκουν όλα στο ίδιο είδος.

1.3.2. Ξενιστές και γεωγραφική κατανομή

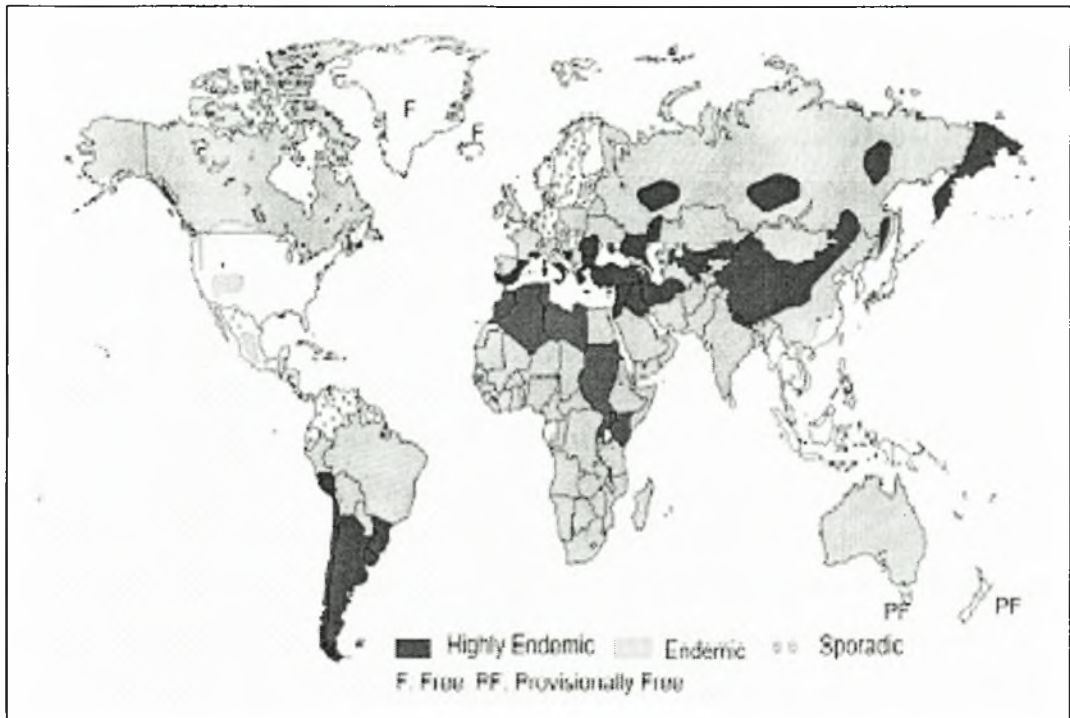
Με τη βοήθεια διαφόρων κριτηρίων χαρακτηρίστηκαν εννέα στελέχη παρόντα στο είδος *Echinococcus granulosus* (Πίν.1)

Πίνακας 1: Στελέχη του *Echinococcus granulosus*, κύριοι και ενδιάμεσοι ξενιστές, γεωγραφική κατανομή και μολυσματικότητα για τον άνθρωπο (Thompson *et al.*, 1995; Thompson και McManus, 2002; Lavikainen *et al.*, 2003)).

ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ	ΚΥΡΙΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ	ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ
G1 (sheep strain)	πρόβατο, χοίρος, αίγα, βοοειδή, καμήλα, καγκουρό	σκύλος, αλεπού, ντίγκο, τσακάλι, ύαινα	Ευρώπη, Αμερική, Αφρική, Ασία, Αυστραλία	ναι
G2 (Tasmanian sheep strain)	πρόβατο, βοοειδή?	σκύλος, αλεπού	Τασμανία, Αργεντινή	ναι
G3 (Buffalo strain)	βουβάλι, βοοειδή?	σκύλος, αλεπού?	Ασία	?
G4 (Horse strain)	ίππος	σκύλος	Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Νότια Αφρική	όχι
G5 (Cattle strain)	βοοειδή	σκύλος	Ευρώπη, Νότια Αφρική, Ινδία, Σρι Λάνκα, Ρωσία, Νότια Αμερική	ναι
G6 (Camel strain)	καμήλα, αίγα, βοοειδή?	σκύλος	Αφρική, Κίνα, Αργεντινή, Μέση Ανατολή	ναι
G7 (Pig strain)	χοίρος	σκύλος	Ευρώπη, Ρωσία, Νότια Αμερική	ναι ?
G8 (Cervid strain)	ελάφι	λύκος, σκύλος	Βόρεια Αμερική, Ευρασία	ναι
G9? (Lion strain)	ζέβρα, γκνου, αντιλόπη, βουβάλι, καμηλοπάρδαλη?, ιπποπόταμος?	λιοντάρι	Αφρική	?
G10? (Fennoscandian cervid strain)	ελάφι	αλεπού	Αφρική, Σκανδιναβία	?

G1 - στέλεχος προβάτων

Αυτό το στέλεχος είναι σίγουρα το πιο κοινό και σημαντικό. Βρίσκεται σε όλες εκείνες τις γεωγραφικές περιοχές, όπου το παράσιτο είναι ενδημικό (Εικ.7).



Εικόνα 7: Γεωγραφική κατανομή του *E. granulosus* (Eckert *et al.*, 1999).

Σε αυτές τις χώρες, η κτηνοτροφία είναι πολύ διαδεδομένη και οι λάθος μέθοδοι εκτροφής από τον άνθρωπο είναι αυτές που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και διαίωνιση του κύκλου του παρασίτου (Garipra, 2004). Ο μοριακός χαρακτηρισμός του μιτοχονδριακού και ριβοσωμικού DNA έχει επιβεβαιώσει τη γενετική ομοιομορφία αυτού του στελέχους σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές, στις οποίες έχει μελετηθεί (McManus και Rishi, 1989; Bowles *et al.*, 1992; Bowles και McManus, 1993a,b,c). Επιπλέον έχει καταδειχθεί η μορφολογική και βιολογική διαφοροποίηση από άλλα στελέχη (Thompson, 1986; Eckert και Thompson, 1988; Thompson και Lymbery, 1988,1991; Thompson *et al.*, 1995).

G2 - στέλεχος τασμανικών προβάτων

Οι μορφολογικές, βιολογικές και μοριακές μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα από την Τασμανία, προτείνουν ότι αυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα στέλεχος που περιλαμβάνει μόνο πρόβατα σαν ενδιάμεσους ξενιστές και σκύλους (ίσως και αλεπούδες) σαν κύριους ξενιστές (Thompson *et al.*, 1995).

G3 - στέλεχος βουβάλων

Τα βουβάλια διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο σαν ενδιάμεσοι ξενιστές του *E. granulosus* σε πολλές περιοχές της Ασίας, ειδικά στην Ινδία. Πρέπει,

παρόλ' αυτά να καθοριστεί εάν το στέλεχος G3 είναι πραγματικά ένα στέλεχος που διακρίνεται από το G1 ή αποτελεί απλά μια ποικιλία του (Bowles *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1995).

G4 - στέλεχος ίππων

Αυτό το στέλεχος είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην Αγγλία, όπου χρησιμοποιεί αποκλειστικά ίππους σαν ενδιάμεσους ξενιστές και σκύλους σαν κύριους ξενιστές. Έχει δειχθεί η μορφολογική (Kumaratilake *et al.*, 1986) και γενετική (Bowles *et al.*, 1992; Bowles και McManus, 1993a,c) ομοιομορφία των δειγμάτων προερχομένων από Αγγλία, Νότια Αφρική και Νέα Ζηλανδία.

G5 - στέλεχος βοοειδών

Αυτή η ομάδα διαφοροποιείται σαφώς από τις άλλες στη μορφολογία και σε βιολογικά χαρακτηριστικά (Thompson *et al.*, 1984; Eckert και Thompson, 1988; Worbes, 1992). Για παράδειγμα, το στέλεχος αυτό έχει μια πρόωρη ανάπτυξη στο μοναδικό κύριο ξενιστή, το σκύλο, που διαρκεί στην πραγματικότητα μόνο 33-35 ημέρες. Ο χαρακτηρισμός του ως στέλεχος έχει επιβεβαιωθεί επίσης σε γενετικό επίπεδο (Bowles *et al.*, 1992; Bowles και McManus, 1993a,c; Siles-Lucas *et al.*, 1994).

G6 - στέλεχος καμηλών

Η καμήλα είναι ένας σημαντικός ενδιάμεσος ξενιστής του *E. granulosus* στην Αφρική, την Κίνα, την Αργεντινή και τη Μέση Ανατολή σε έναν κύκλο που περιλαμβάνει σκύλους σαν κύριους ξενιστές (Eckert *et al.*, 1989). Γενετικές μελέτες έχουν καθορίσει το χαρακτηρισμό του στελέχους και τη διαφοροποίησή του από τα G1 και G5 (Thompson και Lymbery, 1991; Bowles *et al.*, 1992; Bowles και McManus, 1993a,c; Wachira *et al.*, 1993).

G7 - στέλεχος χοίρων

Αυτό το στέλεχος χρησιμοποιεί έναν κύκλο σκύλος/χοίρος σε πολλές περιοχές της κεντρικής και ανατολικής Ευρώπης, στη Ρωσία και στο Μεξικό. Μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν στη Σλοβακία, Βουλγαρία, Ουγγαρία, Γιουγκοσλαβία, Πολωνία και Ουκρανία, έχουν χαρακτηρίσει μορφολογικά το στέλεχος, που εμφανίζει χαρακτηριστικά επιδημιολογικής σημασίας, όπως μια ταχεία ανάπτυξη στους σκύλους και μία χαμηλή μολυσματικότητα για τον άνθρωπο (Eckert και Thompson, 1988; Shablovskaya *et al.*, 1989; Eckert *et al.*, 1993; Stefancikova και Dubinský, 1995). Η ενζυματική ανάλυση και η αλληλούχιση του μιτοχονδριακού DNA έχουν επιβεβαιώσει τη διαφοροποίηση της ομάδας και σε γενετικό επίπεδο (Bowles και McManus, 1993; Šnábel *et al.*, 2000; Turčeková *et al.*, 2003).

G8 - στέλεχος ελαφιών

Στα μέρη περισσότερο βόρεια της Αμερικής και της Ευρασίας έχει χαρακτηριστεί αυτό το στέλεχος, που περιλαμβάνει ελάφια και λύκους και είναι ουσιαστικά άγριου τύπου (Rausch, 1967a, b, 1986). Υπάρχουν στοιχεία ότι αυτή η μορφή χρησιμοποιεί έναν κύκλο σκύλος/τάρανδος στη Νορβηγία, Σουηδία και Φινλανδία (Eckert και Thompson, 1988; Stossel, 1989).

G9 – στέλεχος λιονταριών

Στην Αφρική κάτω από τη Σαχάρα υπάρχει μια μορφή του παρασίτου, που διακρίνεται από τις άλλες σε μορφολογικό και βιολογικό επίπεδο (Ostlepp, 1937; Graber και Thal, 1980). Ο κύκλος περιλαμβάνει μόνο σαρκοφάγα και ύαινες, τσακάλια, λιοντάρια και ζέβρες, γκνου και αντιλόπες. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η εμπλοκή των λιονταριών, δεδομένου ότι τα αιλουροειδή φυσιολογικά δε φιλοξενούν το παράσιτο (Thompson, 1979). Υπάρχει βέβαια ανάγκη για περαιτέρω μελέτες, ειδικά σε γενετικό επίπεδο, προκειμένου να γίνει αντιληπτό εάν αυτή η μορφή μπορεί να διακριθεί από τις άλλες, και κυρίως από την G8, και να διαμορφώσει επομένως ένα νέο στέλεχος.

1.3.3. Θεωρίες για την προέλευση της ενδοειδικής ποικιλομορφίας

Η μεγάλη ποικιλομορφία εντός του είδους *Echinococcus granulosus*, το οποίο περιέχει εννέα (ή περισσότερα) διαφορετικά στελέχη, έχει αναλυθεί με τη βοήθεια δύο διαφορετικών θεωριών.

Θεωρία των Smyth και Smyth (1964)

Με βάση αυτή τη θεωρία, το παράσιτο, που είναι ερμαφρόδιτο, αυτογονιμοποιείται και επομένως κάθε παρούσα μετάλλαξη στην ενήλικη μορφή μπορεί να διαβιβαστεί και στους ετεροζυγωτικούς και στους ομοζυγωτικούς απογόνους. Επιπλέον η προνομιακή μορφή αναπαράγεται με κλωνικό τρόπο στον ενδιάμεσο ξενιστή και επομένως από έναν μόνο μεταλλαγμένο απόγονο μπορεί να προκύψει ένας μεγάλος αριθμός γενετικά όμοιων ατόμων. Με αυτόν τον τρόπο, οι μεταλλάξεις μπορούν να εκφραστούν ακόμη κι όταν είναι υπολειπόμενες, και αν δεν υπάρξει αρνητική επιλογή στον ενδιάμεσο ξενιστή μπορούν να αυξηθούν σε μέγεθος. Ο κλώνος των μεταλλαγμένων ατόμων που θα προκύψει, μπορεί να καθοριστεί σαν ένα νέο στέλεχος, αν είναι αρκετά διαφορετικός από τον αρχικό πληθυσμό.

Θεωρία του Rausch (1967)

Ο Rausch διακρίνει δύο μορφές του *E. granulosus*, μια μορφή του Βορρά, (στέλεχος ελαφιών) που έχει μια αρκτική κατανομή, που χρησιμοποιεί σαν κύριους ξενιστές τους λύκους και σαν ενδιάμεσους αποκλειστικά άτομα που ανήκουν στην οικογένεια των ελαφιών, και μια ευρωπαϊκή μορφή που έχει μία παγκόσμια κατανομή και έναν κύκλο που περιλαμβάνει σκύλους και κατοικίδια ζώα. Σύμφωνα με τον Rausch (1973, 1985) υπάρχει στη μορφή του Βορρά μορφολογική και βιολογική ομοιομορφία, που μπορεί να αποδοθεί σε μια μεγάλη γενετική ροή μεταξύ των πληθυσμών, λόγω διασταυρούμενης γονιμοποίησης. Αυτή η μορφή της αναπαραγωγής είναι παρούσα επίσης στην ευρωπαϊκή μορφή, που παρουσιάζει όμως μια μεγάλη γενετική ποικιλομορφία. Στην πραγματικότητα, διάφορες τεχνικές αναπαραγωγής θα μπορούσαν να έχουν δημιουργήσει τα οικολογικά και γεωγραφικά εμπόδια μεταξύ των πληθυσμών που συνδέθηκαν με διάφορους κατοικίδιους ενδιάμεσους ξενιστές, και τους υπέβαλαν στις διαφορετικές επιλεκτικές πιέσεις. Σε απάντηση αυτών των πιέσεων, οι πληθυσμοί, χάρη στη δεξαμενή τους γενετικής ποικιλομορφίας, που διατηρήθηκε μέσω της διασταυρούμενης αναπαραγωγής, άρχισαν να αποκλίνουν γενετικά και να δημιουργούν επομένως τα διάφορα στελέχη. Η μορφή του Βορρά, άγρια, θα μπορούσε να είναι προγονική. Με την εμφάνιση της κτηνοτροφίας, προσαρμόστηκε στα κατοικίδια ζώα, δίνοντας έτσι γένεση στην ευρωπαϊκή. Οι εξερευνησεις και οι αποικισμοί οδήγησαν σε μια ευρεία διασπορά των κατοικίδιων ζώων και επομένως και των παρασίτων τους.

Με τη βοήθεια της παρατήρησης *in vitro* και της ανάλυσης των οικολογικών και συμπεριφοριστικών χαρακτηριστικών έγιναν προσπάθειες να επιβεβαιωθεί η μία ή η άλλη θεωρία, χωρίς όμως κάποιο αποτέλεσμα (Kumaratilake *et al.*, 1986; Gemmel και Lawson, 1986). Μόνο μέσω των μελετών της γενετικής των πληθυσμών, οι οποίες βασίζονται σε ενζυματική ηλεκτροφόρηση, προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι πληθυσμοί του *Echinococcus granulosus* αναπαράγονται και με αυτογονιμοποίηση (θεωρία των Smyth και Smyth) και με διασταυρούμενη γονιμοποίηση (θεωρία του Rausch), (Nollen, 1983; Thompson και Lymbery, 1988; Lymbery *et al.*, 1990, 1997). Η αυτογονιμοποίηση θα μπορούσε να είναι ένας εύκολος και γρήγορος τρόπος προκειμένου να απαντήσει στην επιλογή του ξενιστή και σε λίγες γενιές, οι πληθυσμοί θα ήταν ικανοί να αποκλίνουν γενετικά. Στην πραγματικότητα, το πιο κοινό στέλεχος, το στέλεχος προβάτων, έχει τη χαμηλότερη ιδιομορφία ξενιστή. Κατά μια άλλη άποψη, η διασταυρούμενη γονιμοποίηση θα μπορούσε να είναι απαραίτητη προκειμένου να αποτραπεί η εξαφάνιση των προσαρμοσμένων ετεροζυγωτικών στελεχών (Haag *et al.*, 1998).

1.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

1.4.1. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα κριτήρια προκειμένου να χαρακτηριστούν τα στελέχη *Echinococcus*, καθώς και άλλων παρασιτικών οργανισμών (Lumsden, 1974; Chance, 1979; Peters, 1981; Thompson και Lymbery, 1988). Αν και πιστεύεται ότι τα στελέχη θα έπρεπε να διαφέρουν σε οικολογικά, φυσιολογικά και συμπεριφοριστικά χαρακτηριστικά, αυτά δε σχετίζονται άμεσα με το γονιδίωμα. Για το λόγο αυτό, συχνά αναφέρονται σαν εξωγενή. Τα εξωγενή κριτήρια μπορούν συχνά να αποτελέσουν μια σημαντική ένδειξη ποικιλομορφίας, αλλά πρέπει να στηριχτούν σε κριτήρια που απεικονίζουν άμεσα τις διαφορές σε επίπεδο γονιδιώματος. Τα κριτήρια αυτά θεωρούνται ενδογενή. Από αυτά, μόνο η αλληλούχιση του DNA δίνει ένα μέτρο των γενετικών διαφορών, καθώς τα άλλα μπορούν να επηρεαστούν τόσο από το γενότυπο, όσο και από το περιβάλλον. Ειδικότερα, η μορφολογική, ανοσολογική και βιοχημική ποικιλομορφία μπορεί να αντανακλά αλλαγές σε έναν συγκεκριμένο ξενιστή ή οικολογική κατάσταση, χωρίς όμως οι αλλαγές αυτές να έχουν γενετική βάση.

Τα ενδογενή κριτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να υπολογιστούν διαφορές στις γενετικές συχνότητες και κατά συνέπεια γενετική ροή μεταξύ υποτιθέμενων στελεχών. Η μορφολογία αποτέλεσε το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο κριτήριο για τον χαρακτηρισμό των πληθυσμών του *Echinococcus granulosus* (Kumaratilake και Thompson, 1982). Αυτό συμβαίνει γιατί ήταν και είναι παγκοσμίως αποδεκτή για τον ταξονομικό προσδιορισμό και για πολλά χρόνια η ταξονομία ήταν το κυρίαρχο κίνητρο για την πραγματοποίηση συγκριτικών μελετών στο γένος *Echinococcus*. Όμως, υπήρξε μεγάλη διαφωνία όσον αφορά την αξία της μορφολογίας στο χαρακτηρισμό ειδών και ενδοειδικών ποικιλομορφιών στο γένος *Echinococcus* (Rausch, 1953; Vogel, 1957; Sweatman και Williams, 1963; Rausch και Nelson, 1963; Verster, 1965; Kumaratilake και Thompson, 1982). Πολλοί είναι οι παράγοντες που οδήγησαν στη διαφωνία αυτή (Rausch, 1953, 1967a; Thompson, 1979). Συχνά, εξετάστηκαν πολύ λίγα χαρακτηριστικά ή δείγματα ή οι διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν λανθασμένα αποτελέσματα. Ένα άλλο πολύ σημαντικό γεγονός είναι ότι δεν έχουν σχεδιαστεί ειδικές μελέτες που να καθορίζουν το εύρος της ποικιλομορφίας συχνά χρησιμοποιούμενων μορφολογικών χαρακτηριστικών ή να ταυτοποιούν την ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών χαρακτηριστικών κι έτσι να αποκλείουν τα περιττά (Thorpe, 1976). Επίσης, δεν έχουν γίνει προσπάθειες για να μετρηθεί η κληρονομικότητα των μορφολογικών

χαρακτηριστικών, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι τουλάχιστον κάποια από αυτά επηρεάζονται σημαντικά από τον ξενιστή. Μελέτες των Schantz *et al.* (1976) απέδειξαν ότι πρωτοσκώληκες του *E. granulosus* από τον ίδιο ενδιάμεσο ξενιστή έδωσαν μορφολογικά διακριτούς ενήλικες σε μολυσμένους σκύλους και αλεπούδες.

