

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΜΠΣ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ**

Με κατεύθυνση:

**ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ
ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΕΙΔΩΝ
ΦΛΕΒΟΤΟΜΩΝ (ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΩΝ-ΞΕΝΙΣΤΩΝ
ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑ) ΣΕ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΝΗΣΙΑ ΤΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ, ΜΕ
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

Κωνσταντίνος Ν. Κώστας

DVM, Κτηνιατρική ΑΠΘ

2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΜΠΣ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ**

Με κατεύθυνση:

**ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ
ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΕΙΔΩΝ
ΦΛΕΒΟΤΟΜΩΝ (ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΩΝ-ΞΕΝΙΣΤΩΝ
ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑ) ΣΕ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΝΗΣΙΑ ΤΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ, ΜΕ
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

Κωνσταντίνος Ν. Κώστας

DVM, Κτηνιατρική ΑΠΘ

2018

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ
ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΜΑΡΙΑ
(ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΚ)

ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ
(ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ)

ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ
(ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΘ)

Στην οικογένειά μου

ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΕΙΔΩΝ ΦΛΕΒΟΤΟΜΩΝ (ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΩΝ-ΞΕΝΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑ) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΝΗΣΙΑ ΤΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ, ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λέξεις κλειδιά: Φλεβοτόμοι, λείσμανίαση, Ελλάδα, νησιά του Αιγαίου, PCR-RFLP, Δημόσια Υγεία

Οι φλεβοτόμοι-σκνίπες αποτελούν τους αποκλειστικούς διαβιβαστές του πρωτόζωου παρασίτου *Leishmania*, το οποίο ευθύνεται για τη νόσο της λείσμανίασης στον άνθρωπο και στα ζώα. Στη Μεσόγειο θάλασσα, τα συνήθη είδη σκνιπών που έχουν βρεθεί είναι οι *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. tobbi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* κ.ά.. Στην Ελλάδα συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί 13 είδη, εκ των οποίων τα 5 (*P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. similis* και *P. papatasi*) έχουν αποδειχθεί ως διαβιβαστές του παρασίτου. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανότητας είδη διαβιβαστών (και συγκεκριμένα ο *P. neglectus*) να έχουν προσαρμοστεί στις συνθήκες που απαντώνται σε διαφορετικά νησιά του Αιγαίου. Για το σκοπό αυτό, διενεργήθηκε μοριακός προσδιορισμός ατόμων σκνιπών τα οποία είχαν περισυλλεχθεί από νησιά του Αιγαίου (Κυκλάδες-Δωδεκάνησα) το καλοκαίρι του 2016, με την εφαρμογή των μεθόδων της PCR και PCR-RFLP. Στη συνέχεια, τα προϊόντα των παραπάνω μεθόδων ηλεκτροφορήθηκαν και προέκυψαν πρότυπα μπαντών τα οποία συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Η σύγκριση φανέρωσε διαφορετικά πρότυπα μπαντών μεταξύ ατόμων του είδους *P. neglectus* που προέρχονταν από νησιά του Αιγαίου και ατόμων που προέρχονταν από την Κρήτη. Όμοια μοριακή διαφορά υπήρξε και στο είδος *P. perfiliewi* μεταξύ ατόμων των νησιών και ατόμων της Κύπρου. Αντιθέτως, όμοιο πρότυπο μπαντών παρουσιάστηκε στα άτομα του είδους *P. tobbi* που προέρχονταν από τα νησιά, την Κρήτη και την Κύπρο. Επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων θα γίνει με την πραγματοποίηση αλληλούχισης του γενετικού υλικού (DNA-sequencing) των εξετασθέντων ατόμων. Η συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων αυτών αποδεικνύει μια πιθανή ενδοειδική εξέλιξη ατόμων του ίδιου είδους, δηλαδή την πιθανή ύπαρξη δύο διαφορετικών πληθυσμών στα είδη *P. neglectus* και *P. perfiliewi*, ανάλογα την περιοχή εντόπισής τους, ενώ κάτι αντίστοιχο δεν ισχύει στην περίπτωση του είδους *P. tobbi*. Η ύπαρξη διαφορετικών πληθυσμών ενδεχομένως να σχετίζεται με την ιστορία δημιουργίας της Ελλάδας, και συγκεκριμένα της Κρήτης και των νησιών του Αιγαίου, με πιθανή αλληλεπίδραση πληθυσμών των δύο αυτών περιοχών και στη συνέχεια απομόνωσή τους. Επιπλέον, η διαφορετικότητα αυτή πιθανόν να συνδέεται με προσπάθεια προσαρμογής των ατόμων σκνιπών στις ιδιαίτερες συνθήκες κάθε περιοχής ή ακόμη με την μετακίνηση και ανταλλαγή πληθυσμών τόσο μεταξύ των νησιών όσο και τις γειτονικές του περιοχές (Τουρκία, Πελοπόννησος). Τέλος, η παρουσία των εν λόγω ειδών σκνιπών σε νησιά του Αιγαίου και μάλιστα με διαφορετικό μοριακό προφίλ σε σχέση με τα αντίστοιχα της Κρήτης και της Κύπρου, καθιστά επιβεβλημένη την περαιτέρω διερεύνηση της επιδημιολογίας της λείσμανίασης σε αυτές τις περιοχές, σε

σχέση με την ικανότητά τους να μεταδώσουν το παράσιτο Λεϊσμάνια, καθώς ο κίνδυνος για τη Δημόσια Υγεία είναι μεγάλος.

ABSTRACT

Key words: *Phlebotomus* spp., leishmaniasis, Greece, Aegean islands, PCR-RFLP, Public Health

Phlebotomines sand flies are the unique vectors of the protozoan parasite *Leishmania* causing a group of diseases both to humans and animals, called the leishmaniases. The most common species of sand fly vectors found in the Mediterranean Basin include *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. tobbi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*. Specifically in Greece, there are 13 *Phlebotomus* spp., from which, 5 (*P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. similis* και *P. papatasi*) are proven or suspected vectors of the parasite. The aim of the present study was to investigate the possibility that *Phlebotomus* species became adapted to the different conditions of the studied Aegean islands. For that purpose, samples of phlebotomines were collected from the studied Aegean islands (Cyclades-Dodhekanisa) during the summer of 2016, analyzed and identified morphologically and through the molecular methods of PCR and PCR-RFLP. Consequently, the products of these trials were subjected to electrophoresis, resulting in molecular patterns. The comparison of the molecular patterns of different specimens revealed strong difference between *P. neglectus* samples from Aegean islands and Crete. Similar differences were also observed between *P. perfiliewi* samples from the islands and Cyprus. On the contrary, the molecular patterns of *P. tobbi* samples from the islands, Crete and Cyprus, were exactly identical. Confirmation of the above results will result by the method of DNA-sequencing. The existence of genetically different specimens of *P. neglectus* and *P. perfiliewi* in the islands studied, suggests a possible intraspecific evolution of the different populations of the two species. The same assumption cannot be made, however, for individuals belonging to *P. tobbi*. The presence of different populations of the same species is possibly explained through the geological formation of Greece and specifically of the Aegean islands. Furthermore, this differentiation is probably strongly correlated with a procedure of adaption to the specific conditions of each region or with possible exchanges of populations between the Aegean islands and their neighbor regions (Turkey, Peloponnisos). Finally, the presence of these 3 species of *Phlebotomus* in the Aegean islands, with a different molecular pattern compared to those of Crete and Cyprus, raises the necessity of further epidemiological research related to their capacity as vectors of *Leishmania* in these regions, due the threat they pose to Public Health.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	I
A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	1
2. ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ-ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΗΣ	2
2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	2
2.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ.....	5
2.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	11
3. ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ <i>LEISHMANIA</i>	13
3.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ-ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	13
3.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ.....	15
3.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	17
4. Η ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	19
4.1. ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ	19
4.2. ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ (ΔΛ).....	20
4.3. ΒΛΕΝΝΟΓΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ	22
4.4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	23
4.5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	24
4.6. ΜΕΤΡΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ-ΠΡΟΛΗΨΗ.....	24
5. Η ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΤΟ ΣΚΥΛΟ.....	26
5.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ.....	26
5.2. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	27
5.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	28
5.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	29
5.5. ΜΕΤΡΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ-ΠΡΟΛΗΨΗ.....	29
B) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
1. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	30
2. ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	32
3. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΙ ΥΛΙΚΩΝ	33
3.1) ΕΞΑΓΩΓΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA-EXTRACTION).....	33