Επομένως, γενικά, χωρίς μια ανάλυση των γενετικών και περιβαλλοντικών στοιχείων της ποικιλομορφίας, οι μορφολογικές διαφορές ίσως δεν αποτελούν αξιόπιστες εκτιμήσεις των διαφορών στις γενετικές συχνότητες μεταξύ πληθυσμών του *E. granulosus*. Όμως, αν οι μορφολογικές διαφορές επιβεβαιώνονται από αποτελέσματα που λαμβάνονται με άλλα κριτήρια, γίνονται αποτελεσματικοί διαγνωστικοί δείκτες προκειμένου να προσδιοριστούν τα στελέχη. Αυτό έχει αποδειχθεί, για παράδειγμα, στο στέλεχος ίππων, που κατέχει διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Μόλις αυτά επιβεβαιώθηκαν από άλλα κριτήρια ήταν δυνατό να καθοριστεί η γεωγραφική κατανομή του στελέχους, χρησιμοποιώντας μόνο τη μορφολογία (Kumaratilake *et al.*, 1986).

Τα ανοσολογικά, βιοχημικά, χρωμοσωμικά και κριτήρια που έχουν βάση το DNA είναι λιγότερο πιθανό να επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες κι έτσι αποτελούν πιο αξιόπιστους τρόπους εύρεσης των γενετικών διαφορών μεταξύ των στελεχών. Τέτοια κριτήρια έχουν αποδειχθεί ανεκτίμητα σαν επιδημιολογικοί δείκτες ποικιλομορφίας των παρασίτων (Peters, 1981; Thompson, 1982; Godfrey, 1984; Gibson και Miles, 1985; Rollinson *et al.*, 1986; Simpson, 1986). Από μόνα τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να πιστοποιήσουν γενετικά ανεξάρτητους πληθυσμούς αν εφαρμοστούν σε δείγματα ικανού μεγέθους. Αυτό υποδηλώνει ότι οι πληθυσμοί μπορεί να ακολουθούν διαφορετικά εξελικτικά μονοπάτια και απαιτούν πιο λεπτομερή μελέτη, αλλά δε θα έπρεπε να αποτελούν μια βάση για τη διάκριση των διαφόρων στελεχών. Σύμφωνα με τους Thompson και Lymbery (1988), τα στελέχη θα έπρεπε να διαφέρουν και σε χαρακτηριστικά πρακτικής σημασίας. Από αυτή την άποψη, μια πιο σίγουρη εκτίμηση της ποικιλομορφίας του γένους *Echinococcus* ή άλλων παρασίτων μπορεί να αποκτηθεί αν στους πληθυσμούς υπό εξέταση εφαρμοστούν πολλά κριτήρια και κατά προτίμηση ταυτόχρονα.

Η χρήση βιοχημικών και κριτηρίων με βάση το DNA υπόσχεται την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό των στελεχών και την καλύτερη κατανόηση της σημασίας της ποικιλομορφίας των στελεχών. Μπορεί να καταστεί δυνατό να συνδεθεί η ποικιλομορφία σε χαρακτηριστικά όπως ο ρυθμός ανάπτυξης, η ιδιαιτερότητα του ξενιστή, η μολυσματικότητα, η τοξικότητα στη χημειοθεραπεία με αλλαγές στο γονιδίωμα ή αλλαγές που ρυθμίζονται από το γονιδίωμα. Συνεπώς, θα είναι κατανοητή η βάση των διαφορών μεταξύ στελεχών και τα πλεονεκτήματα που παρέχουν οι διαφορές αυτές στα παράσιτα. Σε κάποιες περιπτώσεις, αυτό μπορεί να είναι εμφανές καθώς, για παράδειγμα, διάφοροι τύποι μεταβολισμού σχετίζονται με διαφορετικούς ξενιστές (Bryant και Flockhart, 1986) και είναι απαραίτητοι για την

επιβίωση του παρασίτου. Σε άλλες περιπτώσεις δεν υπάρχουν εμφανή πλεονεκτήματα διακριτικών μεταβολών στο μεταβολισμό των διαφόρων στελεχών (McManus και Bryant, 1986).

Το σίγουρο είναι ότι μια κατανόηση της μοριακής και βιοχημικής βάσης της ποικιλομορφίας των στελεχών θα οδηγήσει τόσο στην καλύτερη κατανόηση της εξελικτικής πορείας των στελεχών, όσο και στην αποτελεσματική παρασκευή εμβολίων και φαρμάκων για την αντιμετώπιση της εχينوκοκκίασης.

1.4.1.1. Εξωγενή κριτήρια

Τα κριτήρια αυτά δε σχετίζονται άμεσα με το γονιδίωμα, είναι οικολογικά, φυσιολογικά, συμπεριφοριστικά (*in vivo* και *in vitro*) και επιδημιολογικά. Τα οικολογικά και επιδημιολογικά περιλαμβάνουν τη γεωγραφική κατανομή, την ιδιαιτερότητα του ξενιστή, το πλήθος των πιθανών ξενιστών, την κατανομή του φορέα και την επίδραση του περιβάλλοντος. Τα φυσιολογικά και συμπεριφοριστικά περιλαμβάνουν το ρυθμό ανάπτυξης, τον τρόπο αναπαραγωγής, την ανάπτυξη *in vitro*, τη μολυσματικότητα, την παθογένεση, την τοξικότητα και την ευαισθησία σε διάφορους χημικούς παράγοντες (Lumsden, 1974; Chance, 1979; Peters, 1981; Thompson και Lymbery, 1988).

1.4.1.2. Ενδογενή κριτήρια

Τα ενδογενή κριτήρια περιλαμβάνουν τη μελέτη της μορφολογίας, ανοσολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών, του καρυότυπου και του DNA (Lumsden, 1974; Chance, 1979; Peters, 1981; Thompson και Lymbery, 1988). Η μορφολογία μελετάται με μικροσκοπική παρατήρηση ή ανάλυση της δομής.

Η ανοσολογική μελέτη περιλαμβάνει ανοσολογική αντίδραση (immunological response), αντίδραση δηλαδή σε ξένες ουσίες με παραγωγή αντισωμάτων, ανοσοδιάγνωση (immunodiagnosis) που βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων στον ορό του αίματος και ορολογικές διεργασίες, όπως διαδοχικές αραιώσεις (serial dilution), στην περίπτωση που η αρχική συγκέντρωση των παρασίτων είναι πολύ μεγάλη και δεν μπορεί να μελετηθεί, ανοσοηλεκτροφόρηση (immunoelectrophoresis), μέσω της οποίας διαχωρίζονται και ταυτοποιούνται οι πρωτεΐνες με βάση τις διαφορές τους στο φορτίο και τη δραστηριότητά τους στο αντίσωμα, διάχυση πηκτής (gel diffusion), σταθεροποίηση μικροσυμπληρώματος (microcomplement fixation) που υπολογίζει τον αριθμό των αμινοξέων που διαφέρουν μεταξύ ταξονομικών μονάδων και ραδιοανοσοδοκιμή (radioimmunoassay) για τον υπολογισμό μικροσκοπικών ποσοτήτων της προς εξέταση ουσίας με τον

υπολογισμό της πρόσδεσής της ή όχι αφού σημανθεί ραδιενεργά σε κατάλληλο αντίσωμα.

Η βιοχημική ανάλυση στηρίζεται στον έλεγχο του μεταβολισμού, στην ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό τους βάρος, ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (two-dimensional electrophoresis) με βάση το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό σημείο ταυτόχρονα ή ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing) με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο, στην ανάλυση ισοενζύμων με ηλεκτροφόρηση ή ισοηλεκτρική εστίαση και στην αλληλούχιση των αμινοξέων.

Κατά τον έλεγχο του καρυότυπου μελετάται ο αριθμός των χρωμοσωμάτων με μικροσκοπική παρατήρηση ή ηλεκτροφόρηση βαθμωτού παλμικού πεδίου (pulsed-field gradient gel electrophoresis) που επιτρέπει το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και η δομή των χρωμοσωμάτων.

Τέλος, η μελέτη του DNA (χρωμοσωμικού ή μιτοχονδριακού) είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη και ακριβής μέθοδος για την ταυτοποίηση των στελεχών των παρασίτων και περιλαμβάνει αρχικά απομόνωση της προς μελέτη περιοχής (§2.2.), ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, §2.3.) ή PCR τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD-PCR, randomly amplified polymorphic DNA PCR) και στη συνέχεια μελέτη της δομής, του μεγέθους και της πυκνότητας του DNA, της νουκλεοτιδικής του σύστασης, υβριδοποίηση, ανάλυση με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων (RFLP) και αλληλούχιση των βάσεων (§2.6.).

PCR τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD-PCR)

Πρόκειται για μία απλούστατη μέθοδο ανάλυσης πολυμορφισμών του DNA που βασίζεται στην ενίσχυση γενωμικού DNA με τη χρήση ενός απλού ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή αυθαίρετης νουκλεοτιδικής σύστασης (Williams *et al.*, 1990). Χρησιμοποιείται μόνο ένας εκκινητής και τα προϊόντα της PCR σχηματίζονται μόνο όταν τυχαία βρεθούν δύο θέσεις για τον εκκινητή σχετικά κοντά μεταξύ τους. Τα προϊόντα γίνονται ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι διαφορές μεταξύ ατόμων προκύπτουν από μεταλλάξεις στις περιοχές στις οποίες συνδέεται ο εκκινητής και οδηγούν στην παρουσία ή απουσία ενός τμήματος DNA στο πήκτωμα. Οι ετεροζυγώτες δεν εντοπίζονται γιατί εμφανίζονται ίδιοι με τους ομοζυγώτες. Η μέθοδος αυτή μπορεί να αναλύσει ποικιλομορφία σε διάφορα επίπεδα καθώς παράγει τμήματα DNA χαρακτηριστικά για το κάθε είδος, για τον κάθε πληθυσμό μέσα σε κάποιο είδος και το κάθε άτομο μέσα σε κάποιον πληθυσμό. Είναι επομένως μια μέθοδος που βρίσκει πολλές εφαρμογές αν και αντιμετωπίζει κάποια προβλήματα αξιοπιστίας και επιμολύνσεων.

Παρόλ' αυτά χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για την ανάλυση των γενετικών σχέσεων μεταξύ οργανισμών και έχει ήδη εφαρμοστεί επιτυχώς σε διάφορες ομάδες παρασίτων με σκοπό την ταυτοποίησή τους. Ένα σημαντικό

χαρακτηριστικό της είναι ότι δεν απαιτεί προγενέστερες γνώσεις των αλληλουχιών για τη σύνθεση των κατάλληλων εκκινητών. Χρησιμοποιώντας προσεκτικά ελεγμένες συνθήκες, η μέθοδος έχει αποδειχθεί χρήσιμη για τη διάκριση των τεσσάρων ειδών *Echinococcus* και των γενετικά διακριτών μορφών του *E. granulosus* (Scott και McManus, 1994).

Ανάλυση πολυμορφισμού περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιήσει είτε το ολικό DNA που εξάγεται από δείγματα ή πιο συχνά συγκεκριμένες αλληλουχίες που ενισχύονται από το ολικό DNA με PCR. Και στις δύο περιπτώσεις, το DNA υφίσταται πέψη με μία ή περισσότερες ενδονουκλεάσες περιορισμού για να ληφθεί μία σειρά θραυσμάτων (Aquadro *et al.*, 1992). Επειδή αυτά τα περιοριστικά ένζυμα κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, κάθε τμήμα DNA παράγει ένα σταθερό σύνολο θραυσμάτων που μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι μεταλλάξεις καταστρέφουν ή δημιουργούν νέες θέσεις κοπής και αυτός είναι συνήθως ο λόγος για τον οποίο τα άτομα διαφέρουν στα πρότυπα RFLP. Όταν χρησιμοποιείται ολικό DNA, τα προϊόντα ταυτοποιούνται με ανάλυση Southern blotting (Southern, 1975), μέσω της οποίας το γενωμικό DNA υφίσταται πέψη με ένζυμα περιορισμού και τα προϊόντα της πέψης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με βάση το μέγεθος. Τα τμήματα DNA μεταφέρονται σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης ή νάιλον και υβριδίζονται με έναν ειδικό ανιχνευτή που είναι σημασμένος ραδιενεργά (συνήθως ^{32}P) ή με άλλον τρόπο, για παράδειγμα με ένζυμα που παράγουν έγχρωμα προϊόντα. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες pH και θερμοκρασίας, ο ανιχνευτής συνδέεται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA στα τμήματα που έχουν ακινητοποιηθεί στο φίλτρο. Μετά την πλύση για να απομακρυνθεί ο μη συνδεδεμένος ανιχνευτής και οι μη ειδικές συνδέσεις, το φίλτρο εκτίθεται σε ακτίνες X για να αποκαλυφθούν οι πολυμορφισμοί. Από τα τμήματα του DNA που εμφανίζονται καθορίζεται η απουσία ή παρουσία θέσεων κοπής στις αλληλουχίες του DNA που υβριδίζονται (Bowles και McManus, 1993a).

Ένας εναλλακτικός τρόπος για ανάλυση RFLP ολόκληρων μικρών γονιδιωμάτων όπως το mtDNA είναι πρώτα να διαχωριστεί το DNA που μας ενδιαφέρει από τους άλλους τύπους (Scott-White και Densmore, 1992; Tegelstrom, 1992). Στην περίπτωση του mtDNA, αυτό μπορεί να γίνει με φυγοκέντριση με χλωρίδιο του καισίου που διαχωρίζει τα κλειστά κυκλικά mtDNA από το ευθύγραμμο πυρηνικό DNA, λόγω της διαφορετικής πυκνότητας. Η διαδικασία είναι χρονοβόρα, αλλά τα προϊόντα μπορούν να ταυτοποιηθούν άμεσα σε πηκτώματα αγαρόζης με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου χωρίς να είναι απαραίτητη η ανάλυση Southern blotting ή η ραδιενεργή σήμανση. Το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιείται ευρέως καθώς

σχηματίζει ένα φθορίζων σύμπλεγμα που είναι εύκολα ορατό σε υπεριώδες φως. Είναι όμως μεταλλαξιγόνο και πρέπει να χρησιμοποιείται προσεκτικά.

Η ενίσχυση των αλληλουχιών του DNA με PCR, που ακολουθείται από ανάλυση RFLP έχει σαν πλεονέκτημα την ευαισθησία (αρκούν μικροσκοπικά ποσά αρχικού υλικού) και την απλότητα.

Πολλές μελέτες σχετικά με την ποικιλομορφία του γένους *Echinococcus* (McManus και Rishi, 1989; McManus *et al.*, 1987; McManus και Simpson, 1985) περιλαμβάνουν ανάλυση RFLP χρησιμοποιώντας την τεχνική Southern blotting.

Οι μέθοδοι που αναλύουν άμεσα το γονιδίωμα του παρασίτου δίνουν μια σαφή ένδειξη της ενδοειδικής ποικιλομορφίας, δεδομένου ότι δεν μπορούν να επηρεαστούν από τον ξενιστή ή από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Schantz *et al.*, 1976; Hobbs *et al.*, 1990; Constantine *et al.*, 1993; Bowles και McManus, 1993c). Η γενετική ποικιλομορφία μπορεί να ερευνηθεί είτε στο DNA του πυρήνα, είτε στο μιτοχονδριακό.

Λόγοι χρησιμοποίησης mtDNA

Το mtDNA είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος γενετικός μάρτυρας για φυλογενετικές αναλύσεις και έχει χρησιμοποιηθεί σε πάνω από το 80% των δημοσιευμένων μελετών (Avise, 1998), αν και η κυριαρχία του έχει μειωθεί ελαφρώς τα τελευταία χρόνια λόγω της διαθεσιμότητας των μικροδορυφορικών δεικτών και της αύξησης των μελετών του cpDNA στα φυτά. Για φυλογενετικές αναλύσεις ζωικών πληθυσμών, το μιτοχονδριακό DNA διατηρεί πολλά πλεονεκτήματα.

Καταρχάς, οι πολλαπλών εφαρμογών εκκινητές της PCR επιτρέπουν την ενίσχυση αλληλουχιών mtDNA χωρίς να απαιτούν καθαρισμό του. Επιπλέον, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού αντιγράφων mtDNA στους περισσότερους ιστούς, μπορούν να επιτευχθούν επιτυχείς ενισχύσεις PCR από αρχαίο υλικό, ακόμη και από αρχαιολογικά ευρήματα όπως οστά και δόντια. Σημαντικός είναι και ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων και εξέλιξης του mtDNA σε σύγκριση με το πυρηνικό, που οδηγεί σε γενετική ποικιλομορφία σε όλους αλλά κυρίως σε φυσικούς πληθυσμούς και σε πληθυσμούς που έχουν διέρθει από στενωπό. Επιπρόσθετα, η ενδοειδική νουκλεοτιδική ποικιλομορφία στο mtDNA είναι δραστικά ουδέτερη, οπότε η κατανομή των απλοτύπων επηρεάζεται περισσότερο από δημογραφικά γεγονότα στην ιστορία του πληθυσμού, παρά από την επιλογή. Ένα ακόμη βασικό πλεονέκτημα του mtDNA είναι ότι το μέγεθος του δραστικού πληθυσμού του mtDNA είναι τέσσερις φορές μικρότερο αυτού του διπλοειδούς πυρηνικού, δημιουργώντας κατά συνέπεια γενετικές διαφορές μεταξύ πληθυσμών σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Τέλος, επειδή δεν υπάρχει ανασυνδυασμός μεταξύ των μορίων ζωικού μιτοχονδριακού DNA, κάθε μονογονικά (μητρικά) κληρονομούμενος απλότυπος έχει μόνο έναν

πρόγονο στην προηγούμενη γενιά, αντίθετα με τις πυρηνικές αλληλουχίες σεξουαλικά αναπαραγόμενων οργανισμών. Οι δυνατότητα μεταλλάξεων των αλληλουχιών του mtDNA, με την έλλειψη ανασυνδυασμού λόγω μητρικής κληρονομιάς, επιτρέπει την κατανόηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των απλοτύπων (Merila *et al.*, 1997).

Η μητρική όμως κληρονομιά του mtDNA δεν αποτελεί μόνο πλεονέκτημα, αλλά θέτει και κάποιους περιορισμούς. Πιο συγκεκριμένα, όταν διαφέρουν τα αρσενικά άτομα από τα θηλυκά, για παράδειγμα αν τα αρσενικά διασκορπίζονται ενώ τα θηλυκά παραμένουν κοντά στον τόπο γέννησής τους, το mtDNA θα δώσει μια πολύ παραπλανητική εικόνα σε σχέση με τα πυρηνικά γονίδια. Για να αποκατασταθεί αυτό το πρόβλημα, το Υ χρωμόσωμα των θηλαστικών, που είναι πατρικά κληρονομούμενο και μη ανασυνδυαζόμενο μόριο, χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σε φυλογενετικές μελέτες σαν μάρτυρας της αρσενικής καταγωγής (Hurles και Jobling, 2001).

Πολλές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο mtDNA του *Echinococcus granulosus* έχουν επιβεβαιώσει αποτελέσματα στα οποία κατέληξαν προηγουμένως με τη βοήθεια μορφολογικών και βιολογικών τεχνικών και επομένως έχουν βοηθήσει στο χαρακτηρισμό των διάφορων στελεχών (Πίν.1).

1.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η εχينوκοκκίαση αποτελεί ένα σημαντικό οικονομικό πρόβλημα και πρόβλημα δημόσιας υγείας σε όλες τις ηπείρους (Εικ.7). Μόνο λίγες περιοχές μπορούν να θεωρηθούν απαλλαγμένες από αυτό το παράσιτο. Αποτελεσματικά προγράμματα προλήψεως βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη σε Κύπρο, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία, αλλά μόνο στην Ισλανδία κατορθώθηκε να εκριζωθεί εντελώς η νόσος, αφού τις τελευταίες δεκαετίες δεν έχει αναφερθεί καμία νέα περίπτωση (Σμπαρούνης, 1990). Η υψηλότερη επικράτηση έχει βρεθεί στην περιοχή της Μεσογείου, στην Αφρική, στην Ασία, στην Αυστραλία και στη Λατινική Αμερική. Ο πιο μεγάλος επιπολασμός στον κόσμο περιγράφεται στην Τουρκία, στο Ιράν, στο Ιράκ, στο Μαρόκο, στην Τυνησία, στη Λιβύη και στη Κένυα (Sadiadi, 2005; Ράπτης, 1998). Παλιότερα, ο κύκλος του *Echinococcus granulosus* περιλάμβανε λύκους και άγρια μηρυκαστικά, αλλά με την εμφάνιση της κτηνοτροφίας, το παράσιτο προσαρμόστηκε στους νέους ξενιστές και μέσω της εισαγωγής και εξαγωγής τους από τη μια χώρα στην άλλη, ο άνθρωπος έχει καταστήσει δυνατή την παρούσα παγκόσμια κατανομή της νόσου (Rausch, 1967b).

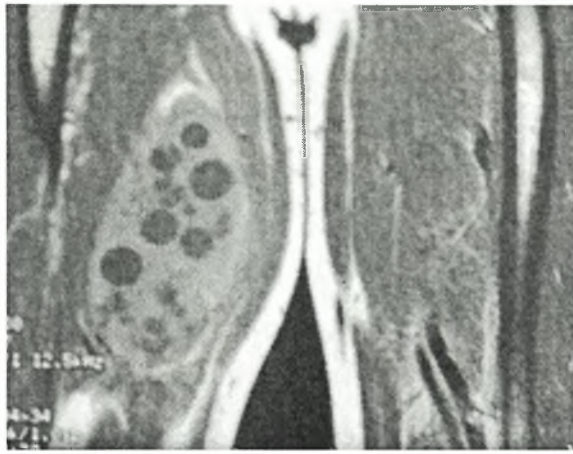
Η Ελλάδα, με τη βελτίωση του υγειονομικού επιπέδου, δε βρίσκεται πια σε υψηλή θέση επιδημιολογικά και ο αριθμός των νέων περιπτώσεων συνεχώς μειώνεται (Σέχας, 1996). Παρόλο που η συχνότητα της νόσου έχει μειωθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, δεν παύει να αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα, κάτι που σημαίνει έλλειψη αποτελεσματικού προγράμματος προλήψεως (Σμπαρούνης, 1990), αν και από το 1984 έχει ξεκινήσει μια αντιεχινokokκική καμπάνια (Sotiraki, 2003).

1.5.1. Αιτίες μόλυνσης

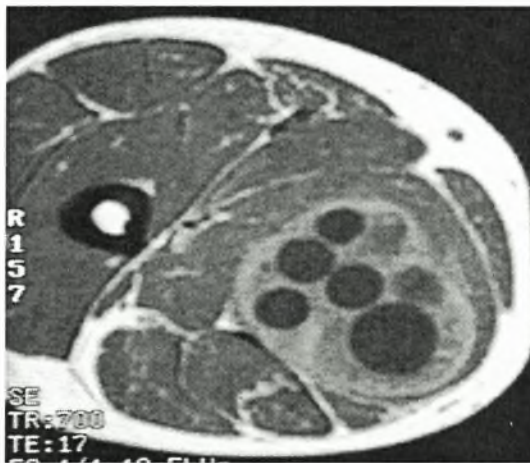
Ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί αν καταπιεί κατά λάθος τα αυγά του παρασίτου, που διασκορπίζονται στο περιβάλλον με τα κόπρανα του σκύλου, ο οποίος παραμένει ο πιο κοινός κύριος ξενιστής και επομένως η σημαντικότερη πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση, την επανεμφάνιση και τη διάδοση της μόλυνσης είναι η παρουσία μεγάλου αριθμού μολυσμένων σκύλων (κυρίως αδέσποτων), η εύκολη πρόσβαση των σκύλων σε μολυσμένα εντόσθια, η ανεπαρκής θεραπεία των σκύλων, ο περιορισμένος αριθμός ή η έλλειψη μικρών δημοτικών σφαγείων, η ανεπαρκής επίβλεψη των ζώων και του κρέατος των σφαγείων, η ανεπαρκής ή ελλιπής ικανότητα καταστροφής των μολυσμένων εντοσθίων, η παράνομη ή μη επιβλεπόμενη σφαγή και η έλλειψη επαρκούς υγειονομικής ενημέρωσης (Seimenis, 2003; Eckert *et al.*, 2000; Todorov και Boeva, 1999). Επομένως ο άνθρωπος έχει έναν κυρίαρχο ρόλο στη διατήρηση και διαίωσιση του κύκλου του *E. granulosus*. Είναι πολύ πιθανό ότι χωρίς αυτές τις ακατάλληλες τεχνικές, που σχετίζονται με την κτηνοτροφία, θα είχε εξαλειφθεί η εχινokokκίαση.

1.5.2. Εξέλιξη και διάγνωση της νόσου

Η εχινokokκίαση στον άνθρωπο, όπως και στους ενδιάμεσους ξενιστές, αναπτύσσεται στο 60-70% των περιπτώσεων στο ήπαρ και στο 20-30% στους πνεύμονες (Pawlowski, 1997; Eckert, 2000). Συχνά είναι μία κύστη απομονωμένη (Romíng, 1990), που μπορεί να φτάσει ακόμη και 10cm σε διάμετρο.



Εικόνα 8: Κύστη στον πνεύμονα (www.cdfound.to.it/HTML/hyd12c.htm).



Εικόνα 9: Κύστη στο ήπαρ (www.cdfound.to.it/img/Hyd12b.gif).

Η μόλυνση γίνεται συμπτωματική αν υπάρχει συμπίεση του οργάνου, ή μια τυχαία ρήξη της κύστης με επακόλουθες αλλεργικές αντιδράσεις. Πολύ συχνά όμως είναι ασυμπτωματική και μπορεί να διαγνωστεί σε ασθενείς που υφίστανται εξετάσεις για λόγους που δε συνδέονται με τη συγκεκριμένη νόσο (Larrieu *et al.*, 2000), είτε να παραμείνει ασυμπτωματική συνήθως επί 5-20 χρόνια, μέχρις ότου, λόγω του μεγάλου μεγέθους της, ή της χωροκατακτητικής της δράσης, να προκαλέσει συμπτώματα (Ράπτης, 1998).

Η διάγνωση βασίζεται σε διάφορα κριτήρια: 1. συμπτώματα (όπου υπάρχουν), 2. μορφολογικά χαρακτηριστικά που προκύπτουν από υπερηχογραφήματα, ακτίνες Χ, αξονική τομογραφία και μαγνητική τομογραφία, 3. ανοσολογικές δοκιμές, 4. διαγνωστικές ενέσεις, 5. διαδερμική παρακέντηση και βιοψία και 6. δερμοαντίδραση Casoni (Σέχας, 1996).

Συμπτώματα εχίνοκοκκίασης ήπατος

Η εχινόκοκκος κύστη του ήπατος συμπεριφέρεται ως χωροκατακτητική βλάβη. Στην αρχή είναι τελείως ασυμπτωματική, αλλά καθώς μεγαθύνεται μπορεί να προκαλέσει άτυπες ενοχλήσεις στο άνω δεξιό τεταρτημόριο της κοιλιάς (Σταθάκης, 1998). Συχνά εμφανίζεται κοιλιακό άλγος (το 77% των ασθενών), αίσθημα βάρους στο δεξιό υποχόνδριο (Σμπαρούνης 1990; Σέχας, 1996), βήχας και ψηλαφητή μάζα στο δεξιό άνω τεταρτημόριο της κοιλιάς (60% των ασθενών). Νωρίς προκαλούνται συμπτώματα όταν η εντόπιση των κύστεων στο ήπαρ προκαλεί νέκρωση ή απόφραξη αιμοφόρων ή λεμφοφόρων αγγείων καθώς και του χοληδόχου πόρου ή διαρροή υδατιδικού περιεχομένου προς τον τελευταίο, οπότε και εμφανίζεται ίκτερος (στο 22% των ασθενών) και υποτροπιάζοντα επεισόδια χολαγγειίτιδας (Gloor, 1988).

Κύριες επιπλοκές είναι η ρήξη στο περιτόναιο, που προκαλεί κοιλιακό πόνο, ευαισθησία και αλλεργικές εκδηλώσεις, όπως αναφυλαξία και κνίδωση (Erdogmus *et al.*, 2005; Gioulekas *et al.*, 1986), η διαρροή υγρού της κύστης στα αγγεία, που εκδηλώνεται με αναφυλακτικό shock ή κνησμό, κνίδωση και ηωσινοφιλία, η ρήξη στα χοληφόρα με εμφάνιση αποφρακτικού ίκτερου και η επιμόλυνση της κύστης όταν προκληθεί ρήξη στα χοληφόρα, με πυογόνους μικροοργανισμούς και ανάπτυξη ηπατικού αποστήματος (Σταθάκης, 1998).

Συμπτώματα εχίνοκοκκίασης πνεύμονα

Οι υδατίδες κύστεις του πνεύμονα προοδευτικά αυξάνονται σε μέγεθος και μπορεί να φτάσουν τα 10cm σε διάμετρο. Συνήθως, όμως, οι μεγάλες κύστεις ρήγνυνται λόγω αύξησης της ενδοθωρακικής πίεσης, όπως συμβαίνει κατά το βήχα (Akhan *et al.*, 1994). Μόλις συμβεί η ρήξη, το υγρό εκχέεται συνήθως προς τους βρόγχους και αποβάλλεται από το στόμα με το βήχα. Μαζί με το υγρό, είναι δυνατόν να αποβληθούν και τεμάχια από τη μητρική μεμβράνη της κύστης, γεγονός που προκαλεί έντονη δύσπνοια ή φαινόμενα πνιγμονής και αρκετά συχνά εκδηλώνονται αλλεργικές αντιδράσεις, που μπορεί να είναι έντονες και να προκαλέσουν καταπληξία, η οποία μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο του αρρώστου (Σέχας, 1996).

Οι μικρές κύστεις συνήθως δεν προκαλούν συμπτώματα. Ακόμη και μεγάλες κύστεις, εφόσον δεν έχουν ραγεί, είναι δυνατόν να μη γίνονται αντιληπτές από τον άρρωστο. Όμως, αρκετοί παραπονούνται για ξηρό βήχα, ακαθόριστη δυσφορία ή αίσθημα βάρους στο θώρακα, αλλεργικά εξανθήματα ή κνίδωση του δέρματος, δύσπνοια, πυρετό και αιμόπτυση (Jerray *et al.*, 1992).

Συμπτώματα εχίνοκοκκίασης άλλων οργάνων

Λιγότερο συχνές εντοπίσεις για τον *E. granulosus* είναι η καρδιά, τα οστά, οι νεφροί, ο σπλήνας και ο εγκέφαλος. Οι κλινικές εκδηλώσεις τότε δεν είναι ειδικές και συχνά παρουσιάζονται σημαντικές δυσκολίες στη διάγνωση. Οι κύστεις στα οστά, για

παράδειγμα, παραμένουν ασυμπτωματικές μέχρι να προκληθεί παθολογικό κάταγμα. Τότε, εκδηλώνονται με πόνο, οίδημα και τελικά ανάπτυξη συριγγίων από τα οποία αποβάλλεται υλικό της κύστης (Σταθάκης, 1998). Οι κύστεις στην καρδιά είναι δυνατό να έρθουν στο προσκήνιο λόγω ρήξης και ευρείας διασποράς ή περικαρδικού επιπωματισμού (Ράπτης, 1998) και μπορούν να προκαλέσουν πόνο στο στήθος, διαταραχές αγωγιμότητας, αναφυλακτικό σοκ και περικαρδίτιδα (Kardaras *et al.*, 1996). Στον εγκέφαλο, η εχινόκοκκος κύστη εκδηλώνεται ως χωροκατακτητική βλάβη.

Μορφολογική έρευνα

Για τη μορφολογική έρευνα των πνευμονικών κύστεων χρησιμοποιούνται οι ακτίνες Χ, γιατί οι κύστεις είναι πολύ ευδιάκριτες και απεικονίζονται ως στρογγυλές ομοιογενείς σκιάσεις (Reeder και Palmer, 1981; Ράπτης, 1998).

Επίσης χρησιμοποιούνται οι υπέρηχοι, που μπορούν να προσδιορίσουν τον αριθμό των κύστεων, το μέγεθος και την εντόπιση και να ελέγξουν το στάδιο της εξέλιξης του παρασίτου (Gharbi *et al.*, 1981; Beggs, 1983; Lewall *et al.*, 1985; Caremani *et al.*, 1992). Μετά τη θεραπεία, υπολογίζουν την αποτελεσματικότητά της.

Η αξονική και μαγνητική τομογραφία είναι άλλες δύο μέθοδοι απεικόνισης που χρησιμοποιούνται ευρέως και προσφέρουν τη δυνατότητα να ελεγχθεί οποιοδήποτε όργανο και να χαρακτηριστούν πολύ μικρές κύστεις (Di Palma *et al.*, 1991; von Sinner, 1991; Pawlowski, 1993). Δίνουν πιο πολλές λεπτομέρειες και έχουν μεγάλη ειδικότητα κυρίως στη μελέτη ασυνήθων εντοπίσεων, όπως στο ΚΝΣ, το ουροποιητικό και οστά. Επιπλέον, δίνουν πληροφορίες για την κατάσταση της κύστης (ακέραιη, μονόχωρος, ραγείσα, ύπαρξη θυγατέρων, αποιτανωμένη), περιγράφουν την έκταση της βλάβης σε άλλα όργανα και ζωτικούς σχηματισμούς και αποκαλύπτουν αφανείς κύστεις. Είναι επίσης χρήσιμες μέθοδοι για την παρακολούθηση της πορείας μετά από χειρουργική επέμβαση ή χημειοθεραπεία. (Ράπτης, 1998).

Ανοσολογικές μέθοδοι

Οι ανοσολογικές μέθοδοι μελετούν την παρουσία ή όχι αντισωμάτων του ξενιστή, που έχουν απελευθερωθεί ως απάντηση στα αντιγόνα του παρασίτου, αλλά έχει μελετηθεί ότι το 10% των ασθενών με ηπατικές κύστεις και το 40% εκείνων με πνευμονικές κύστεις δεν παράγουν αντισώματα, δίνοντας κατά συνέπεια ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Επίσης, ψευδώς θετικά αποτελέσματα εμφανίζονται συχνά, για παράδειγμα σε αρρώστους με άλλες παρασιτικές λοιμώξεις, καρκίνο και χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα και είναι δυνατό να οδηγήσουν σε άσκοπες ή και δυνητικά επικίνδυνες επεμβάσεις ή χημειοθεραπεία.

Πρόσφατες μελέτες έχουν απομονώσει και χαρακτηρίσει πολλά αντιγόνα που ενδιαφέρουν διαγνωστικά. Προσδοκία είναι ότι στο άμεσο μέλλον η χρήση «cocktails» αντιγόνων θα παρέχει τη δυνατότητα να λαμβάνονται πιο ειδικά εργαστηριακά αποτελέσματα, χωρίς όμως να θυσιάζεται η ευαισθησία. Επί του παρόντος συνιστάται η χρησιμοποίηση συνδυασμού ορολογικών εξετάσεων.

Διαγνωστικές ενέσεις

Με τη βοήθεια της διαγνωστικής ένεσης, αναρροφάται υλικό από την κύστη και υφίσταται ανάλυση. Αλλά αυτή η μέθοδος εισάγει τον κίνδυνο πιθανής ρήξης της κύστης, προκαλώντας έτσι δευτερεύουσες εχينوκοκκιάσεις και αναφυλακτικές αντιδράσεις (Morris και Richards, 1992). Επομένως, πρέπει να αποφευχθεί, όσο είναι δυνατό. Η χρήση της είναι δικαιολογημένη στην περίπτωση στην οποία δεν μπορούν να μελετηθούν αντισώματα αντι-*Echinococcus* και οι απεικονιστικές τεχνικές δεν μπορούν να διακρίνουν μεταξύ των κύστεων και των αποστημάτων ή των όγκων (Meyenberger, 1990).

Διαδερμική παρακέντηση και βιοψία

Σε οροαρνητικούς αρρώστους με μονόχωρο κύστη ήπατος μερικοί προτείνουν ως πιο επιθετική διαγνωστική τεχνική την κατευθυνόμενη με υπέρηχους ή CT διαδερμική παρακέντηση και αναρρόφηση της κύστης, οπότε η ανεύρεση πρωτοσκωλήκων ή τμήματος βλαστικής μεμβράνης επιβεβαιώνει τη διάγνωση. Εννοείται ότι η τεχνική αυτή παρουσιάζει τον κίνδυνο διαρροής υδατιδικού περιεχομένου και αναφυλακτικής αντίδρασης ή διασποράς του εχινόκοκκου.

Δερμοαντίδραση Casoni

Είναι η ενδοδερμική ένεση εχينوκοκκικού υγρού και η αναζήτηση τοπικής δερματικής αντίδρασης. Αν γίνει τεχνικά άρτια, είναι θετική στο 80-85% των περιπτώσεων. Η εξέταση αυτή μειονεκτεί, γιατί είναι θετική πολλά χρόνια μετά την αφαίρεση της κύστης ή το θάνατο του παρασίτου. Επίσης, σε ποσοστό 2-4%, είναι ψευδώς θετική και επί φυσιολογικών ατόμων. Έχει πρακτικά εγκαταλειφθεί.

1.5.3. Αντιμετώπιση της νόσου

Όπως για τη διάγνωση, έτσι και για τη θεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι: 1. χειρουργική αντιμετώπιση, 2. χημειοθεραπεία, 3. PAIR (percutaneous puncture under sonographic guidance aspiration of the cyst fluid, and instillation of a protoscolical agent, followed by respiration). Η θεραπευτική αντιμετώπιση εξαρτάται από το μέγεθος και την εντόπιση

των κύστεων, τις κλινικές εκδηλώσεις και την κατάσταση του αρρώστου. Θεραπεία εκλογής παραμένει η χειρουργική, διότι έχει τις λιγότερες επιπλοκές και την καλύτερη πρόγνωση. Η χημειοθεραπεία επιφυλάσσεται για συγκεκριμένες περιπτώσεις. Σε ασυμπτωματικούς αρρώστους με μικρές αποσιτανωμένες κύστεις είναι αρκετή η κλινική παρακολούθηση.

Χειρουργική αντιμετώπιση

Η χειρουργική αντιμετώπιση παραμένει η πιο χρησιμοποιημένη μέθοδος, προ πάντων αν η κύστη έχει φτάσει έναν σημαντικό όγκο και συμπιέζει το όργανο. Μέθοδοι χειρουργικής θεραπείας είναι η εκτομή ακέραιης της κύστης ή η εκκένωση πρώτα του περιεχομένου της και στη συνέχεια η αφαίρεση ή εξωτερική παροχέτευση της.

Έχει, όμως, και τις αρνητικές πλευρές της, όπως αυτή της πιθανής ρήξης της κύστης, που θα μπορούσε να προκαλέσει δευτερεύουσες εχينوκοκκιάσεις ή/και αλλεργικές αντιδράσεις. Για αυτό το λόγο, μετά τη χειρουργική αντιμετώπιση, ακολουθεί πάντα η χημειοθεραπεία (Ράπτης, 1998).

Χημειοθεραπεία

Αρκετοί άρρωστοι έχουν διασπαρμένη νόσο, μαζική παρουσία κύστεων ή ασταθή γενική κατάσταση, ώστε να μη δύνανται να χειρουργηθούν. Σ' αυτές τις περιπτώσεις επιχειρείται χημειοθεραπεία. Μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έχουν καθορίσει τις ενδείξεις, αλλά και τους περιορισμούς στη χρήση των παραγώγων της benzimidazole (κυρίως mebendazole και albendazole) καθώς και του praziquantel στη θεραπεία της προνυμφικής εχينوκοκκιάσης (Eckert, 1986; Rausch *et al.*, 1986; Ammann και Eckert, 1996). Το 1/3 των αρρώστων που θεραπεύονται με benzimidazoles παρουσιάζει πλήρη και μόνιμη εξαφάνιση των κύστεων. Σε ακόμη πιο μεγάλο ποσοστό (40-70%) παρατηρείται μείωση του μεγέθους της κύστης και ύφεση των συμπτωμάτων. Η albendazole υπερέχει, επειδή απορροφάται καλύτερα από το έντερο και διαχέεται μέσα στην κύστη. Οι παρενέργειες, που είναι ίδιες και για τα δύο φάρμακα, περιλαμβάνουν ουδετεροπενία (1%), ηπατοτοξικότητα (1-5%), αλωπεκία (<1%) και είναι αναστρέψιμες με τη διακοπή της θεραπείας. Η δόση, η διάρκεια θεραπείας και ο χρόνος παρακολούθησης εξατομικεύονται. Μερικοί συνιστούν χορήγηση albendazole σε αρρώστους πριν από την εγχείρηση, με σκοπό την αδρανστοποίηση των πρωτοσκωληκών και τη μείωση της τάσης της κύστης. Το praziquantel είναι πρωτοσκωληκοκτόνο φάρμακο που έχει χορηγηθεί (εναλλακτικά με albendazole) ως προληπτική θεραπεία σε περιπτώσεις διαρρών κύστεων ή μετά την PAIR.