3.2) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, POLYMERASE CHAIN REACTON)	35
3.3) ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ ΕΚ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (PCR-RFLP, POLYMERASE CHAIN REACTION- RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)	39
3.4) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (GEL AGAROSE).....	40
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
Δ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
Ε) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54
Α) ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54
Β) ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή αποτελεί τμήμα του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών "Εφαρμοσμένη Δημόσια υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή με κατεύθυνση την ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων και υδάτων και δημόσια υγεία" του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται προς τους ιθύνοντες Καθηγητές του Προγράμματος, για την οικονομική στήριξη που μου παρείχαν στα πλαίσια αυτού, χωρίς την οποία η παρούσα διατριβή δε θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί. Επιπλέον, ευχαριστίες εκφράζονται και για τη δυνατότητα που μου δόθηκε να πραγματοποιήσω την παρούσα διατριβή στο Πανεπιστήμιο Κρήτης σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής διατριβής, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια κα Αντωνίου Μαρία για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και τις χρήσιμες επιστημονικές συμβουλές και κατευθύνσεις που μου παρείχε σε κάθε στάδιο της μελέτης. Η άρτια επιστημονική της κατάρτιση επί του παρόντος θέματος αποτέλεσε ακρογωνιαίο λίθο για την ορθή και επιστημονικά τεκμηριωμένη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, Καθηγητή κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο και Καθηγητή κ. Πουρνάρα Σπυρίδωνα για την εκπαιδευτική και επιστημονική συμβολή τους στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος και την απόκτηση των κατάλληλων γνωστικών εφοδίων για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το συνεργάτη και υποψήφιο διδάκτορα του Εργαστηρίου κ. Παύλου Χριστόφορο για τη σημαντική επιστημονική βοήθεια, την τεχνική υποστήριξη καθώς και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε, μοιραζόμενος κάθε εύκολη και δύσκολη στιγμή της ερευνητικής διαδικασίας.

Ακόμη, ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ εκφράζεται προς τους γονείς μου για την αμέριστη ηθική, ψυχολογική και οικονομική στήριξη που μου παρείχαν για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση των σπουδών μου. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ εκφράζεται και προς τη γυναίκα μου, για τη συμπαράσταση και τη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της παρούσας διατριβής.

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Γεωγραφικά και δημογραφικά στοιχεία των υπό μελέτη νησιών του Αιγαίου	32
Πίνακας 2: Πληροφορίες θετικών δειγμάτων PCR	42
Πίνακας 3: Αποτελέσματα μοριακού προσδιορισμού των δειγμάτων με PCR-RFLP	47

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Θηλυκή σκνίπα με τη χαρακτηριστική κάλυψη με τριχίδια	2
Εικόνα 2: Χαρακτηριστική αγγείωση των φτερών σκνίπας	3
Εικόνα 3: Στοματικό μόριο, αποτελούμενο από τα χαρακτηριστικά πέντε τμήματα	3
Εικόνα 4: Κεφαλή σκνίπας, με εκτεινόμενα προς τα κάτω τα στοματικά της μόρια	3
Εικόνα 5: Γεννητικό σύστημα αρσενικής σκνίπας (στη μέση του συστήματος βρίσκεται το όργανο aedeagus και εκατέρωθεν ο στύλος και ο υποστύλος)	4
Εικόνα 6: Γεννητικό σύστημα θηλυκής σκνίπας(φουρκέτα και κοινό ζεύγος σπερματοθηκών)	4
Εικόνα 7: Γεννητικό σύστημα αρσενικού (εσωτερικά συνεχίζει από το aedeagus και καταλήγει στην αντλία σπέρματος)	5
Εικόνα 8: Το γεννητικό όργανο του αρσενικού aedeagus	5
Εικόνα 9: Χάρτης κατανομής <i>P. alexandri</i>	6
Εικόνα 10: Χάρτης κατανομής <i>P. balcanicus</i>	6
Εικόνα 11: Χάρτης κατανομής <i>P. major</i>	7
Εικόνα 12: Χάρτης κατανομής <i>P. mascittii</i>	7
Εικόνα 13: Χάρτης κατανομής <i>P. simici</i>	8
Εικόνα 14: Χάρτης κατανομής <i>P. neglectus</i>	8
Εικόνα 15: Χάρτης κατανομής <i>Sergentomyia dentata</i>	9
Εικόνα 16: Χάρτης κατανομής <i>Sergentomyia minuta</i>	9
Εικόνα 17: Χάρτης κατανομής <i>P. papatasi</i>	10
Εικόνα 18: Χάρτης κατανομής <i>P. perfiliewi</i>	10
Εικόνα 19: . Σχηματική απεικόνιση βιολογικού κύκλου σκνίπας	12
Εικόνα 20: Γεωγραφική κατανομή των σκνιπών-φλεβοτόμων σε διάφορους νομούς στην Ελλάδα (Ntais et al. 2013)	12
Εικόνα 21: Σχήμα με την ταξινόμηση του υπογένους της <i>Leishmania</i> (Bañuls et al. 2007)	13
Εικόνα 22: Αμαστιγωτή μορφή της <i>Leishmania</i>	14
Εικόνα 23: Μαστιγωτή μορφή της <i>Leishmania</i>	14
Εικόνα 24: Χάρτης γεωγραφικής κατανομής νέων κρουσμάτων της δερματικής λείσμανιάσης (WHO 2018)	16
Εικόνα 25: Χάρτης γεωγραφικής κατανομής νέων κρουσμάτων της σπλαχνικής λείσμανιάσης (WHO 2018)	16
Εικόνα 26: Βιολογικός κύκλος της <i>Leishmania tropica</i> (Centers for Disease Control and Prevention 2018)	18

Εικόνα 27. Ασθενής με ηπατοσπληνομεγαλία λόγω σπλαχνικής λειψμανίασης (eNetMD 2018)	20
Εικόνα 28. Ασθενής με αλλοιώσεις μετα kala-azar δερματική λειψμανίαση (WHO 2018)	22
Εικόνα 29. Ασθενής με αλλοιώσεις βλεννογοδερματικής λειψμανίασης (Animalia life 2017)	23
Εικόνα 30. Σκύλος με κερατοεπιπεφυκίτιδα και βλεφαρίτιδα λόγω λειψμανίασης	27
Εικόνα 31. Σκύλος με επίσταξη λόγω λειψμανίασης.....	28
Εικόνα 32: Χάρτης με τα υπό μελέτη νησιά του Αιγαίου αριθμημένα κατά αλφαβητική σειρά. (1) Ανάφη, (2) Άνδρος, (3) Ικαρία, (4) Κάρπαθος, (5) Λέρος, (6) Μήλος, (7) Νίσυρος, (8) Πάτμος, (9) Σαντορίνη, (10) Σίφνος, (11) Φολέγανδρος	31
Εικόνα 33: Παγίδα τύπου CDC light trap πλησίον ορνιθώνα με αριθμημένα τα διάφορα τμήματά της. (1) Λαμπτήρας, (2) ανεμιστήρας, (3) πυθμένας παγίδας.....	33
Εικόνα 34: Η αλληλουχία του περιοριστικού ενζύμου MboI (Minotech, EU)	40
Εικόνα 35: Φωτογραφία δειγμάτων PCR από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. M: Marker, 0007, 0190, 0248: Female <i>P. neglectus</i> (Crete, Fodele), 0059, 0060, 0061: Unknown (Crete, Heraklion), 0289: Female <i>P. tobbi</i> (Nisyros), 0281, 0282: Female, <i>P. perfiliewi</i> (Milos), 0295, 0298: Male, <i>P. neglectus</i> (Ikaria)	43
Εικόνα 36: Φωτογραφία δειγμάτων PCR από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. M: Marker, 0279: Male, <i>P. neglectus</i> (Leros), 0283: Female, <i>P. neglectus</i> (Milos), 0287: Male, <i>P. neglectus</i> (Patmos), 0288: Female, <i>P. neglectus</i> (Nisyros), 0292: Male, <i>P. neglectus</i> (Nisyros), 0295, 0298: Male, <i>P. neglectus</i> (Ikaria), 0301: Male, <i>P. neglectus</i> (Andros), 0303, 0305: Female, <i>P. neglectus</i> (Sifnos).....	44
Εικόνα 37: Φωτογραφία δειγμάτων PCR-RFLP από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. M: Marker, 0280: Male, <i>P. neglectus</i> (Leros), 0284: Female, <i>P. neglectus</i> (Milos), 0290: Female, <i>P. neglectus</i> (Nisyros), 0293: Male, <i>P. neglectus</i> (Nisyros), 0296, 0299: Male, <i>P. neglectus</i> , 0147: Male, <i>P. tobbi</i> (Cyprus), 0156: Female, <i>P. tobbi</i> (Cyprus)	44
Εικόνα 38: Φωτογραφία δειγμάτων PCR-RFLP από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. M: Marker, 0007, 0190, 0248: Female, <i>P. neglectus</i> (Crete, Fodele), 0059, 0060, 0061: Unknown (Crete, Heraklion), 0289: Female, <i>P. tobbi</i> (Nisyros), 0281, 0282: Female, <i>P. perfiliewi</i> (Milos), 0295, 0298: Male, <i>P. neglectus</i> (Ikaria)	45
Εικόνα 39: Φωτογραφία δειγμάτων PCR-RFLP από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. M: Marker, 59, 60, 61: Unknown (Crete-Heraklion), 67, 69: Male, <i>Sergentomyia dentata</i> (Nisyros), +: <i>P. neglectus</i> (Crete)	46
Εικόνα 40: Φωτογραφία δειγμάτων PCR-RFLP με διαφορετικά πρότυπα μπαντών, από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. M: Marker, 1-6: Διαφορετικά πρότυπα μπαντών. 1: <i>P. neglectus</i> (Ikaria), 2: <i>P. neglectus</i> (Crete, Fodele), 3: Unknown (Crete, Heraklion), 4: <i>P. tobbi</i> (Nisyros), 5: <i>P. perfiliewi</i> (Milos), 6: <i>Sergentomyia dentata</i> (Nisyros).....	46

Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα δίπτερα έντομα, σκνίπες (*Phlebotomus* spp.), αποτελούν τους αποκλειστικούς διαβιβαστές του πρωτόζωου παρασίτου *Leishmania* που ευθύνεται για τη λεισμανίαση. Η νόσος μεταδίδεται μέσω νύγματος θηλυκής σκνίπας, η οποία προηγουμένως είχε τραφεί από μολυσμένο θηλαστικό (Killick-Kendrick 1999). Πρώτο και κυριότερο βήμα για να προβλεφθεί η εξάπλωση του παρασίτου και κατ' επέκταση της νόσου σε μια περιοχή, είναι η γνώση των ειδών και των πληθυσμών των φλεβοτόμων που απαντώνται σε αυτήν. Για να γίνει αυτό, αρχικά απαιτείται η σύλληψη και η ταυτοποίηση των σκνιπών μιας περιοχής.

Στη Μεσόγειο Θάλασσα, τα πιο συνήθη είδη διαβιβαστών της *Leishmania* είναι οι *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. tobbi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* κ.ά. (Deraquit *et al.* 2013). Στην Ελλάδα, έχουν βρεθεί δεκατρία είδη, εκ των οποίων τα δέκα ανήκουν στο γένος *Phlebotomus* και τρία στο γένος *Sergentomyia*. Από αυτά, πέντε έχουν αποδειχθεί ως πιθανοί διαβιβαστές της *Leishmania* και είναι οι: *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. similis* και *P. papatasi* (Christodoulou *et al.* 2012; Ntais *et al.* 2013).

Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας, θα εξεταστεί η πιθανότητα είδη διαβιβαστών (και συγκεκριμένα ο *P. neglectus*) να έχουν προσαρμοστεί στις συνθήκες που απαντώνται σε διαφορετικά νησιά του Αιγαίου (Δωδεκάνησα και Κυκλάδες). Συλλέχθηκαν το προηγούμενο καλοκαίρι, σκνίπες από 11 νησιά και έγινε μορφολογική και μοριακή τυποποίησή τους. Στόχος της μελέτης θα είναι ο εντοπισμός, σε μοριακό επίπεδο, τυχόν διαφορών ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους (*P. neglectus*) που εντοπίστηκαν σε διαφορετικά νησιά, οι οποίες, έχουν ήδη εξακριβωθεί σε μορφολογικό επίπεδο. Με τον εντοπισμό τέτοιων διαφορών πιθανόν να καταδειχθεί προσπάθεια προσαρμογής των σκνιπών στα ιδιαίτερα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά κάθε νησιού, γεγονός το οποίο θα συνδράμει στην έγκαιρη και σωστή πρόληψη μετάδοσης της λεισμανίασης (Dokianakis *et al.* 2016).

2. ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ-ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΗΣ

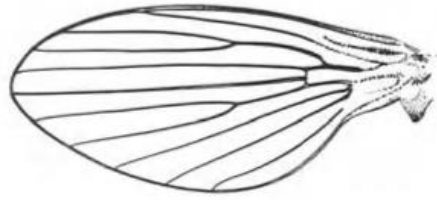
2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Τα αρθρόποδα αποτελούν φύλο ενδιαφέροντος για νοσήματα τα οποία μεταδίδονται με διαβιβαστές, καθώς σε αυτά ανήκει η μεγάλη τάξη των δίπτερων εντόμων (Diptera Linnaeus, 1758), όπως τα κουνούπια, οι μύγες και οι σκνίπες. Σε αυτήν την τάξη, μεγαλύτερο ενδιαφέρον συγκεκριμένα, παρουσιάζει η οικογένεια των Psychodidae (Psychodidae Bigot, 1854), με κύριους εκπροσώπους της τις σκνίπες-φλεβοτόμους (Phlebotominae), οι οποίες είναι και οι αποκλειστικοί διαβιβαστές του πρωτόζωου παρασίτου της Λεισμάνιας (Lane & Crosskey 1993).