PAIR

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία εναλλακτική της χειρουργικής (WHO, 1996) και πρωτοχρησιμοποιήθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '80. Έχει αποδειχθεί ότι έχει καταστρεπτικά αποτελέσματα για το παράσιτο. Τα στάδια που περιλαμβάνει είναι η διαδερμική παρακέντηση της υδατίδας κύστης υπό την καθοδήγηση υπερήχων, η αναρρόφηση του υγρού της, η έγχυση πρωτοσκωληκοκτόνου παράγοντα και η εκ νέου αναρρόφηση. Πρέπει πάντα να εκτελείται από ειδικευμένα και πεπειραμένα άτομα, που να μπορούν να αντιμετωπίζουν πιθανές επιπλοκές. Συνοδεύεται πάντα από χημειοθεραπεία, για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος πιθανής δευτερεύουσας εχينوκοκκίασης (Eckert και Deplazes, 2004; Ράπτης, 1998).

Έχει τονισθεί, από όσους ασχολούνται με την εχينوκοκκίαση, ότι είναι πιο εύκολο να αποδειχθεί η αποτυχία της θεραπευτικής αγωγής που εφαρμόστηκε, από την επιτυχία της. Το γεγονός ότι η υδατίδα κύστη είναι δυνατό να υπάρχει χωρίς να προκαλεί καθόλου συμπτώματα, καθιστά απαραίτητη τη συστηματική μετεγχειρητική παρακολούθηση του αρρώστου. Η πιο ακριβής μεθοδολογία για τον έλεγχο του αποτελέσματος της χειρουργικής ή φαρμακευτικής θεραπείας είναι η παρακολούθηση σε χρονικά διαστήματα 3-6 μηνών της ύπαρξης και του μεγέθους των κύστεων με υπερήχους, αξονική ή μαγνητική τομογραφία. Επειδή ο χρόνος που εμφανίζονται υποτροπές ποικίλλει, ο έλεγχος θα πρέπει να παρατείνεται μέχρι και 10 χρόνια (Ράπτης, 1998).

1.5.4. Πρόληψη της νόσου

Καθώς η εχينوκοκκίαση είναι μια νόσος ευρέως διαδεδομένη παγκοσμίως, που προκαλεί ανθρώπινη νοσηρότητα και θνησιμότητα, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την παρασκευή αποτελεσματικών εμβολίων. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί ουσιαστική πρόοδος στη δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου EG95 εμβολίου, που μπορεί να διακόψει τον κύκλο ζωής του *E. granulosus* και τη μετάδοσή του από τους σκύλους στον άνθρωπο. Το εμβόλιο περιλαμβάνει ένα ανασυνδυασμένο αντιγόνο της επιφάνειας της ογκόσφαιρας, που παράγεται στην *Escherichia coli* και προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων, που σκοτώνουν την ογκόσφαιρα στα αρχικά στάδια της νόσου (Lightowlers, 2005; Manderson *et al.*, 2005; Gauci *et al.*, 2005). Αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματικό σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε πρόβατα, βοοειδή και αίγες στη Νέα Ζηλανδία, στην Αυστραλία, στην Αργεντινή, στη Χιλή και στην Κίνα και αναμένεται να διατεθεί σε προγράμματα ελέγχου παγκοσμίως (Lightowlers και Heath, 2004).

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η πρακτική σημασία της ποικιλομορφίας εντός του είδους *Echinococcus granulosus* είναι συνδεδεμένη με το πώς αυτή η ποικιλομορφία μπορεί να επηρεάσει τη γνώση μας σχετικά με την επιδημιολογία της ανθρώπινης εχينوκοκκίασης και επομένως να γίνει κατανοητό ποια μέτρα μπορούν να ληφθούν προκειμένου να εντοπιστεί, να αντιμετωπιστεί και να ελεγχθεί η νόσος.

Τα διάφορα στελέχη διαφέρουν όσον αφορά την ιδιαιτερότητα του ξενιστή, τη γεωγραφική κατανομή, τα οικολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά και τη μολυσματικότητα για τον άνθρωπο. Επομένως, είναι απαραίτητο να ταυτοποιηθούν και να χαρακτηριστούν τα στελέχη σε κάθε ενδημική περιοχή, ώστε να είναι δυνατόν να καθιερωθούν αποτελεσματικά προγράμματα ελέγχου. Για το λόγο αυτό, κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, προσδιορίστηκαν σε επίπεδο στελέχους τα δείγματα που προερχόταν από διάφορες γεωγραφικές περιοχές και διάφορους ξενιστές, ώστε να παρασχεθούν ενδείξεις όσον αφορά τη γενετική σύσταση των πληθυσμών, τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των στελεχών και να μπορέσουν επομένως να διευρευνηθούν οι γνώσεις μας γι' αυτή τη σημαντική νόσο.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ

Τα δείγματα που εξετάστηκαν συλλέχθηκαν κατά το παρελθόν, αλλά και κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας από το τμήμα Παρασιτολογίας του Πανεπιστημίου "La Sapienza" της Ρώμης, καταχωρήθηκαν σε καταλόγους (Πιν.2) και συντηρήθηκαν είτε σε καταψύκτες σε θερμοκρασία -80°C , είτε σε αλκοόλη 70%. Όλα τα δείγματα περιείχαν υδατίδες κύστεις του προς εξέταση παρασίτου.

Πίνακας 2: Κατάλογος των δειγμάτων που εξετάστηκαν, γεωγραφική προέλευση, ξενιστής και αντίστοιχος κωδικός.

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ
ΣΑΡΔΗΝΙΑ	ΠΡΟΒΑΤΟ	812/C es. 1	A SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	782/B	B SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	670/B es. 1	C SARD
	ΠΡΟΒΑΤΟ	812/C es. 2	D SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	731/B	E SARD
	ΠΡΟΒΑΤΟ	611/B	F SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	670/B es. 2	G SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	729/B	H SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	668/B	I SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	672/B	L SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	734-B	M SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	662-B	N SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	666-B	O SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	671-B	P SARD
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	660-B	Q SARD
ΒΟΟΕΙΔΕΣ	664-B	R SARD	
OLEVANO ROMANO	ΠΡΟΒΑΤΟ	668/C es. 1	A OLE
	ΠΡΟΒΑΤΟ	685/C es. 2	B OLE
	ΠΡΟΒΑΤΟ	685/C es. 6	C OLE
	ΠΡΟΒΑΤΟ	685/C es. 6f	D OLE
	ΠΡΟΒΑΤΟ	685/C es. 2f	E OLE
	ΠΡΟΒΑΤΟ	668/C es. 2	F OLE
FIANO ROMANO	ΠΡΟΒΑΤΟ	816/C es. 2	A FIA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	816/C es. 28	B FIA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	816/C es. 2f	C FIA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	816/C es. 3	D FIA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	816/C es. 33	E FIA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	816/C es. 37	F FIA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	816/C es. 1	G FIA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	816/C es. 4	H FIA
ΡΩΜΗ	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	508/A es. 1	A ROMA
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	508/A es. 2	B ROMA
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	463/A	C ROMA
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	573/B	D ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es. G1	E ROMA
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	501/A	F ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es. G2	G ROMA
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	513/A	H ROMA
	ΛΙΚΙ του ΝΕΙΛΟΥ	es. L	I ROMA

ΡΩΜΗ	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.H	L ROMA
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	323/B	M ROMA
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	310/B	N ROMA
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	315/B	O ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.A	P ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.B	Q ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.C	R ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.D	S ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.L	T ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.M	U ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.N	V ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.P	Z ROMA
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.Q	W ROMA
	ΑΓΡΙΟΣ ΧΟΙΡΟΣ	es.1	CP
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.2	OV1F1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.3	OV1F2
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.4	OV2F1
ΠΡΟΒΑΤΟ	es.5	OV2F2	
LATINA	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.1	A LAT
VELLETRI (Roma)	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.2	B LAT
S.MARINELLA	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.E	A VELL
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.1	A MAR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.2	B MAR
ΤΟΡΙΝΟ	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.γ	S. MAR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.1	TO1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.2	TO2
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.3	TO3
	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.4	TO4
ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ	ΠΡΟΒΑΤΟ	es.5	TO5
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.7	C POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.12	D POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.1	B POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.8	M POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.4	E POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.8f	L POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	808-C es.11f	A POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	808-C es.5	N POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	808-C es.4	I POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	808-C es.10f	O POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	808-C es.8f	P POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	808-C es.1	F POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.9f	Q POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.1	G POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.8	M POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.10	R POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.2	S POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.4	T POR
	ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.13	U POR
ΠΡΟΒΑΤΟ	808-C es.4	I POR	
ΠΡΟΒΑΤΟ	808-C es.1	V POR	
ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.3	W POR	
ΠΡΟΒΑΤΟ	814-C es.11	H POR	
ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	es.3a	A ARG
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	es.3b	B ARG
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	es.3c	D ARG
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	es.4	C ARG
ΣΛΟΒΑΚΙΑ	ΧΟΙΡΟΣ	es.4/3	B SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	es.4/1a	A SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	es.R/6	E SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	es.4/1b	D SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	es.A	C SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	EG1	F SLO

ΣΛΟΒΑΚΙΑ	ΧΟΙΡΟΣ	EG2	G SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	EG3	H SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	EG4	L SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	EG5	M SLO
	ΧΟΙΡΟΣ	EG6	N SLO

2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε μετά τη λήψη μικρού τμήματος της εσωτερικής μεμβράνης της κύστης κάθε δείγματος. Το τμήμα αυτό τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα Eppendorf του 1.5mL, πλύθηκε με διάλυμα Tris 0.1M και εμβυθίστηκε σε υγρό άζωτο για λίγα δευτερόλεπτα, προκειμένου να διευκολυνθεί η διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών. Τέλος, ομογενοποιήθηκε με άσκηση πίεσης με τη βοήθεια αποστειρωμένου αντικειμένου και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο Wizard™ Genomic DNA Purification kit (Promega), σύμφωνα με το οποίο:

- Για κάθε δείγμα προς εξέταση προετοιμάζεται ένα μείγμα αποτελούμενο από 120mL διαλύματος EDTA 0.5M, pH8.0 και 500μL Nuclei Lysis Solution (Promega) σε δοκιμαστικό σωλήνα διατηρημένο σε πάγο.
- Από το παραπάνω μείγμα προστίθενται 600μL σε κάθε δείγμα.
- Σε κάθε δείγμα προστίθενται 17.5mL πρωτεϊνάσης K 20mg/mL.
- Τα δείγματα επωάζονται για τρεις ώρες σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55°C με έντονη ανάδευση κάθε μία ώρα. Εναλλακτικά μπορεί να γίνει επώαση όλη τη νύχτα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55°C με ελαφριά ανάδευση.
- Προστίθενται 3mL RNase Solution (4mg/mL σε DNA Rehydration Solution. Βρασμένη για 10min για την καταστροφή των DNAσών) στα δείγματα, τα οποία αναδεύονται με 5 φορές αναστροφή του σωλήνα και τοποθετήθηκαν για νέα επώαση διάρκειας 30min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C.
- Τα δείγματα αφήνονται να κρυώσουν για 5 λεπτά, χρονικό διάστημα απαραίτητο για να επανέρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Γίνεται ιζηματοποίηση των προϊόντων της λύσης, χρησιμοποιώντας 200mL Protein Precipitation Solution (Promega) για κάθε δείγμα και έντονη ανάδευση με vortex για 20 sec. Τα δείγματα διατηρούνται σε πάγο για 5min.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 4min στις 13000 στροφές/λεπτό. Οι πρωτεΐνες σχηματίζουν λευκό ίζημα στο κάτω μέρος του σωλήνα.
- Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το DNA και τοποθετείται σε νέο, καθαρό σωληνάκι Eppendorf του 1.5mL, που περιέχει 600μL ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Πραγματοποιείται ασθενής ανάδευση.

- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13000 στροφές/λεπτό για 1min και το υπερκείμενο αφαιρείται με ακρίβεια, αφήνοντας το DNA στο κάτω μέρος του σωλήνα με τη μορφή μικρού λευκού ιζήματος.
- Στο ίζημα προστίθενται 600μL αιθανόλης 70% και πραγματοποιείται ελαφριά ανακίνηση για την έκπλυση του DNA.
- Ακολουθεί νέα φυγοκέντριση για 1 min στις 13000 στροφές/λεπτό.
- Η αιθανόλη απομακρύνεται πολύ προσεκτικά, καθώς στη φάση αυτή το ίζημα δεν είναι πολύ σταθερά προσκολλημένο στα τοιχώματα και υπάρχει κίνδυνος να αναρροφηθεί από την πιπέτα.
- Τα δείγματα αναποδογυρίζονται σε καθαρό, απορροφητικό χαρτί για 15min, ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.
- Το DNA επαναδιαλύεται σε 100μL DNA Rehydration Solution (10mM Tris-HCL pH7.4; 1mM EDTA pH8.0) και επωάζεται είτε για μία ώρα στους 65°C, με περιοδική ανακίνηση, είτε για μία νύχτα στους 4°C.
- Το DNA διατηρείται στους -20°C.

2.3. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΣΩ PCR

2.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, το οποίο επιλέγεται μέσω ενός πολύπλοκου γονιδιώματος από *in vitro* ενισχυτική ενζυμική δράση. Η PCR απαιτεί τη χρησιμοποίηση ειδικού μηχανήματος ταχείας ψύξης και θέρμανσης των σωληναρίων της αντίδρασης, στις βέλτιστες θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των κλώνων του DNA (95°C), την πρόσδεση των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινήτων (55-65°C) και τον πολυμερισμό του DNA (72°C).

Οι συνθήκες της αντίδρασης μπορούν να βελτιστοποιηθούν προκειμένου να ενισχυθεί μια αλληλουχία DNA στόχου με ελάχιστες διαστάσεις 100bp και μέγιστες 20kb, ανάλογα με την εφαρμογή. Το μεγαλύτερο μέρος των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιεί ένα ένζυμο, που ονομάζεται Taq πολυμεράση, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στη θερμοκρασία και διατηρεί τη λειτουργικότητά του αμετάβλητη μέχρι τους 95°C (Miesfeld, 1999).

Θεωρητικά, κάθε κύκλος της ενίσχυσης θα έπρεπε να διπλασιάσει τον αριθμό του μοριακού στόχου, επιτυγχάνοντας έτσι μια αύξηση του προϊόντος της PCR.

Εντούτοις, προτού μειωθεί το υπόστρωμα ή το ένζυμο, η αποδοτικότητα της ενίσχυσης είναι μικρότερη του 100%, λόγω της μη βέλτιστης δραστηριότητας της πολυμεράσης, της μη πρόσδεσης των εκκινητών και της ατελούς αποδιάταξης των κλώνων του DNA.

Η επιλογή των περιοχών-στόχων για την ενίσχυση εξαρτάται από το σκοπό της έρευνας. Μπορούν να είναι περιοχές του πυρηνικού ή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος που πρέπει να λειτουργήσουν σαν γενετικοί δείκτες προκειμένου να μελετηθεί το επίπεδο της ενδοειδικής ποικιλομορφίας. Προκειμένου να οργανωθεί μια δοκιμή με την τεχνική PCR, οι κατάλληλες αλληλουχίες-στόχοι μπορούν να επιλεγθούν με βάση προηγούμενες μελέτες ανάλογων οργανισμών. Εάν δεν είναι διαθέσιμες γνωστές αλληλουχίες DNA, μπορούν να σχεδιαστούν ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητές, από την αλληλουχία του κλώνου του DNA, που είναι συμπληρωματικό στην περιοχή που είναι επιλεγμένη σαν στόχος. Στη συνέχεια, μια προκαταρκτική πραγματοποίηση PCR μπορεί να καθορίσει αν εκείνη η περιοχή μπορεί να ενισχυθεί αποτελεσματικά, και μια αλληλούχιση του DNA ή ένας υβριδισμός μπορεί να επιβεβαιώσει την πιστότητα του ενισχυμένου τμήματος. Έτσι, οι συνθήκες της PCR τροποποιούνται με τέτοιο τρόπο, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη ακρίβεια, αξιοπιστία και αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Η ανάλυση των προϊόντων της PCR, έπειτα, ολοκληρώνεται συνήθως με το διαχωρισμό βάσης μεγέθους μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

2.3.2. Αντίδραση της ενίσχυσης

Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες των 200μL. Ενισχύθηκαν 4μL γενωμικού DNA από κάθε δείγμα σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μL, ο οποίος περιελάμβανε εκτός από το DNA, τα δύο ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές, την πολυμεράση, MgCl₂, απεσταγμένο νερό, ένα ρυθμιστικό διάλυμα και NTPs με τις εξής ποσότητες:

- 31μL απεσταγμένο νερό
- 5μL GeneAmp 10x PCR Buffer II (100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl; Perkin Elmer)
- 5μL MgCl₂ 2.5mM (Perkin Elmer)
- 4μL διαλύματος dNTPs (dCTP, dGTP, dATP, dTTP, καθένα σε συγκέντρωση 2mM)
- 0.3μL εκκινητή 1 (forward) 0.5μM (Life Technologies)
- 0.3μL εκκινητή 2 (reverse) 0.5μM (Life Technologies)
- 0.4μL AmpliTaq Gold πολυμεράση 5U/μL (Perkin Elmer)

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν διατηρημένα στους -20°C .

Δραστηριότητα του PCR buffer II

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα χρησιμοποιείται χάρη στην ιδιότητά του να διατηρεί σταθερό το pH, γεγονός που είναι απαραίτητο για τη σωστή δράση της AmpliTaq Gold πολυμεράσης.

Συγκέντρωση MgCl_2

Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο που μπορεί να επηρεάσει την πρόσδεση των εκκινητών, την αποδιάταξη των κλώνων του DNA και προ πάντων τη δραστηριότητα της πολυμεράσης. Η βέλτιστη συγκέντρωση MgCl_2 ποικίλλει περίπου από μια τιμή 0.5mM έως 5mM. Στο διάστημα μεταξύ των βέλτιστων τιμών, τα ελεύθερα ιόντα ασβεστίου επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου και σχηματίζουν διαλυτά συμπλέγματα με τα dNTPs προκειμένου να παραχθεί το υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση.

Συγκέντρωση των dNTPs

Μια μην ισορροπημένη συγκέντρωση των τεσσάρων dNTPs στο μίγμα της αντίδρασης θα μπορούσε να μεταβάλλει την ποσότητα των ελεύθερων ιόντων ασβεστίου, παρεμποδίζοντας επομένως τη δραστηριότητα της πολυμεράσης και μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

Αλληλουχίες και συγκέντρωση των εκκινητών

Η επιτυχία της PCR εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση και τις αλληλουχίες των εκκινητών. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των εκκινητών είναι μεταξύ 0.1 μM και 0.5 μM . Μια υψηλότερη συγκέντρωση θα μπορούσε να προωθήσει μια λανθασμένη πρόσδεση και τη συσσώρευση μη συγκεκριμένων προϊόντων, ενώ μια χαμηλότερη συγκέντρωση θα προκαλούσε την εξάντληση των εκκινητών πριν το τέλος της αντίδρασης, έχοντας ως αποτέλεσμα μια μικρότερη ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Για το γονίδιο CO1:

JB3 (forward) 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3' (Tm=57,6 $^{\circ}\text{C}$)

JB4.5 (reverse) 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3' (Tm=50,8 $^{\circ}\text{C}$)

Για το γονίδιο ND1:

eqND1 (forward) 5'-AGGTTTGCCGATTTGTTGAAG-3' (Tm=55,9 $^{\circ}\text{C}$)

eqND1 (reverse) 5'-CAACAGCATAAGCGCAAAAATAAC-3' (Tm=58,5 $^{\circ}\text{C}$)

Χαρακτηριστικά της Taq πολυμεράσης

Η Taq πολυμεράση προέρχεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, που ζει στο νερό σε θερμοκρασία 75°C. Η AmpliTaq Gold πολυμεράση, που χρησιμοποιήθηκε, προέρχεται από μια τροποποιημένη μορφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την DNA πολυμεράση ενός παρόμοιου οργανισμού. Η θερμοανθεκτικότητά του επιτρέπει στο ένζυμο να επιζήσει στις θερμοκρασίες αποδιάταξης των κλώνων του DNA (95°C) και η μέγιστη δραστηριότητα πολυμερισμού στους 72°C επιτρέπει την ακριβή πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο τους. Σε μια χαμηλότερη θερμοκρασία, οι εκκινητές θα μπορούσαν να ενωθούν με το DNA σε θέσεις, στις οποίες οι αλληλουχίες μπορούν να είναι ελαφρώς διαφορετικές από την αλληλουχία-στόχο. Στην περίπτωση που αυτές οι λανθασμένες ενώσεις (mismatches) βρίσκονται στους αντίθετους κλώνους του DNA σε πολύ κοντινές θέσεις, είναι δυνατό να γίνει μια μη ακριβής ενίσχυση και, δεδομένου ότι στο συντιθέμενο τμήμα ενσωματώνονται οι σωστές συμπληρωματικές αλληλουχίες των εκκινητών, το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή μιας διαφορετικής αλληλουχίας από την επιθυμητή. Σε υψηλότερη θερμοκρασία, η πρόσδεση των εκκινητών σε διαφορετικές θέσεις από τις επιθυμητές είναι σημαντικά μειωμένη κι έτσι δεν επαληθεύεται κάποια ενίσχυση διαφορετικών αλληλουχιών από τις αλληλουχίες-στόχους.