Οι σκνίπες, παρά το μικρό τους μέγεθος (1-5mm), είναι εύκολο να διαχωριστούν από άλλα μικρού μεγέθους δίπτερα έντομα, καθώς είναι χαρακτηριστική η θέση σε σχήμα V των φτερών τους, την οποία λαμβάνουν κατά την ανάπαυσή τους. Παρ' όλα αυτά, είναι πολύ δύσκολη η μελέτη και η ταυτοποίηση των διάφορων ειδών, καθώς τα ενήλικα άτομα είναι πολύ μικρού μεγέθους, και επιπλέον, τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά είναι πανομοιότυπα και πολλές φορές δυσδιάκριτα, κυρίως στα θηλυκά άτομα. Αρχικά, η οικογένεια των Psychodidae αναγνωρίζεται από την παρουσία πυκνής κάλυψης με τριχίδια στα φτερά (Εικόνα 1) καθώς και χαρακτηριστικής φλέβωσης στα φτερά, αποτελούμενη από πολυάριθμα παράλληλα αγγεία μέχρι την άκρη της πτέρυγας (Εικόνα 2). Επιπλέον, οι σκνίπες, διαφοροποιούνται από τις υπόλοιπες υποοικογένειες των Psychodidae, από την παρουσία στοματικών μορίων τα οποία απαρτίζονται από πέντε τμήματα, στοματικών μορίων (προβοσκίδες) για τη διαδικασία απομύζησης αίματος από το ξενιστή (μόνο τα θηλυκά άτομα), κεραιών σχεδόν κυλινδρικών και φλέβα, η οποία αποτελείται από πέντε ακτινωτές διακλαδώσεις (Lane & Crosskey 1993).



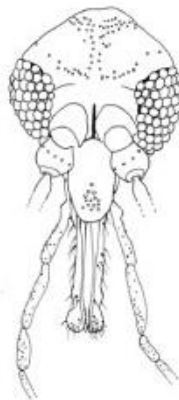
Εικόνα 1: Θηλυκή σκνίπα με τη χαρακτηριστική κάλυψη με τριχίδια (WHO 2018)



Εικόνα 2: Χαρακτηριστική αγγείωση των φτερών σκνίπας (Lane & Crosskey 1993)



Εικόνα 3: Στοματικό μόριο, αποτελούμενο από τα χαρακτηριστικά πέντε τμήματα (Lane & Crosskey 1993)



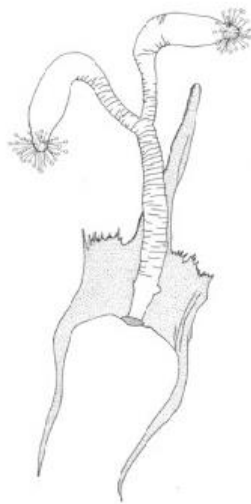
Εικόνα 4: Κεφαλή σκνίπας, με εκτεινόμενα προς τα κάτω τα στοματικά της μόρια (Lane & Crosskey 1993)

Αναφορικά με το γεννητικό σύστημα των σκνιπών, στα θηλυκά άτομα είναι εσωτερικό και αποτελείται από μια σκληρή φουρκέτα, προερχόμενη από το γεννητικό στόμιο και η οποία βρίσκεται στη βάση, μεταξύ ενός κοινού ζεύγους σπερματοθηκών. Η φουρκέτα αυτή καθώς και οι σπερματοθήκες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στο σχήμα τους και πλέον χρησιμοποιούνται για τη διάκριση ειδών *Phlebotomus (Larroussius)*, η οποία μέχρι πρότινος ήταν πολύ δύσκολη (Léger *et al.* 1983).

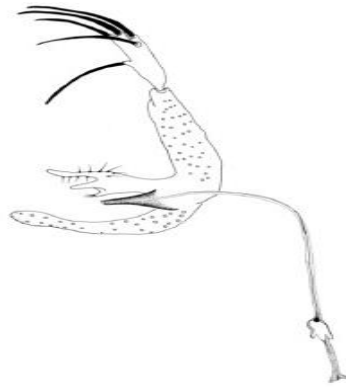
Από την άλλη πλευρά, στα αρσενικά άτομα, το γεννητικό σύστημα βρίσκεται εξωτερικά, και είναι ευδιάκριτο, καθώς αποτελεί το 1/3 του συνολικού μεγέθους του ατόμου και εμφανίζεται ως ένα κορδόνι (aedeagus), περιβαλλόμενο από το στύλο και τον υποστύλο (Lane & Crosskey 1993). Εσωτερικά, το όργανο αυτό συνεχίζει μέσω του γεννητικού αγωγού και καταλήγει σε μια αντλία σπέρματος, από την οποία εκτοξεύεται το σπέρμα κατά τη σύζευξη (Lane & Crosskey 1993).



Εικόνα 5: Γεννητικό σύστημα αρσενικής σκνίπας (στη μέση του συστήματος βρίσκεται το όργανο aedeagus και εκατέρωθεν ο στύλος και ο υποστύλος) (Lane & Crosskey 1993)



Εικόνα 6: Γεννητικό σύστημα θηλυκής σκνίπας(φουρκέτα και κοινό ζεύγος σπερματοθηκών) (Lane & Crosskey 1993)



Εικόνα 7: Γεννητικό σύστημα αρσενικού (εσωτερικά συνεχίζει από το aedeagus και καταλήγει στην αντλία σπέρματος (Lane & Crosskey 1993)