Η Taq πολυμεράση επομένως, αυξάνει την εξειδίκευση και την ευαισθησία της PCR. Χάρη στη θερμοανθεκτικότητά της, από τη στιγμή που θα προστεθεί στην αρχή της αντίδρασης, παραμένει ενεργή για μια πλήρη σειρά κύκλων ενίσχυσης. Εφόσον ενεργοποιείται από υψηλές θερμοκρασίες, πρέπει πάντα να διατηρείται σε πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του μείγματος της PCR. Όταν δεν χρησιμοποιείται, συντηρείται στους -20°C.

Συνθήκες της αντίδρασης

Η αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA που κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (CO1) ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τη συσκευή για PCR Perkin Elmer–Gene Amp PCR System 2400 στις ακόλουθες συνθήκες:

- 10min στους 94°C (αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA)
- 30 κύκλοι των
 - 30sec στους 94°C (πλήρης αποδιάταξη)
 - 40sec στους 52°C (πρόσδεση των εκκινητών στις αλληλουχίες-στόχους)
 - 45sec στους 72°C (πολυμερισμός του DNA)
- 7min στους 72°C (τελική επιμήκυνση)

Η αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA που κωδικοποιεί την αφυδρογονάση 1 του NADH (ND1) ενισχύθηκε στις ακόλουθες συνθήκες:

- 10min στους 94°C (αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA)
- 35 κύκλοι των
 - 30sec στους 94°C (πλήρης αποδιάταξη)
 - 45sec στους 50°C (πρόσδεση των εκκινητών στις αλληλουχίες-στόχους)
 - 40sec στους 72°C (πολυμερισμός του DNA)
- 7min στους 72°C (τελική επιμήκυνση)

2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Μετά το τέλος της PCR, ηλεκτροφορήθηκαν 5μL του προϊόντος της ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο παρασκευάστηκε με τη διάλυση 0.6gr αγαρόζης (Promega, melting point 87-89°C, gelling point 36-39°C, moisture<10%, sulfate<0.15%, DNase/RNase free) σε 60mL TBE 0.5x pH8.3 (54gr Tris Borate, 27.5gr Boric Acid, 20mL EDTA 0.5M pH8.0 και αποστειρωμένο νερό, τόσο ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 1000mL).

Σε 5μL από το κάθε δείγμα προς εξέταση, σε 5μL ενός θετικού δείγματος (θετικός μάρτυρας) και σε ένα άδειο σωληνάκι Eppendorf (αρνητικός μάρτυρας), προστέθηκαν 0.5μL DNA fluor (BioMedic) και 1μL loading buffer (BioMedic) και μαζί με ένα Eppendorf, που περιείχε 3μL μάρτυρα, μέσω του οποίου υπολογίστηκε το μέγεθος του DNA κάθε δείγματος (marker Promega 100bp DNA Ladder), επωάστηκαν για 5-7min στους 60°C.

Μετά την επώαση, τα μείγματα φορτώθηκαν στο gel και εφαρμόστηκε διαφορά δυναμικού 110V στα ηλεκτρόδια της συσκευής ESP 200–Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply, με αποτέλεσμα το DNA να αρχίσει να τρέχει προς την κάθοδο, εφόσον είναι ένα μακρομόριο αρνητικά φορτισμένο, με μια ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη με τις διαστάσεις του, ώστε να διαχωρίζονται τα διάφορα κλάσματά του. Μετά το πέρας 20 περίπου λεπτών, ακολούθησε έκθεση του gel σε συσκευή υπεριώδους. Για την παρατήρηση και αποθήκευση των εικόνων, που προέκυψαν από την έκθεση αυτή, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MULTI-ANALYST (έκδοση 1.1-Biorad).

Πλεονεκτήματα χρήσης DNA fluor

Το DNA fluor προτιμάται σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο, καθώς είναι υδατοδιαλυτό, εύκολο στη χρήση και σε αντίθεση με το βρωμιούχο αιθίδιο, δεν εμφανίζει καμία τοξικότητα. Επιπλέον, αποφεύγονται προβλήματα χρωματισμού του

gel, που οφείλονται στο βρωμιούχο αιθίδιο, όπως ανομοιογένεια εξάπλωσης στο gel, η συγγένεια πρόσδεσής του στο DNA είναι 10^5 φορές υψηλότερη από αυτή του βρωμιούχου αιθιδίου και η συγκέντρωση που απαιτείται για το χρωματισμό του DNA είναι 10^4 φορές μικρότερη από αυτή του βρωμιούχου αιθιδίου.

2.5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Για να ετοιμαστούν τα προϊόντα της PCR για αλληλούχιση έπρεπε πρώτα να καθαριστούν κι αυτό επιτεύχθηκε με τη βοήθεια του kit αντιδραστηρίων Nucleospin[®] extract 2 in 1 της Macherey-Nagel σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Αναμιγνύονται τέσσερις όγκοι του ρυθμιστικού διαλύματος NT2 (Macherey-Nagel) με έναν όγκο του δείγματος (στη συγκεκριμένη περίπτωση 180μL ρυθμιστικού διαλύματος NT2 προστέθηκαν σε 45μL του προϊόντος της PCR).
- Το παραπάνω μείγμα μεταφέρεται εντός της στήλης καθαρισμού, η οποία βρίσκεται μέσα σε σωλήνα των 2μL και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1min στις 11000 στροφές. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το DNA βρίσκεται εντός του φίλτρου της στήλης καθαρισμού και για το λόγο αυτό απορρίπτεται το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής των 2μL.
- Πραγματοποιείται μια πρώτη πλύση με την προσθήκη 600μL ρυθμιστικού διαλύματος NT3 (Macherey-Nagel) στη στήλη και φυγοκέντρωση για 1min στις 11000 στροφές. Απομακρύνεται και πάλι το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής.
- Πραγματοποιείται δεύτερη πλύση με την προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος NT3 (Macherey-Nagel) στη στήλη καθαρισμού και φυγοκέντρωση για 2 min στις 11000 στροφές. Το περιεχόμενο του σωλήνα απομακρύνεται και για την απομάκρυνση όποιας ποσότητας αιθανόλης, που περιέχεται στο NT3 και θα μπορούσε να επηρεάσει τις περαιτέρω αντιδράσεις, οι στήλες τοποθετούνται ανοικτές σε υδατόλουτρο στους 70°C για 2-5min, έτσι ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη.
- Οι στήλες μεταφέρονται σε σωληνάκι Eppendorf του 1.5mL και προστίθενται 30μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης NE (5mM Tris/HCl pH8.5), (Macherey-Nagel). Μετά από περίπου 1min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ακολουθεί τελική φυγοκέντρωση για 1min στις 11000 στροφές και το καθαρό DNA συλλέγεται εντός του σωλήνα.

Γενική αρχή της μεθόδου

Με τη βοήθεια της παραπάνω μεθόδου, το DNA συνδέεται σε μία μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου λόγω της παρουσίας χαοτροπικών αλάτων (ρυθμιστικό διάλυμα NT2). Συστατικά όπως άλατα και διαλυτά μακρομόρια, απομακρύνονται με ένα απλό βήμα έκπλυσης με το αιθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα NT3 και το καθαρό DNA τελικά εκλούεται με τη βοήθεια του ελαφρώς αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος NE (5mM Tris-Cl, pH8.5).

2.6. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Τα προϊόντα της PCR, μετά τον καθαρισμό στάλθηκαν στην MWG-BIOTECH και στη συνέχεια ευθυγραμμίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Clustal W. (1.8) Multiple Sequence Alignments. Μετά την ευθυγράμμιση, ήταν απαραίτητος ένας λεπτομερής έλεγχος με τη βοήθεια του προγράμματος CHROMAS (έκδοση 1.42), έτσι ώστε να διορθωθούν τυχόν λάθη της ευθυγράμμισης.

Με βάση αυτές τις ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις με τη βοήθεια της παραμέτρου 2 του Kimura (Kimura, 1980), τόσο μεταξύ των διαφόρων ατόμων που αναλύθηκαν, όσο και μεταξύ των διαφόρων στελεχών που προέκυψαν. Η παράμετρος αυτή επιλέχθηκε γιατί μπορεί να υπολογίσει τη διαφορετική σημασία των μεταπτώσεων και των μεταστροφών.

Έπειτα, με βάση αυτές τις γενετικές αποστάσεις, που υπολογίστηκαν για τα δύο μιτοχονδριακά γονίδια που μελετήθηκαν, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα (ικανά να εξηγήσουν την ομοιότητα με βάση τους χαρακτήρες που μελετήθηκαν και χωρίς αυτή η ομοιότητα να έχει απαραίτητως επίπτωση στην εξέλιξη) με τη βοήθεια της μεθόδου UPGMA (Unweighted Pair Groups Methods using Averages). Για αυτόν τον τύπο ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA 2.0 (Kumar *et al.*, 2001).

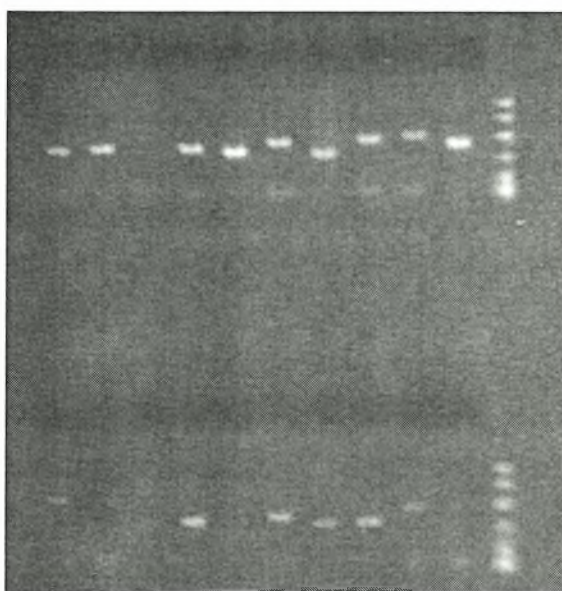
Για την ανάλυση της γενετικής ροής μεταξύ των πληθυσμών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNAsp 3.00 (Rozas και Rozas, 1999).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

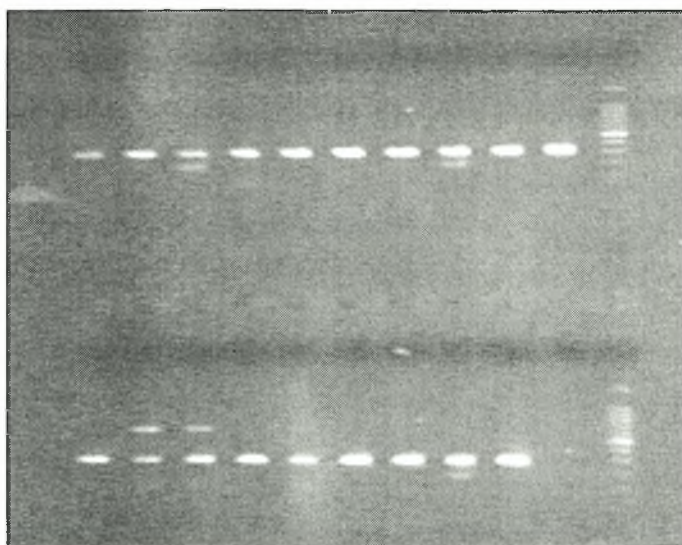
3.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ PCR

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε για 107 δείγματα, αλλά έχουν ληφθεί υπόψη μόνο εκείνα, των οποίων η ενίσχυση έδωσε καλά ορατά τμήματα DNA, μετά από έκθεση σε διαφανοσκόπιο UV.

Η ενίσχυση της περιοχής CO1 έδωσε τμήματα περίπου 450bp ενώ η ενίσχυση της περιοχής ND1 έδωσε τμήματα περίπου 390bp (Εικ. 10, 11).



Εικόνα 10: Τμήματα DNA, που προέκυψαν μετά την ενίσχυση της περιοχής CO1.



Εικόνα 11: Τμήματα DNA, που προέκυψαν μετά την ενίσχυση της περιοχής ND1.

3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Μετά από τον καθαρισμό και την αλληλούχιση αυτών των τμημάτων, οι αποκτηθείσες αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν με το πρόγραμμα CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Η ευθυγράμμιση που προέκυψε, ελέγχθηκε έπειτα με το χέρι, προκειμένου να αποκλειστούν τα τμήματα της αλληλουχίας, που δεν ήταν παρόντα σε όλα τα άτομα και προκειμένου να βελτιωθεί η ομολογία στην περίπτωση λαθών του προγράμματος. Οι ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες αναλύθηκαν στη συνέχεια με το πρόγραμμα MEGA 2.0 (Kumar *et al.*, 2001). Υπολογίστηκε η νουκλεοτιδική σύσταση σε ποσοστά, προκειμένου να αποδειχθούν οι διαφορές (A+T) και (G+C) μεταξύ του γονιδίου που κωδικοποιεί την CO1 και εκείνου που κωδικοποιεί την ND1. Η μέση τιμή της σύνθεσης AT των αλληλουχιών, που ήταν σχετικές με το μιτοχονδριακό γονίδιο CO1 ήταν 63.7%, ενώ στις αλληλουχίες σχετικές με το γονίδιο ND1 ήταν 65,3%. Αυτά τα στοιχεία επιβεβαιώνουν το αυξημένο ποσό AT στο μιτοχονδριακό DNA, το οποίο είναι στην πραγματικότητα ένα χαρακτηριστικό σταθερό και αντιπροσωπεύει έναν από τους λόγους της αυξημένης ποικιλομορφίας του, από τη στιγμή που τέτοιοι δεσμοί μπορούν να είναι μείζονα θέματα στις οξειδωτικές βλάβες και στη δημιουργία λαθών στην αντιγραφή.


Στους πίνακες 3 και 4 φαίνονται τα μεταβλητά στοιχεία στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, που είναι σχετικές με τα δύο μιτοχονδριακά γονίδια που μελετήθηκαν. Στο μεγαλύτερο μέρος των περιπτώσεων, η ποικιλομορφία αντιστοιχούσε στην τρίτη θέση των τριπλετών, που κωδικοποιούν τα διάφορα αμινοξέα. Είναι γνωστό ότι η επιλογή ενεργεί προκειμένου να συντηρηθούν, όσο το δυνατόν καλύτερα, οι περιοχές κωδικοποίησης, επιτρέποντας στο μέγιστο δυνατό την ποικιλομορφία των νουκλεοτιδικών θέσεων που δεν καθορίζουν αλλαγές στις αλληλουχίες αμινοξέων (σιωπηλές μεταλλάξεις).

Πίνακας 3: Πολυμορφικές θέσεις στις αλληλουχίες του μιτοχονδριακού γονιδίου CO1 των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Πάνω φαίνονται οι ακριβείς θέσεις του πολυμορφισμού, που προέκυψαν από την αλληλούχιση με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTALW.

```

Identical=. Missing=? Indel=-;
!Domain=Data;
[
      1111111122 2222222]
[
      1566799 124789901 2345667]
[
      2787625458 0569867988 7481692]
#ASARD      T G GCGTGG GCGAGCGG G AGGGATG
#ISARD      .T.T..... .C. ....
#G2M84662   . . . . . . . . . . . . . . . .
#G1DQ062857
#G3M84663   . . T . . . . . . . . . . . . . .
#FSARD      . . . . . . . . . . . . . . . .
#CSARD      . . . . . . . . . . . . . . . .
#ESARD      . . . . . . . . . . . . . . . .
#DSARD      . . . . . . . . . . . . . . . .
#BSARD      . . . . . . . . . . . . . . . .
#LSARD      . . . . . . . . . . . . . . . .
#GSARD      . . . . . . . . . . . . . . . .
#HSARD      . . . . . . . . . . . . . . . .
#DOLE      . . T . . . . . . . . . . . .
#BOLE      . . T . . . . . . . . . . . .
#EOLE      . . T . . . . . . . . . . . .
#COLE      . . T . . . . . . . . . . . .
#AOLE      . . . . . . . . . . . . . . . .
#FOLE      . . . . . . . . . . . . . . . .
#GFIA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#AFIA      . . T . . . . . . . . . . . .
#CFIA      . . T . . . . . . . . . . . .
#DFIA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#BFIA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#EFIA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#FFIA      . . T . . . . . . . . . . . .
#CROMA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#FROMA      . . T . . . . . . . . . . . .
#AROMA      . . T . . . . . . . . . . . .
#DROMA      . . T . . . . . . . . . . . .
#BROMA      . . T . . . . . . . . . . . .
#HROMA      . . T . . . . . . . . . . . .
#MROMA      . . T . . . . . . . . . . . .
#NROMA      . . T . . . . . . . . . . . .
#EROMA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#GROMA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#IROMA      . . T . . . . . . . . . . . .
#S.MAR      . . . . . . . . . . . . . . . .
#LROMA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#TO2        . . . . . . . . . . . . . . . .
#TO5        . . . . . . . . . . . . . . . .
#PROMA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#RROMA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#CP         . . . . . . . . . . . . . . . .
#TROMA      . . . . . . . . . . . . . . . .
#OV1F1      . . . . . . . . . . . . . . . .
#OV2F2      . . . . . . . . . . . . . . . .
#APOR       . . . . . . . . . . . . . . . .
#CPOR       . . T . . . . . . . . . . . .
#DPOR       . . T . . . . . . . . . . . .
#EPOR       . . T . . . . . . . . . . . .
#IPOR       . . . . . . . . . . . . . . . .
#FPOR       . . . . . . . . . . . . . . . .
#GPOR       . . . . . . . . . . . . . . . .
#BPOR       . . T . . . . . . . . . . . .
#HPOR       . . . . . . . . . . . . . . . .
#LPOR       . . . . . . . . . . . . . . . .
#MPOR       . . . . . . . . . . . . . . . .
#AARG       . . . . . . . . . . . . . . . .
#BARG       . . . . . . . . . . . . . . . .
#CARG       . . . . . . . . . . . . . . . .
#ASLO       GTTTATTAAA TTTGA.TACT GATACCT
#DSLO       GTTTATTAAA TTTGA.TACT GATACCT
#CSLO       GTTTATTAAA TTTGA.TACT GATACCT
#ESLO       GTTTATTAAA TTTGA.TACT GATACCT
#G7M84667   GTTTATTAAA TTTGA.TACT GATACCT
  
```


**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ
ΚΑΘΕ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ**

 = ποικιλομορφία, αλλά όχι χαρακτηριστική για να καθορίσει κάποιο στέλεχος

Πίνακας 4: Πολυμορφικές θέσεις στις αλληλουχίες του μιτοχονδριακού γονιδίου ND1 των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Πάνω φαίνονται οι ακριβείς θέσεις του πολυμορφισμού, που προέκυψαν από την αλληλούχιση με τη βοήθεια του προγράμματος CLUSTALW.

Identical=, Missing=? Indel=-;
!Domain=Data;

	1111	1111111111	111122222
[122336777	8899990233	4444556667 778911223]
[9356690058	1301362889	0147362891 679219186]
#G1AY572546	G TGCAGGAA	GCGATTACAG	GCCCCGGCGC CATGGCAAG
#G2AJ237633	G.....
#G3AJ237634	G.....
#FSARD
#BOLE	.G.....
#GFIA
#AFIA	.G.....
#CFIA	.G.....
#DFIA
#EFIA
#FROMA	.G.....
#AROMA	.G.....
#BROMA	.G.....
#MROMA	.G.....
#NROMA	.G.....
#OROMA	.G.....
#EROMA
#GROMA
#HPOR
#ISARD	.G.....
#LROMA
#CPOR	.G.....
#TROMA
#PROMA
#QROMA
#RROMA
#LSARD
#BFIA
#FFIA	.G.....
#CROMA
#TO2
#TO4
#TO5
#OV1F1
#OV1F2
#OV2F1
#OV2F2
#CP
#GPOR
#MPOR
#GSLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#HSLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#FSLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#LSLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#NSLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#MSLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#BSLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#ASLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#CSLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#ESLO	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.
#G7AJ237638	A.AATGATGG	ATTGGGGTTA	TGTTAAATTT TTC.ATGT.



**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ
ΚΑΘΕ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ**

Με το γονίδιο ND1
δεν είναι δυνατή η
διάκριση μεταξύ
G2 και G3

■ = ποικιλομορφία,
αλλά όχι
χαρακτηριστική για
να καθορίσει κάποιο
στέλεχος

3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ *E. GRANULOSUS*

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας καθορίστηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη του είδους *E. granulosus*: G1 (στέλεχος προβάτων), G2 (στέλεχος τασμανικών προβάτων), G3 (στέλεχος βουβάλων) και G7 (στέλεχος χοίρων), (Πιν.5).

Σε όλες τις περιπτώσεις, στις οποίες ήταν δυνατό να χαρακτηριστούν τα άτομα και για τα δύο μιτοχονδριακά γονίδια που αναλύθηκαν, υπήρξε συμφωνία των αποτελεσμάτων. Με βάση όμως το γονίδιο ND1 δεν ήταν δυνατή η διάκριση μεταξύ G2 και G3, οπότε, στην περίπτωση αυτή, τα δείγματα θεωρήθηκε ότι ανήκαν στο στέλεχος που έδειχνε το CO1.

Οι υδατίδες κύστες, που ανήκαν στο στέλεχος G1 βρέθηκαν σε πρόβατα και βοοειδή της Σαρδηνίας, του Λάτσιο, της Πορτογαλίας και της Αργεντινής και ήταν συνολικά εικοσιεννέα. Μόνο σε ένα βοοειδές της Σαρδηνίας προσδιορίστηκε μία κύστη G2. Κύστες που ανήκαν στον G3 γενότυπο βρέθηκαν στα πρόβατα του Λάτσιο (έξι), της Πορτογαλίας (τέσσερις) και σε όλους τους ασθενείς που εγχειρίστηκαν στην Πολυκλινική Gemmelli της Ρώμης (εννέα), εκτός από έναν, που είχε μία κύστη που ανήκε στο στέλεχος G1. Επιπλέον, μία κύστη προερχόμενη από μια αντιλόπη του Νείλου, από το βιοπάρκο της Ρώμης προσδιορίστηκε σαν G3.

Οι κύστες, που προερχόταν από χοίρους της Σλοβακίας, προσδιορίστηκαν όλες σαν G7, στέλεχος χαρακτηριστικό των χοίρων και της περιοχής της κεντρικής Ευρώπης.

Στο Λάτσιο οι κύστες που χαρακτηρίστηκαν ως G1 και G3 ήταν παρόμοιου αριθμού, δέκα G1 και δεκαέξι G3, παρά το γεγονός ότι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπήρχε μια επικράτηση των κύστεων G3 στην περίπτωση των προσδιορισμών από ανθρώπινες περιπτώσεις. Στη Σαρδηνία βρέθηκε μια καθαρή επικράτηση των κύστεων G1 (εννέα), εκτός από μία μεμονωμένη περίπτωση G2. Στην Πορτογαλία, η κατάσταση ήταν παρόμοια με αυτή του Λάτσιο, με παρόμοιους αριθμούς κύστεων G1 και G3, επτά και τέσσερις αντίστοιχα. Στην Αργεντινή προσδιορίστηκαν μόνο κύστες του στελέχους G1.

Πίνακας 5: Κατάλογος των δειγμάτων που εξετάστηκαν και αλληλουχήθηκαν για τα δύο μιτοχονδριακά γονίδια και κατάταξή τους, σε όποια ήταν δυνατή, στο αντίστοιχο στέλεχος στο οποίο ανήκουν.

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ CO1	ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ ND1
ΣΑΡΔΗΝΙΑ	ΠΡΟΒΑΤΟ	A SARD	G1	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	B SARD	G1	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	C SARD	G1	
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	D SARD	G1	
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	E SARD	G1	
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	F SARD	G1	G1
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	G SARD	G1	
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	H SARD	G1	

ΣΑΡΔΗΝΙΑ	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	I SARD	G2	G2
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	L SARD	G1	G1
OLEVANO ROMANO	ΠΡΟΒΑΤΟ	A OLE	G1	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	B OLE	G3	G3
	ΠΡΟΒΑΤΟ	C OLE	G3	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	D OLE	G3	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	E OLE	G3	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	F OLE	G1	
FIANO ROMANO	ΠΡΟΒΑΤΟ	A FIA	G3	G3
	ΠΡΟΒΑΤΟ	B FIA	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	C FIA	G3	G3
	ΠΡΟΒΑΤΟ	D FIA	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	E FIA	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	F FIA	G3	G3
	ΠΡΟΒΑΤΟ	G FIA	G1	G1
ΡΩΜΗ	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	A ROMA	G3	G3
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	B ROMA	G3	G3
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	C ROMA	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	D ROMA	G3	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	E ROMA	G1	G1
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	F ROMA	G3	G3
	ΠΡΟΒΑΤΟ	G ROMA	G1	G1
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	H ROMA	G3	
	ΛΙΚΙ του ΝΕΙΛΟΥ	I ROMA	G3	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	L ROMA	G1	G1
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	M ROMA	G3	G3
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	N ROMA	G3	G3
	ΑΝΘΡΩΠΟΣ	O ROMA		G3
	ΠΡΟΒΑΤΟ	P ROMA	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	Q ROMA		G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	R ROMA	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	T ROMA	G1	G1
	ΑΓΡΙΟΣ ΧΟΙΡΟΣ	CP	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	OV1F1	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	OV1F2		G1
ΠΡΟΒΑΤΟ	OV2F1		G1	
ΠΡΟΒΑΤΟ	OV2F2	G1	G1	
S.MARINELLA	ΠΡΟΒΑΤΟ	S. MAR	G1	
ΤΟΡΙΝΟ	ΠΡΟΒΑΤΟ	TO2	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	TO4		G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	TO5	G1	G1
ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ	ΠΡΟΒΑΤΟ	A POR	G1	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	B POR	G3	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	C POR	G3	G3
	ΠΡΟΒΑΤΟ	D POR	G3	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	E POR	G3	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	F POR	G1	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	G POR	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	H POR	G1	G1
	ΠΡΟΒΑΤΟ	I POR	G1	
	ΠΡΟΒΑΤΟ	L POR	G1	
ΠΡΟΒΑΤΟ	M POR	G1		
ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	A ARG	G1	
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	B ARG	G1	
	ΒΟΟΕΙΔΕΣ	C ARG	G1	
ΣΛΟΒΑΚΙΑ	ΧΟΙΡΟΣ	A SLO	G7	G7
	ΧΟΙΡΟΣ	B SLO		G7
	ΧΟΙΡΟΣ	C SLO	G7	G7
	ΧΟΙΡΟΣ	D SLO	G7	
	ΧΟΙΡΟΣ	E SLO	G7	G7
	ΧΟΙΡΟΣ	F SLO		G7

ΣΛΟΒΑΚΙΑ	ΧΟΙΡΟΣ	G SLO		G7
	ΧΟΙΡΟΣ	H SLO		G7
	ΧΟΙΡΟΣ	L SLO		G7
	ΧΟΙΡΟΣ	M SLO		G7
	ΧΟΙΡΟΣ	N SLO		G7

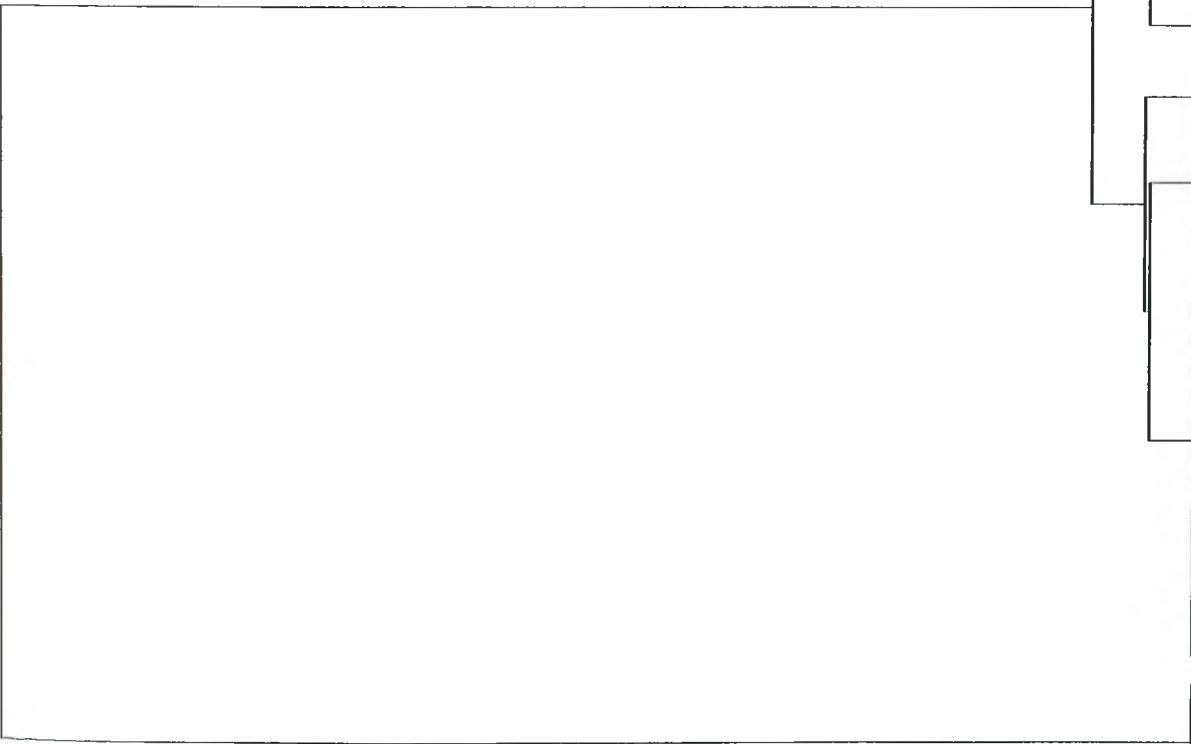
3.4. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που μελετήθηκαν υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις με τη βοήθεια της παραμέτρου 2 του Kimura και με τη βοήθεια αυτών κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο UPGMA φυλογενετικά δέντρα, που δείχνουν τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ατόμων που μελετήθηκαν (Εικ.10,11). Τα δύο δέντρα που δημιουργήθηκαν για τις δύο γενομικές περιοχές που μελετήθηκαν (CO1 και ND1), αν και δεν αποτελούνται ακριβώς από τα ίδια άτομα, εμφανίζουν παρόμοιες τοπολογίες.

Είναι δυνατό να διακριθούν τρεις ομάδες, που διαχωρίζουν σαφώς τους γενοτύπους G1, G3 και G7 και στα δύο δέντρα. Τα άτομα που ανήκουν στο στέλεχος G7, που είναι χοίροι από τη Σλοβακία, είναι και στα δύο δέντρα γενετικά πιο διαφοροποιημένα σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα. Το μόνο άτομο που προσδιορίστηκε ως G2, περιλήφθηκε στην ομάδα των ατόμων που προσδιορίστηκαν ως G3.

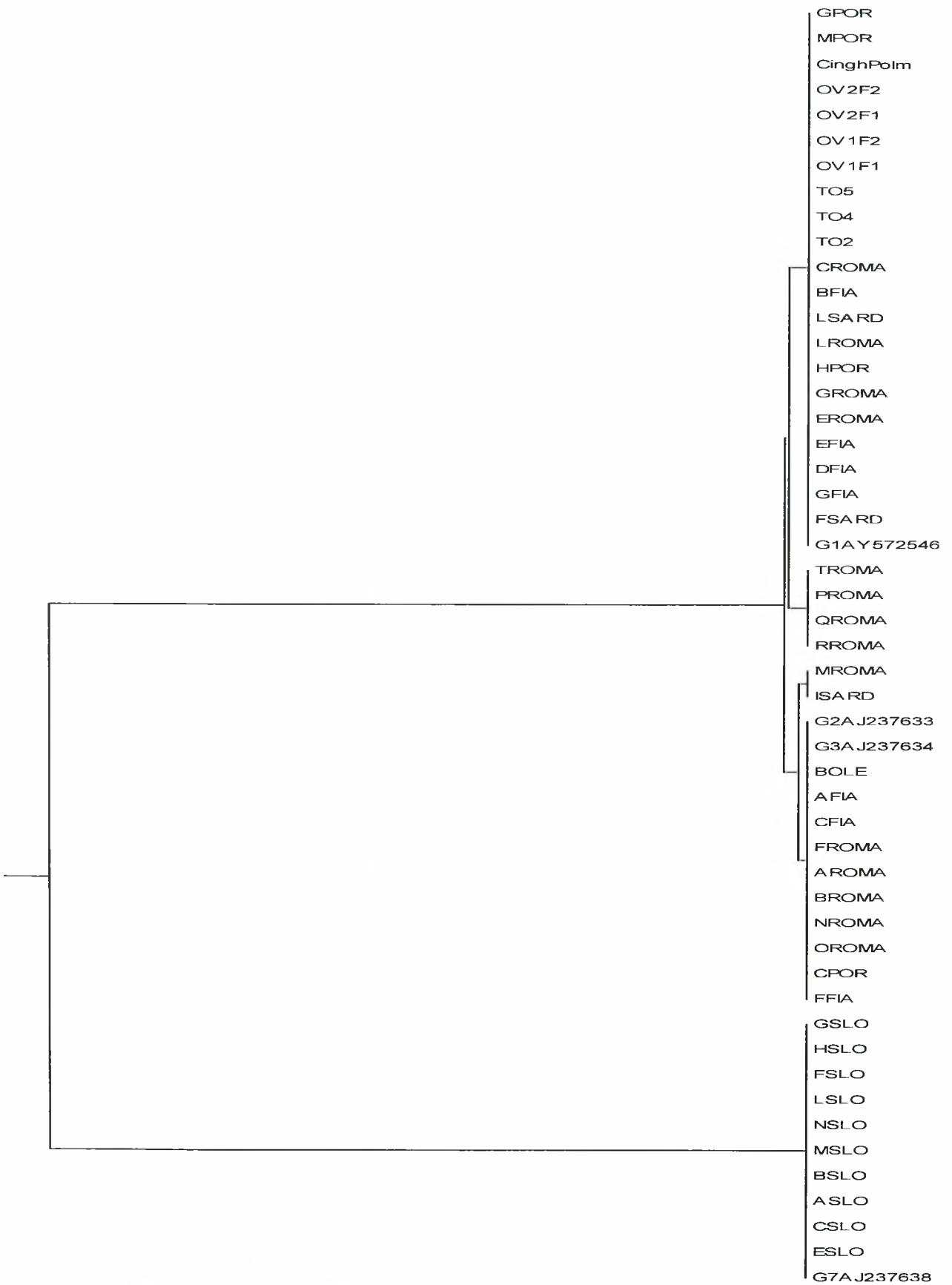
Από τη στιγμή που τα διάφορα στελέχη μπορούν να προσδιοριστούν με βάση τους σταθερούς χαρακτηριστικούς απλότυπους του καθενός, παρόλο που υπάρχει ένας μικρός βαθμός ποικιλομορφίας, η ανάλυση των φυλογενετικών δέντρων μπορεί να διαχωρίσει σαφώς τα άτομα που μελετήθηκαν στα διάφορα στελέχη, όχι μόνο με βάση μεμονωμένων νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων, αλλά με βάση μια συνολική ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας.

BAArg
 CAArg
 AArg
 MPor
 LPor
 HPor
 GPor
 FPor
 IPor
 APor
 OV2F2
 OV1F1
 TROMA
 CP
 RROMA
 PROMA
 To5
 To2
 S.Mar
 ERoma
 EFia
 GFia
 AOle
 GSard
 BSard
 ESard
 FSard
 ASARD
 G1DQ0628
 CSard
 DSard
 LSard
 HSard
 Fole
 BFia
 Croma
 GRoma
 LRoma
 DFia
 FFia
 IRoma
 CFia
 AFia
 ISARD
 G2M84662
 G3M84663
 DOle
 BOle
 EOle
 Cole
 FRoma
 Aroma
 DRoma
 BRoma
 HRoma
 MRoma
 NRoma
 CPor
 DPor
 EPor
 BPor
 ASlo
 DSlo
 CSlo
 ESlo
 G7M84667



0.01

Εικόνα 12: Φυλογενετικό δέντρο UPGMA, με βάση το μιτοχονδριακό γονίδιο CO1, που κατασκευάστηκε μέσω των γενετικών αποστάσεων, που υπολογίστηκαν με την παράμετρο Kimura 2 (Kimura, 1980).



Εικόνα 13: Φυλογενετικό δέντρο UPGMA, με βάση το μιτοχονδριακό γονίδιο ND1, που κατασκευάστηκε μέσω των γενετικών αποστάσεων, που υπολογίστηκαν με την παράμετρο Kimura 2 (Kimura, 1980).

3.5. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ

Μόλις προσδιορίστηκε ο γενότυπος των δειγμάτων με την αλληλούχιση και κατασκευάστηκαν τα φυλογενετικά δέντρα, υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις μέσα σε κάθε στέλεχος, αλλά και μεταξύ των στελεχών (Πιν.6,7) με τη βοήθεια της παραμέτρου 2 του Kimura.

Πίνακας 6: Τιμές των γενετικών αποστάσεων μέσα σε κάθε στέλεχος και μεταξύ των διαφόρων στελεχών του *E. granulosus* που ταυτοποιήθηκαν, υπολογισμένες με τη μέθοδο Kimura, με βάση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου CO1.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	G1	G2	G3	G7
G1	0.01			
G2	0.02	----		
G3	0.02	0.01	0.01	
G7	0.11	0.11	0.10	0.06

Πίνακας 7: Τιμές των γενετικών αποστάσεων μέσα σε κάθε στέλεχος και μεταξύ των διαφόρων στελεχών του *E. granulosus* που ταυτοποιήθηκαν, υπολογισμένες με τη μέθοδο Kimura, με βάση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου ND1.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	G1	G3	G7
G1	0.07		
G3	0.06	0.04	
G7	0.13	0.14	0.01

Από τους παραπάνω πίνακες, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι μεγαλύτερες τιμές γενετικής απόστασης είναι αυτές που προκύπτουν από τη σύγκριση του στελέχους G7 με τα υπόλοιπα στελέχη και πιστοποιούν επομένως τον καθαρό διαχωρισμό τους, όπως άλλωστε φάνηκε και στα φυλογενετικά δέντρα. Αντιθέτως, οι τιμές των γενετικών αποστάσεων εντός των στελεχών G1 και G3 είναι παρόμοιες με εκείνες μεταξύ των στελεχών G1 και G3, οπότε η γενετική απόσταση μεταξύ αυτών των στελεχών είναι σχεδόν ίδια με αυτή που υπάρχει στο εσωτερικό τους. Από τα δεδομένα αυτά δεν είναι δυνατό να αποκλειστεί η υπόθεση σύμφωνα με την οποία τα στελέχη G1 και G3 δεν είναι στην πραγματικότητα διαφορετικά στελέχη, αλλά το G3 θα μπορούσε να είναι μια ποικιλία του G1.

3.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΟΗ

Έχουν ήδη υποδιαιρεθεί τα διάφορα στελέχη σε πληθυσμούς σύμφωνα με τις γεωγραφικές προελεύσεις τους, όπου ο αριθμός των ατόμων που εξετάστηκαν το επέτρεπε, με σκοπό να υπολογιστεί ο βαθμός της γενετικής ροής (Πίν.8,9). Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNAsp 3.00 (Rozas και Rozas, 1999), που καθόρισε την παράμετρο Nm, που αντιπροσωπεύει το βαθμό της γενετικής ροής. Η παράμετρος αυτή καθορίζεται από τον τύπο:

$$Nm = [(1/Fst)-1]/4a = \text{γενετική ροή}$$

όπου N = δραστικό μέγεθος του πληθυσμού

m = ποσοστό μεταναστών του πληθυσμού

$$a = (n/n-1)^2$$

n = αριθμός πληθυσμών

Ο δείκτης Fst υπολογίζει την ποικιλομορφία μεταξύ των πληθυσμών και ποικίλλει από 1, στην περίπτωση στην οποία υπάρχει αυξημένη ποικιλομορφία και η γενετική ροή Nm είναι επομένως μηδενική, έως 0, στην περίπτωση στην οποία δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών που εμφανίζονται επομένως ομοιογενείς και έχουν πολύ υψηλή γενετική ροή.