Εικόνα 8: Το γεννητικό όργανο του αρσενικού aedeagus (Lane & Crosskey 1993)

2.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο από ιατρικής και κτηνιατρικής όσο και από επιδημιολογικής πλευράς, αποκτά η μελέτη των νοσημάτων που μεταδίδονται με διαβιβαστές (όπως οι σκνίπες), στη λεκάνη της Μεσογείου, και τα οποία σταδιακά καθίστανται σοβαρός κίνδυνος για τη Δημόσια Υγεία. Δεύτερη κατά σειρά σημασίας ασθένεια πρωτοζωϊκής προέλευσης παγκοσμίως, με ευρεία και συνεχώς αυξανόμενη γεωγραφική εξάπλωση, είναι η λεισμανίαση. Από τα 800 και πλέον είδη φλεβοτόμων που είναι γνωστά μέχρι στιγμής, τα 70 έχουν αναγνωριστεί σαν φορείς-διαβιβαστές της Λεισμανίας (*Leishmania* spp.). Από αυτά, δύο γένη είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση του παράσιτου στον άνθρωπο: *Phlebotomus*, στον Παλαιό Κόσμο και *Lutzomyia* στον Νέο Κόσμο (Killick-Kendrick & Rioux 2002; Murray *et al.* 2005). Τα κύρια είδη φλεβοτόμων τα οποία έχουν εντοπιστεί και αναγνωριστεί στη λεκάνη της Μεσογείου είναι: *Phlebotomus alexandri*, *P. ariasi*, *P. balcanicus*, *P. major*, *P. neglectus*, *P. mascittii*, *P. rapatasi*, *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. simici*, *Sergentomyia dentate*, *S. fallax*, *S. minuta* εκ των οποίων τα πολυπληθέστερα είδη στη χώρα μας είναι: *P. alexandri*,

P. balcanicus, *P. major*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. mascittii*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. simici*, *S. dentata*, *S. minuta*, όπως φαίνεται και στους παρακάτω χάρτες (de Jong *et al.* 2014).



Εικόνα 9: Χάρτης κατανομής *P. alexandri* (de Jong *et al.* 2014)



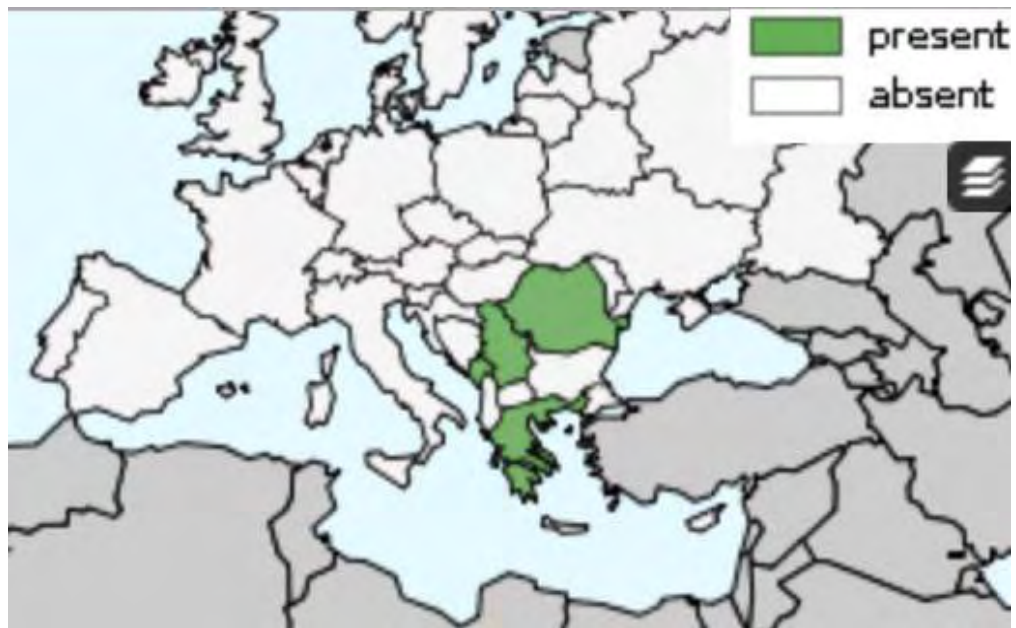
Εικόνα 10: Χάρτης κατανομής *P. balcanicus* (de Jong *et al.* 2014)



Εικόνα 11: Χάρτης κατανομής *P. major* (de Jong et al. 2014)



Εικόνα 12: Χάρτης κατανομής *P. mascittii* (de Jong et al. 2014)



Εικόνα 13: Χάρτης κατανομής *P. simici* (de Jong et al. 2014)



Εικόνα 14: Χάρτης κατανομής *P. neglectus* (de Jong et al. 2014)