Πίνακας 8: Τιμές γενετικής ροής μεταξύ των πληθυσμών των διαφόρων στελεχών, υπολογισμένες με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου CO1.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	G1	G3	G7
G1	2.24-9.75	0.26	0.01

Πίνακας 9: Τιμές γενετικής ροής μεταξύ των πληθυσμών των διαφόρων στελεχών, υπολογισμένες με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου ND1.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	G1	G3	G7
G1	3.47-3.67	0.96	0.01

Όσον αφορά τις σχετικές με το γονίδιο CO1 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, ο φαινοτυπικός πληθυσμός με γενότυπο G1 του Λάτσιο συγκρίθηκε με το φαινοτυπικό πληθυσμό με γενότυπο G3 της ίδιας περιοχής και διαπιστώθηκε ότι μεταξύ των δύο διακριτών γενότυπων υπάρχει μια μείωση της γενετικής ροής (Nm=0.26). Ο ίδιος υπολογισμός πραγματοποιήθηκε με βάση τις σχετικές με το γονίδιο ND1 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες έδωσε μια εκτίμηση της γενετικής ροής ίσης με Nm=0.96,

μια τιμή ελαφρώς κάτω από το όριο της τιμής 1, επάνω από το οποίο υπάρχει ένδειξη ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ των πληθυσμών.

Συγκρίνοντας μεταξύ τους, τους πληθυσμούς που ανήκουν στο γενότυπο G1, οι τιμές Nm της γενετικής ροής ποικίλουν μεταξύ 2.24 και 9.75. Τέτοιες τιμές αποδεικνύουν ένα υψηλό επίπεδο γενετικής ροής, ακόμη και μεταξύ μακρινών περιοχών.

Όσο αφορά το γενότυπο G7 των χοίρων της Σλοβακίας, σε σύγκριση με τους γενοτύπους G1 και G3, οι τιμές της γενετικής ροής ήταν και στις δύο περιπτώσεις $Nm=0.01$, δείχνοντας μια σαφή αναπαραγωγική απομόνωση μεταξύ αυτών των γενοτύπων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ακριβής προσδιορισμός στο επίπεδο είδους ή/και υποείδους μιας παρασιτικής νόσου έχει επιπτώσεις μεγάλης σπουδαιότητας για τον ταξινομικό καθορισμό, τη διάγνωση, επιδημιολογικές μελέτες και την εύρεση θεραπειών για τη νόσο. Αν και η μορφολογία παραμένει μεγάλης σπουδαιότητας στον καθορισμό των παρασίτων, ένας ακριβής καθορισμός των ειδών ή των πληθυσμών είναι κάποιες φορές αδύνατος, λόγω του ανεπαρκούς αριθμού πληροφοριακών μορφολογικών κριτηρίων, που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό. Οι γενετικές και μοριακές μέθοδοι, ηλεκτροφόρηση και τεχνολογίες ανασυνδυασμένου DNA, και ειδικότερα η ανακάλυψη της PCR (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986; Miesfeld, 1999), έχουν ασκήσει καθοριστική επίδραση σε πολλούς τομείς της παρασιτολογίας, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης της γενετικής σύνθεσης των πληθυσμών, της γενετικής έκφρασης, της διάγνωσης της μόλυνσης, της επιδημιολογίας, της μελέτη της αντίστασης στα φάρμακα και της παραγωγής εμβολίων.

Αυτές οι τεχνικές, ειδικότερα η ηλεκτροφόρηση και πιο πρόσφατα οι τεχνικές που βασίζονται στην PCR, έχουν εφαρμοστεί ευρέως τα τελευταία χρόνια και ειδικότερα στο είδος *E. granulosus* έχουν επιτρέψει την ταυτοποίηση γενετικά διακριτών ομάδων (στελεχών). Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ταυτοποιηθεί σε ποιο στέλεχος ανήκουν άτομα προερχόμενα από διάφορους ξενιστές και διάφορες γεωγραφικές περιοχές.

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η ανάλυση των αλληλουχιών έδειξε συνολικά έναν αυξημένο αριθμό πολυμορφικών τόπων, επιβεβαιώνοντας την αυξημένη γενετική ετερογένεια στα πλαίσια του είδους *E. granulosus*. Μέχρι τώρα, πιστευόταν ότι στη νοτιοδυτική Ευρώπη, και ειδικότερα στη Μεσόγειο, υπήρχε μόνο το στέλεχος G1 (στέλεχος προβάτων), που είναι το πιο κοινό (Bowles και McManus, 1991, 1993b; Eckert *et al.*, 2000; Battelli *et al.*, 2002). Επιπλέον, αυτό το στέλεχος φαινόταν ότι είναι το μόνο υπεύθυνο για την ανθρώπινη εχινοκοκκίαση στην περιοχή αυτή (Eckert και Thompson, 1997). Η παρούσα εργασία απέδειξε στην Ιταλία (στο Λάτσιο) και στην Πορτογαλία, εκτός από την παρουσία του G1, την παρουσία επίσης του στελέχους G3 (στέλεχος βουβάλων), ένα στέλεχος λίγο μελετημένο έως τώρα. Μέχρι τώρα, είχε βρεθεί μόνο σε βουβάλια της Ασίας, ειδικότερα στην Ινδία, (Bowles *et al.*, 1992). Κατά τη διάρκεια όμως της παρούσας εργασίας, το στέλεχος αυτό βρέθηκε τόσο σε κύστες προερχόμενες από πρόβατα, όσο και σε κύστες προερχόμενες από εγχειρισμένους ασθενείς στην Πολυκλινική Gemelli της Ρώμης, αποδεικνύοντας επομένως το γεγονός ότι το G1 δεν είναι το μοναδικό στέλεχος που

εμπλέκεται στην επιδημιολογία της ανθρώπινης εχίνοκοκκίασης στην περιοχή της Μεσογείου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η ανάλυση των αλληλουχιών που λήφθηκαν από μία κύστη που προερχόταν από μια αφρικανική αντιλόπη του βιοπάρκου της Ρώμης, που καλείται συνήθως Liki του Νείλου, και προσδιορίστηκε ότι ανήκε στο στέλεχος G3. Από τη στιγμή που δεν έχουμε πληροφορίες για την περίοδο παραμονής της στο βιοπάρκο, είναι πιθανό να μολύνθηκε εκεί, ακόμη κι αν δεν αποκλείεται η παρουσία του στελέχους G3 στην Αφρική. Επομένως, από την παρούσα εργασία προκύπτει η παρουσία του στελέχους G3 στην Ευρώπη επιβεβαιώνοντας την ανάγκη μελλοντικών ερευνών προκειμένου να μελετηθεί η πραγματική διάδοσή του.

Στη Σαρδηνία, η ανάλυση των αλληλουχιών απέδειξε την παρουσία του στελέχους G1, εκτός από ένα μεμονωμένο άτομο, που προσδιορίστηκε σαν G2. Σε αυτή την περιοχή, όπως και σε πολλές άλλες της Μεσογείου, υπήρχε πάντα μια υψηλή ενδημία του *E. granulosus*, λόγω ενός συνόλου ιδιαίτερων συνθηκών που διατηρούν και διαιωνίζουν το βιολογικό κύκλο του παρασίτου (Mantovani και Proserpi, 1994). Η οικονομία είναι βασισμένη κυρίως στην κτηνοτροφία, υπάρχουν πολλές αγροτικές οικογένειες που έχουν τις λάθος συνήθειες να εγκαταλείπουν τα ζώα του κοπαδιού που πεθαίνουν, με αποτέλεσμα να τα τρώνε οι σκύλοι, και επιπλέον να έχουν παράνομα σφαγεία, χωρίς κτηνιατρικό έλεγχο, και να τρέφουν έπειτα τους σκύλους με μολυσμένα εντόσθια προβάτων. Αυτοί οι σκύλοι έπειτα έρχονται σε άμεση επαφή με τον άνθρωπο, που μπορεί πολύ εύκολα να μολυνθεί.

Επιπρόσθετα, δεν πρέπει να θεωρηθεί εξαίρεση η ύπαρξη του στελέχους G2. Ένα τέτοιο στέλεχος, που προέρχεται από την Τασμανία, έχει πλέον εξαπλωθεί σε πολλές άλλες περιοχές, λόγω των συχνών εισαγωγών και εξαγωγών, ιδιαίτερα των προβάτων, που διευκολύνουν τη διάδοση των διαφόρων στελεχών πέρα από την περιοχή προέλευσής τους.

Στην Αργεντινή, η κατάσταση είναι παρόμοια με αυτή της Σαρδηνίας. Η εχίνοκοκκίαση είναι ενδημική και έχουν αναφερθεί πολυάριθμες ανθρώπινες περιπτώσεις (Rosenzvit *et al.*, 1999). Το πιο κοινό στέλεχος είναι το G1, αλλά υπάρχει η παρουσία επίσης των G2, G5, G6 και G7. Αυτό είναι φυσικό, λόγω της μεγάλης γεωγραφικής επέκτασης και των διαδεδομένων εισαγωγών βοοειδών από άλλα κράτη. Αντίθετα με άλλες περιοχές, όπως για παράδειγμα η Κένυα, στην οποία βρέθηκαν διάφορα στελέχη, αλλά μόνο το G1 φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την ανθρώπινη εχίνοκοκκίαση (Wachira *et al.*, 1993), στην Αργεντινή και τα στελέχη G2 και G6 βρέθηκαν στον άνθρωπο (Kamenetzky *et al.*, 2002). Κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας, η ανάλυση των κύστεων προβάτων προερχομένων από την Αργεντινή έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι αυτές ανήκουν στο στέλεχος G1, που όπως ήταν αναμενόμενο, είναι το πιο διαδεδομένο σε εκείνη την περιοχή.

Επίσης, στη Σλοβακία, όπως στο μεγάλο μέρος της ανατολικής Ευρώπης, η εχينوκοκκίαση είναι μια λοίμωξη μεγάλης σπουδαιότητας. Σε άλλες περιοχές της ανατολικής Ευρώπης, υπάρχει το στέλεχος G1, παρόλο που το πιο διαδεδομένο στέλεχος φαίνεται να είναι το G7, χαρακτηριστικό των κύστεων που προέρχονται από χοίρους. Επίσης, αυτό φαίνεται να είναι υπεύθυνο για τη μόλυνση του ανθρώπου (Kedra *et al.*, 1999; Šnábel *et al.*, 2000; Turčekoná *et al.*, 2003), ακόμα κι αν έχει υποθεθεί λόγω των διαφορών στα προϊόντα της ενίσχυσης μέσω PCR, η ύπαρξη ενός άλλου στελέχους που είναι υπεύθυνο για μεμονωμένα ανθρώπινα περιστατικά στην Πολωνία (Scott *et al.*, 1999). Η ανάλυση των μιτοχονδριακών αλληλουχιών, που αποκτήθηκαν από κύστες προερχόμενες από χοίρους της Σλοβακίας επιβεβαίωσε την παρουσία μόνο του στελέχους G7 σε αυτούς τους ενδιάμεσους ξενιστές.

Το μεγαλύτερο μέρος των κύστεων που λήφθηκαν από ανθρώπινες περιπτώσεις προσδιορίστηκαν ότι ανήκουν στο στέλεχος G3 και μόνο μια στο στέλεχος G1. Το στέλεχος G1 θεωρείται το πιο υπεύθυνο για τις ανθρώπινες περιπτώσεις (Thompson και Lymbery, 1988; Eckert και Thompson, 1997), και επιπλέον, ακόμη κι όπου υπήρχαν περισσότερα στελέχη σε μια γεωγραφική περιοχή, ένα μόνο από αυτά εμπλεκόταν στην πραγματικότητα με την επιδημιολογία της ανθρώπινης εχينوκοκκίασης. Για παράδειγμα, στην Κένυα, τα στελέχη G1 και G6 (στέλεχος καμηλών) βρέθηκαν σε κύριους και ενδιάμεσους ξενιστές, αλλά μόνο το G1 φαίνεται να είναι σε θέση να μολύνει τον άνθρωπο (Macpherson και McManus, 1982; Wachira *et al.*, 1993). Πρόσφατες μελέτες εντούτοις, έχουν αποδείξει ότι σε μερικές περιοχές της Αφρικής (για παράδειγμα στη Μαυριτανία), το στέλεχος G6 μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνο για την ανθρώπινη νόσο, προτείνοντας ότι κάποιοι μηχανισμοί μετάδοσης δεν εξαρτώνται από την εγγενή δυνατότητα ενός στελέχους να μολύνει τον άνθρωπο, αλλά ότι πιθανόν κάποιες κοινωνικο-οικονομικές ή περιβαλλοντικές αλλαγές καθορίζουν ποικιλομορφίες στην επιδημιολογία. Για παράδειγμα, στη Μαυριτανία, η χρησιμοποίηση των καμηλών για τη διατροφή καθορίζει την ύπαρξη σφαγείων, στα οποία οι υγειονομικές συνθήκες είναι πολύ χειρότερες από τα απαραίτητα πρότυπα. Σε άλλες μελέτες, αποδείχθηκε ότι σε πολλές περιοχές, υπάρχουν ταυτόχρονα πολλά στελέχη, όπως για παράδειγμα στην Αργεντινή, όπου τα στελέχη G2 και G6 μπορούν να καθορίσουν ανθρώπινες περιπτώσεις σε αξιοσημείωτες αναλογίες (Kamenetzky *et al.*, 2002).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία απέδειξαν για πρώτη φορά την ύπαρξη ανθρώπινων περιπτώσεων που οφειλόταν στο στέλεχος G3. Αυτό βρέθηκε στη Ρώμη, στην ευρύτερη περιοχή της οποίας αρκετά δείγματα βρέθηκε ότι ανήκαν στο στέλεχος αυτό.

Η ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σχετικών με τα δύο μιτοχονδριακά γονίδια που μελετήθηκαν δε βοήθησε μόνο στην ταυτοποίηση των

διαφόρων στελεχών του *E. granulosus* σε περιοχές όπου δεν είχαν πραγματοποιηθεί ποτέ τέτοιες μελέτες, αλλά επέτρεψε την αξιολόγηση της γενετικής διαφοροποίησης τόσο μέσα σε ένα στέλεχος, όσο και μεταξύ των στελεχών.

Έχει θεωρηθεί πιθανό ότι το στέλεχος G3 θα μπορούσε να είναι, όχι ένα ξεχωριστό στέλεχος, αλλά μία ποικιλία του στελέχους G1 (Bowles *et al.*, 1992). Στην πραγματικότητα, αναλύοντας τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές είναι ίδιες τόσο μέσα σε κάθε στέλεχος, όσο και μεταξύ των δύο στελεχών. Επιπλέον, ακόμη και τα φυλογενετικά δέντρα, που κατασκευάστηκαν αναλύοντας τις μιτοχονδριακές αλληλουχίες των γονιδίων CO1 και ND1 δεν αντικρούουν αυτή την υπόθεση. Στην πραγματικότητα, οι δύο ομάδες, G1 και G3, δε διαφέρουν σαφώς όπως συμβαίνει μεταξύ αυτών και της ομάδας G7. Επιπλέον, η ανάλυση της γενετικής ροής μεταξύ πληθυσμών σχετικών με τα δύο διαφορετικά στελέχη έχει δώσει τιμές κατώτερες του 1, (0.26 και 0.96). Τέτοιες τιμές, αν και είναι μεγαλύτερες από εκείνες που αφορούν τη γενετική ροή μεταξύ του στελέχους G7 και των G1 και G3, δείχνουν μειωμένη ανταλλαγή του γενετικού υλικού μεταξύ αυτών των ατόμων.

Το στέλεχος G7 έχει παρουσιάσει τιμές γενετικής διαφοροποίησης πιο ψηλές σε σύγκριση με τα άλλα στελέχη που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή, πιστοποιώντας έτσι τη διαφορετικότητά του.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ ατόμων που ανήκουν στο ίδιο στέλεχος. Τέτοια ποικιλομορφία, σε ερμαφρόδιτους οργανισμούς, θα επιβεβαίωνε την υπόθεση Rausch (1967), σύμφωνα με την οποία οι οργανισμοί αυτοί θα προτιμούσαν μια διασταυρούμενη γονιμοποίηση κι όχι αυτογονιμοποίηση, που παραμένει μια πιθανή επιλογή σε μερικές περιπτώσεις. Είναι σημαντικό ότι στις μολύνσεις των σκύλων, σε αντίθεση με αυτά που ισχύουν για τον άνθρωπο, η ένταση της μόλυνσης είναι μάλλον αυξημένη, αυξάνοντας επομένως τη δυνατότητα της ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ ατόμων.

Ο βαθμός της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των διαφόρων στελεχών, η αποτελεσματική παρουσία ιδιαίτερων χαρακτηριστικών σε καθένα από αυτά, τόσο σχετικά με την προτίμηση όσον αφορά τον ενδιάμεσο ξενιστή, όσο και σχετικά με τη γεωγραφική κατανομή, θέτει το ερώτημα αν αυτά τα στελέχη αντιπροσωπεύουν ποικίλες μορφές στο εσωτερικό ενός είδους, ή είναι στην πραγματικότητα διακριτές ταξινομικές οντότητες. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει ένας καθολικά αποδεκτός ορισμός της έννοιας του είδους. Ο περισσότερο χρησιμοποιημένος ορισμός είναι η γνωστή «βιολογική έννοια του είδους» (Mayr, 1942), που καθορίζει τα είδη σαν ένα σύνολο πληθυσμών που πραγματικά ή δυνητικά διασταυρώνονται μεταξύ τους και είναι αναπαραγωγικά απομονωμένοι από άλλες ομάδες πληθυσμών. Η βιολογική έννοια του είδους εισάγει εντούτοις μερικά όρια, στο ότι εφαρμόζεται μόνο στους οργανισμούς που αναπαράγονται με διασταύρωση, που δεν

αυτογονιμοποιούνται και είναι δύσκολο να επαληθευτεί αν αποτελούν αλλοπάτριους πληθυσμούς. Ένας πιθανός εναλλακτικός ορισμός του είδους είναι η «εξελικτική έννοια του είδους» (Wiley, 1978), που ορίζει το είδος σαν ένα σύνολο πληθυσμών που αντιπροσωπεύουν μια ενιαία εξελικτική γραμμή, που διατηρεί την ταυτότητά της σε σχέση με όλες τις άλλες εξελικτικές γραμμές.

Στην περίπτωση των διαφόρων στελεχών του είδους *E. granulosus*, η έννοια αυτή εφαρμόζεται μόνο εν μέρει, και ειδικότερα σε μερικά στελέχη, τα πιο διαφοροποιημένα, αλλά όχι σε άλλα. Για παράδειγμα, σε μερικές περιπτώσεις οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών G1, G2 και G3 δεν παρέχουν σημαντική ένδειξη για τη διαφοροποίησή τους και μπορούν να θεωρηθούν ως το αποτέλεσμα μιας πολύ πρόσφατης αναπαραγωγικής απομόνωσης, ανεπαρκούς για να αποτελέσει μια οριστική διαδικασία ειδογένεσης (Lymbery, 1995). Σύμφωνα με τον Lymbery όμως, τουλάχιστον για τα πιο διαφοροποιημένα στελέχη, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι αντιπροσωπεύουν διακριτά είδη.

Η ταξινομική περιπλοκή, που φαίνεται κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως σε πολυάριθμες μελέτες, πιστοποιεί πως είναι αδύνατο να ληφθεί μια επιδημιολογική εικόνα της εχينوκοκκίασης σε μία συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή. Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν, επιπλέον, αποτελούν μια προτροπή για τη σκέψη ότι κάθε πληθυσμός του *E. granulosus* που υπάρχει στις περιοχές που μελετώνται αντιπροσωπεύεται στην πραγματικότητα από ένα σύνολο πληθυσμών που διαφοροποιούνται γενετικά μεταξύ τους, και μπορούν να αποδείξουν σημαντικές διαφορές στους τρόπους μετάδοσης, στη μολυσματικότητα για τον άνθρωπο, στην παθογένεια και πιθανώς και στον καθορισμό της ανοσολογικής απόκρισης. Αυτή η πολυπλοκότητα δείχνει επίσης πόσο απαραίτητη είναι η χρήση γενετικών και μοριακών δεικτών για το σωστό ταξινομικό καθορισμό των διαφόρων στελεχών και κατά συνέπεια τη σωστή αντιμετώπισή τους σε κάθε επιδημιολογική μελέτη, σε κάθε προσπάθεια να υποβληθούν μέτρα πρόληψης και ελέγχου, καθώς και σε κάθε εκστρατεία εκρίζωσης της νόσου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akhan O., Ozmen M.N., Dincer A., Sayek I., Gocmen A. (1994). Percutaneous treatment of pulmonary hydatid cyst. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 17:271-275
- Ammann RW, Eckert J. (1996). Cestodes. *Echinococcus*. *Gastroenterology Clinical North America* 25:655-89
- Aquadro C.F., Noon W.A., Begun D.J. (1992). RFLP analysis using heterologous probes. In: *Molecular Genetic Analysis of populations: A Practical Approach* (Hoelzel A.R. ed) IRL at Oxford University Press, Oxford, UK. pp:115-158
- Avise J.C. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*. 7:371-379
- Battelli G., Mantovani A., Seimenis A. (2002). Cystic echinococcosis and the Mediterranean Region: a long-lasting association. *Parassitologia* 44:43-57
- Beggs I. (1983) The radiological appearances of hydatid disease of the liver. *Clinical Radiology* 34:555-63.
- Bowles J., Blair D., McManus D.P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54:165-74
- Bowles J., McManus D.P. (1991). Molecular Characterisation of *Echinococcus*. XV Extraordinary Congress for the Celebration of the 50 Years of A.I.H. (Eds. F. De Rosa). *Archivos de la Hidatidosis*, 300: 55-62.
- Bowles J., McManus D.P. (1993a). Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Tropica* 53:291-305
- Bowles J., McManus D.P. (1993b). Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Molecular and Biochemical Parasitology* 57:231-240
- Bowles J., McManus D.P. (1993c). NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology* 23:969-72
- Bryant G.L., Flockhart H.A. (1986). Biochemical strain variation in parasitic helminths. *Advances in Parasitology* 25:275-319
- Caremani M., Benci A., Maestrini R., Accorsi A., Caremani D., Lapini I., (1992). Ultrasound imaging in cystic echinococcosis. Proposal of a new sonographic classification. *Acta Tropica* 67:91-105
- Chance M.L. (1979). The identification of *Leishmania*. *Symposia of the British Society of Parasitology* 17:55-74
- Constantine C.C., Thompson R.C., Jenkins D.J., Hobbs R.P., Lymbery A.J. (1993). Morphological characterization of adult *Echinococcus granulosus* as a means of determining transmission patterns. *The Journal of Parasitology* 79:57-61
- Di Palma A., Ettore G.C., Scapati C. (1991). The role of computerized tomography in the diagnosis of hydatid disease. *Radiol Med (Torino)* 82(4):430-6
- Eckert J., (1986). Prospects for treatment of the metacestode stage of *Echinococcus*. In: *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. (ED. Thompson, R.C.A.),. Allen and Unwin, London. pp:250-284
- Eckert J., Conraths F.J., Tackmann K. (2000). Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology* 30:1283-1294
- Eckert J., Deplazes P. (2004). Biological, epidemiological and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1):107-35
- Eckert J., Thompson R.C., Michael S.A., Kumaratilake L.M., el-Sawah HM. (1989). *Echinococcus granulosus* of camel origin: development in dogs and parasite morphology. *Parasitology Research* 75:536-44
- Eckert J., Thompson R.C.A. (1988). *Echinococcus* strain in Europe: a review. *Tropical Medicine and Parasitology* 39:1-8

- Eckert J., Thompson R.C.A. (1997). Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Tropica* 64:19-34
- Eckert J., Thompson R.C.A., Lymbery A.J., Pawlowski Z.S., Gottstein B., Morgan U.M. (1993). Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. *Parasitology Research* 79:42-46
- Erdogmus B., Yazici B., Akcan Y., Ozdere B.A., Korkmaz U., Alcelik A. (2005) Latent fatality due to hydatid cyst rupture after a severe cough episode. *Tohoku J. Exp. Med.* 205:293-296
- Fairweather I., Threadgold L.T. (1981). *Hymenolepis nana*: the fine structure of the "penetration gland" and nerve cells within the oncosphere. *Parasitology* 82:445-58
- Garippa G., Varcasia A., Scala A. (2004). Cystic echinococcosis in Italy from the 1950s to present. *Parassitologia*. 46(4):387-91
- Gauci C., Heath D., Chow C., Lightowers M.W. (2005). Hydatid disease: vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. *Expert Rev Vaccines* 4(1):103-12
- Gemmel M.A., Lawson J.R. (1986). Epidemiology and control of hydatid disease. In: *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease* (ED. Thompson, R.C.A.). George Allen & Unwin. London. pp:189-216
- Gharbi H.A., Hassine W., Brauner M.W., Dupuch K. (1981). Ultrasound examination of the hydatid liver. *Radiology* 139(2):459-63
- Gibson W.C., Miles M.A. (1985). Application of new techniques to epidemiology. *British Medical Bulletin* 41:115-121
- Giulekas D., Papakosta D., Papaconstantinou C., Barbarousis D., Angel J. (1986). Recurrent anaphylactic shock as a manifestation of echinococcosis. Report of a case. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 20(2):175-7
- Gloor G. (1988). Echinokokkose beim Menschen in der Schweiz 1970-83: Medical Dissertation. University of Zurich
- Godfrey D.G. (1984). Molecular biochemical characterization of human parasites. *Advances in Tropical Medicine* 4:289-319
- Graber M., Thal J. (1980). L'echinococcose des artiodactyles sauvages de la Republique Centrafricaine: existence probable d'un cycle lion-phacocere. *Revue elevage medecine veterinaire pays tropicaux* 33:51-59
- Haag K.L., Araújo A.M., Gottstein B., Siles-Lucas M., Thompson R.C.A., Zaha A. (1999). Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae). Selfing or outcrossing? *Parasitology* 118:63-71
- Hobbs R.P., Lymbery A.J., Thompson R.C.A. (1990). Rostellar hook morphology of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental Australian hosts and its implication for strain recognition. *Parasitology* 101:73-81
- Hosemann G., Schwarz E., Lehmann C., Posselt A. (1928). In: *Die Echinokokkenkrankheit*. Stuttgart: F. Enke. pp:1-418
- Hurles M. E., Jobling M.A. (2001). Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y. *Molecular Ecology*. 10:1599-1613
- Jenkins D.J., Romig T., Thompson R.C. (2005). Emergence/re-emergence of *Echinococcus spp.*: a global update. *Int. J. Parasitol.* 35(11-12):1205-19
- Jerray M., Benzarti M., Garrouche A., Klabi N., Hayouni A. (1992). Hydatid disease of the lungs. Study of 386 cases. *Am Rev Respir Dis* 46(1):185-9
- Kamenetzky L., Gutierrez A.M., Canova S.G., Haag K.L., Guarnera E.A., Parra A., Garcia G.E., Rosenzvit M.C. (2002). Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 2:129-136
- Kardaras F., Kardara D., Tselikos D., Tsoukas A., Exadactylos N., Anagnostopoulou M., Lolas C., Anthopoulos L. (1996). Fifteen year surveillance of echinococcal heart disease from a referral hospital in Greece. *Eur Heart J* 17(8):1265-70
- Karpathios T., Fretzayas A., Nicolaidou P., Papadellis F., Vassalos M., Tselentis J., Thomaidis T., Matsaniotis N. (1985). Statistical aspects of hydatid disease in Greek adults. *Am J Trop Med Hyg* 34(1):124-8

- Kedra A.H., Swiderski Z., Tkach V.V., Dubinský P., Pawlowski Z., Stefaniak J., Pawowski J. (1999). Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitologica* 199:248-254
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120
- Kumar S., Tamura K., Nei M., Jakobsen I., (2001). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Version 2.0
- Kumaratilake L.M., Thompson R.C.A., Eckert J. (1986). *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. *International Journal for Parasitology* 16:529-540
- Kumaratilake L.M., Thompson R.C.A. (1982). A review of the taxonomy and speciation of the genus *Echinococcus* Rudolphi, 1801. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 68:121-146
- Larrieu E., Frider B., del Carpio M., Salvitti J., Mercapide C., Pereyra R., Costa M., Odriozola M., Perez A., Cantoni G., Sustercic J. (2000). Asymptomatic carriers on hydatidosis: epidemiology, diagnosis and treatment. *Pan American Journal of Public Health* 8: 250-257
- Lavikainen A., Lehtinen M.J., Meri T., Hirvela-Koski V., Meri S. (2003). Molecular genetic characterizaion of Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*. 127(3):207-15
- Lethbridge R.C. (1980). The biology of the oncosphere of cyclophyllidean cestodes. *Helminthological Abstracts Series A* 49:59-72
- Lewall D.B., McCorkell S.J. (1985). Hepatic echinococcal cysts: sonographic appearance and classification. *Radiology* 155(3):773-5
- Lightowlers M.W. (2005). Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: Foundations in taeniid cestode immunology. *Parasitol Int*. [Epub ahead of print]
- Lightowlers M.W., Heath D.D. (2004). Immunity and vaccine control of *Echinococcus granulosus* in animal intermediate hosts. *Parassitologia* 46(1-2):27-31
- Lorenzini R., Ruggieri A. (1987). Distribution of echinococcosis/hydatidosis in Italy. *Journal of Helminthology* 61:261-267
- Lymbery A.J. (1995). Genetic diversity, genetic differentiation and speciation in the genus *Echinococcus* Rudolphi, 1801. In: *Echinococcus and hydatid disease* (ED. Thompson R.C.A., Lymbery A.J.). CAB International, Wallingford, UK.
- Lymbery A.J., Hobbs R.P., Thompson R.C. (1997). Building bridges and controlling parasites. *International Journal for Parasitology* 27:1119
- Lymbery A.J., Thompson R.C., Hobbs R.P. (1990) Genetic diversity and genetic differentiation in *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from domestic and sylvatic hosts on the mainland of Australia. *Parasitology* 101:283-9
- Lymbery A.J., Thompson R.C.A. (1988). Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *International Journal for Parasitology* 18:803-11
- Lumsden W.H. (1974). Letter: Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68:74-75
- Macpherson C.N., McManus D.P (1982). A comparative study of *Echinococcus granulosus* from human and animal hosts in Kenya using isoelectric focusing and isoenzyme analysis. *International Journal for Parasitology* 12:515-21
- Manterson D., Dempster R., Chisti Y. (2005). A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1-10 [Epub ahead of print]
- Mantovani A., Prosperi S. (1994). The Mediterranean and zoonoses. *Annali di Igiene* 6:545-564
- Matsaniotis N., Karpathios T., Koutoyzis J., Nicolaidou P., Fretzayas A., Papadellis F., Thomaidis T. (1983). Hydatid disease in Greek children. *Am J Trop Med Hyg* 32(5):1075-8
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press. New York.

- McManus D.P., Bryant C. (1986). Biochemistry and physiology of *Echinococcus*. In: *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. (ED. Thompson, R.C.A.),. Allen and Unwin, London. pp:114-142
- McManus D.P., Rishi, A.K. (1989). Genetic heterogeneity within *Echinococcus granulosus* isolates from different hosts and geographical areas characterized with DNA probes. *Parasitology* 99:17-29
- McManus D.P., Simpson A.J.G., Rishi A.K. (1987). Characterisation of the Hydatid Disease Organism *Echinococcus granulosus*, from Kenya using Cloned DNA Markers. In: *Helminth Zoonoses* (ed. Geerts S., Kumar V., Brandt J.). pp:29-36
- McManus D.P., Simpson A.J.G. (1985). Identification of the *Echinococcus* (hydatid disease) organisms using cloned DNA markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17:171-178
- Merila J., Björklund M., Baker A.J. (1997). Historical demography and present day population structure of the greenfinch, *Carduelis chloris* – An analysis of mtDNA control-region sequences. *Evolution*. 51:946-956
- Meyenberger C. (1990). Strategie bei sonographischem Verdacht auf eine Parasitose der Leber (Echinokokkose und Amobenabszesse). *Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis* 79:1399-1405
- Miesfeld R.L. (1999). Applied Molecular Genetics. The polymerase chain reaction. Wiley Liss. pp:145-160
- Morris D.L., Richards K.S. (1992). *Hydatid Disease. Current Medical and Surgical Management*. Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford
- Morseth D.J. (1965). Ultrastructure of developing taeniid embryophores and associated structures. *Experimental Parasitology* 16:207-16
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Hom G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51(1):263-73
- Musio F., Linos D. (1989). Echinococcal diseases in an extended family and review of the literature. *Arch Surg* 124(6):741-4
- Nollen P.M. (1983). Patterns of sexual reproduction among parasitic plathyhelminths. *Parasitology* 86:99-120
- Ortlepp R.J. (1937). South African helminths. Part I. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science* 9:311-366
- Pawlovski Z.S. (1993). Critical points in the clinical management of cystic echinococcosis. In: *Compendium on echinococcosis* (ED. Andersen F.L., Chai J., Lia F.). Brigham Young University Print Services, Provo. pp:119-131
- Pawlovski Z.S. (1997). Terminology related to *Echinococcus* and echinococcosis. *Acta Tropica* 67:1-5
- Pawlovski Z.S., Mrozevicz B., Stefaniak J., Schantz P., Wilson M., Eckert J., Jaquier P., Haremski T., Novosielski J., Zieta B. (1993). *Echinococcus granulosus* pig strain from Poland has a low infectivity to humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Suppl* 49:342-343
- Peters W. (1981). Technological advances in protozoal taxonomy and systematics. In *Parasitological Topics* (ED. Canning E.U.). Society of Protozoologists. pp:200-209
- Ράπτης Σωτήριος (1998). *Εσωτερική παθολογία*. Επιστημονικές εκδόσεις Γρηγόριος Παρισιανός, σελ:1778-82
- Rausch R. (1953). The taxonomic value and variability of certain structures in the cestode genus *Echinococcus* (Rud., 1801) and a review of recognized species. *Thapar Commemoration Volume* 233-246
- Rausch R.L. και Nelson G.S. (1963). A review of the genus *Echinococcus* Rudolphi, 1801. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 57:127-135
- Rausch R.L. (1967a). A consideration of intraspecific categories in the genus *Echinococcus* Rudolphi, 1801 (Cestoda: Taeniidae). *Journal of Parasitology* 53:484-91
- Rausch R.L. (1967b). On the ecology and distribution of *Echinococcus* spp. (Cestoda, Taeniidae) and characteristics of their development in the intermediate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 42:19-63

- Rausch R.L. (1973). Significado taxonomico de algunas características de la especie *Echinococcus*. *Boletín de Idatidosis* 3:7-10
- Rausch R.L. (1985). Parasitology: retrospect and prospect. *Journal of Parasitology* 71,139-151
- Rausch R.L. (1986). Life cycle patterns and geographical distribution of *Echinococcus* species. In: *The biology of Echinococcus and hydatid disease* (ED. Thompson R.C.A.). Allen and Unwin. pp:44-80
- Reeder M.M., Palmer P.E.S. (1981). *The radiology of tropical diseases with Epidemiological, Pathological and Clinical Correlation*. Williams and Wilkins, Baltimore
- Rollinson D., Walker T.K, Simpson A.J.G. (1986). The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. *Parasitology* 91:553-371
- Roming T. (1990). *Beobachtungen zur zystischen Echinokokkose des menschen in Turkana-Gebiet, Kenia*. Dissertation Faculty II (Biology). University of Hohenheim.
- Rosenzvit M.C., Zhang L.H., Kamenetzky L., Canova S.G., Guarnera E.A., McManus D.P. (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118:523-530
- Rozas J. Rozas R. (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175
- Sadiadi S.M. (2005). Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitol Int* [Epub ahead of print]
- Safioleas M., Stamoulis I., Theocharis S., Moulakakis K., Makris S., Kostakis A. (2004). Primary hydatid disease of the gallbladder: à rare clinical entity. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 11(5):352-6
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354
- Sakamoto T. (1981). Electron microscopical observation on the egg of *Echinococcus multilocularis*. *Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kagoshima University* 17:165-74
- Schantz P.M., Colli C., Cruz-Reyes A., Prezioso U. (1976). Sylvatic echinococcosis in Argentina. II. Susceptibility of wild carnivores to *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) and host-induced morphological variation. *Tropenmedizin und Parasitologie* 27:70-78
- Scott J.C., McManus D.P. (1994). The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. *Trop. Med. Parasitol.* 45(1):1-4
- Scott J.C., Stefaniak J., Pawlowski Z.S., McManus D.P. (1999). Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 114:37-43
- Scott-White P., Densmore L.D. (1992). Mitochondrial DNA isolation. In: *Molecular Genetic Analysis of populations: A Practical Approach* (Hoelzel A.R. ed) IRL at Oxford University Press, Oxford, UK. pp:29-58
- Seimenis A. (2003). Overview of the epidemiological situation of echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Trop.* 85(2):191-5
- Shablovskaya E.A., Bulgakov V.A., Ponomareva V.E., Danko O.P., Voloshchuk S.D. & Kikot V.I. (1989). Hydatidosis in the Ukranian SSR. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* 6:49-51
- Siles-Lucas M., Felleisen R., Cuesta-Bandera C., Gottstein B., Eckert J. (1994). Comparative genetic analysis of Swiss and Spanish isolates of *Echinococcus granulosus* by southern hybridization and Random Amplified Polymorphic DNA technique. *Applied Parasitology* 35:107-17
- Simpson A.J.G. (1986). The influence of molecular heterogeneity in helminth identification, protective immunity and immunodiagnosis. In *Parasitology-Quo Vadit* (M.J. Howell, ed.) Australian Academy of Science, Canberra. pp:69-77
- Σμπαρούνης Ν. Χαράλαμπος (1990). *Γενική Χειρουργική*. University Studio Press, σελ:564-6, 1048-51
- Smyth J.D. (1969a). *The Physiology of Cestodes*. Oliver and Boyd, Edinburgh

- Smyth J.D., Smyth M.M. (1964). Natural and experimental hosts of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*, with comments on the genetics of speciation in the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 54:493-514
- Šnábel V., D'Amelio S., Mathiopoulos K.D., Turčeková L., Dubinský P. (2000). Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *Journal of Helminthology* 74:177-181
- Sotiraki S., Himonas C., Korkoliakou P. (2003). Hydatidosis-echinococcosis in Greece. *Acta Trop* 85(2):197-201
- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517
- Σταθάκης (1998). *Σημειώσεις στα λοιμώδη νοσήματα*. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, σελ:192-3
- Stefancikova A., Dubinski P., (1995). Status and prognosis of the incidence of helminthic zoonoses in Slovakia. *Helminthologia* 32:247-250.
- Stossel T. (1989). *Literaturübersicht zur Häufigkeit und geographischen Verbreitung der Echinokokkose in Landern EG und EFTA*. Medical Dissertation. University of Zurich
- Sweatman G.K., Williams R.J. (1963). Comparative studies on the biology and morphology of *Echinococcus granulosus* from domestic livestock, moose and reindeer. *Parasitology* 53:339-390
- Swiderski Z. (1982). *Echinococcus granulosus*: embryonic envelop formation. *Proceedings of the 10th International Congress of Electron Microscopy* 3:513
- Tegelstrom H. (1992). Detection of mitochondrial DNA fragments. *Molecular Genetic Analysis of populations: A Practical Approach* (Hoelzel A.R. ed) IRL at Oxford University Press, Oxford, UK. pp:89-114
- Thompson R.C.A. (1979). Biology and speciation of *Echinococcus granulosus*. *Australian Veterinary Journal* 55:93-98
- Thompson R.C.A., Kumaratilake L.M. (1982). Intraspecific variation in *Echinococcus granulosus*: the Australian situation and perspectives for the future. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76:13-16
- Thompson R.C.A. (1986). Biology and systematics of *Echinococcus*. In: *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease* (ED. Thompson, R.C.A.). Allen and Unwin, London. pp:5-45
- Thompson R.C.A., Kumaratilake L.M., Eckert J. (1984). Observation on *Echinococcus granulosus* of cattle origin in Switzerland. *International Journal for Parasitology* 14:283-291
- Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (1988). The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Advances in Parasitology* 27:209-63
- Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (1991). The epidemiological significance of biological variation in *Echinococcus*. *Archives de le Hidatidosis* 30:195-200
- Thompson R.C.A. (1994). Biology and Systematics of *Echinococcus*. In: *Echinococcus and Hydatid Disease* (R.C.A. Thompson and A.J. Lymbery, eds.) CAB International, Wallingford
- Thompson R.C.A., Lymbery A.J., Constantine C.C. (1995). Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Advances in Parasitology* 35:145-175
- Thompson R.C.A., McManus D.P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology* 18:452-457
- Thorpe R.S. (1976). Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. *Biological Reviews* 51:407-452
- Todorov T., Boeva V. (1999). Human echinococcosis in Bulgaria: a comparative epidemiological analysis. *Bull. WHO* 77:110-8
- Turčeková L., Snabel V., D'Amelio S., Busi M., Dubinský P. (2003) Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Tropica* 85:223-229
- Verster A.J.M. (1965). Review of *Echinococcus* species in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 32:7-118

- Vogel H. (1957). Über den *Echinococcus multilocularis* Süddeutschlands. I. Das Band wurmstadium von Stämmen menschlicher und tierischer Herkunft. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* 8:404-454
- von Sinner W.N. (1991) New diagnostic signs in hydatid disease; radiography, ultrasounds, CT and MRI correlated to pathology. *Eur J Radiol* 12(2):150-9
- Wachira T.M., Bowles J., Zeyhle E., McManus D.P. (1993). Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48:473-479
- WHO-IWGE (2001). PAIR: an option for the treatment of cystic echinococcosis. WHO - Informal Working Group on Echinococcosis
- Wiley E.O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* 27:17-26
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535
- Worbes H. (1992). The occurrence of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* in Thuringia. *Angewandte Parasitologie* 33:193-204