Εικόνα 15: Χάρτης κατανομής *Sergentomyia dentata* (de Jong et al. 2014)



Εικόνα 16: Χάρτης κατανομής *Sergentomyia minuta* (de Jong et al. 2014)



Εικόνα 17: Χάρτης κατανομής *P. papatasi* (de Jong et al. 2014)



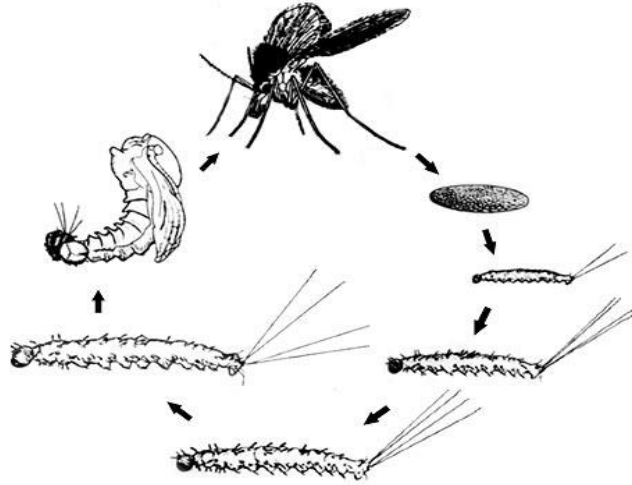
Εικόνα 18: Χάρτης κατανομής *P. perfiliewi* (de Jong et al. 2014)

2.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

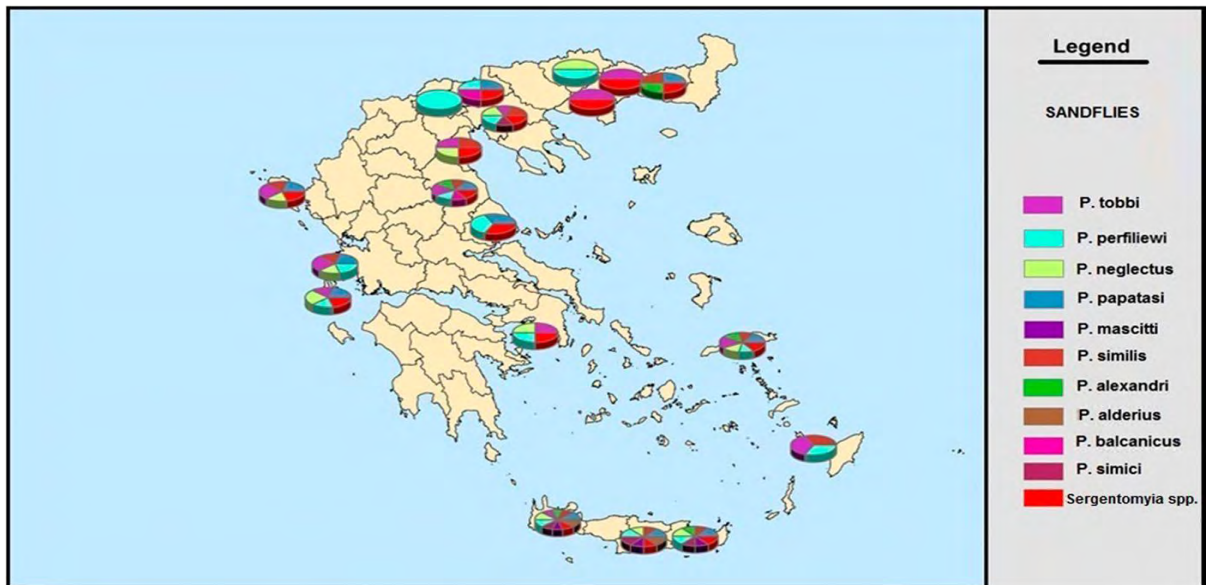
Μεγάλη σημασία στην κατανόηση μετάδοσης της Λείσμάνιας στον άνθρωπο και στα υπόλοιπα θηλαστικά-ξενιστές του παρασίτου, παίζει ο βιολογικός κύκλος των σκνιπών. Οι θηλυκές σκνίπες είναι υπεύθυνες για τη μετάδοσή της καθώς μόνο αυτές τρέφονται αποκλειστικά με αίμα –και όχι τα αρσενικά άτομα-, απομυζώντας το 24 ώρες μετά την ενηλικίωσή τους. Μετά από επίσης 24 ώρες γονιμοποιούνται, γεννώντας πολλά αυγά ανά ομάδες (40-70 αυγά/ομάδα), σε σκιερά μέρη (χόρτα, κοντά σε λιμνάζοντα ύδατα, σε ρωγμές κτιρίων). Σε 7-14 ημέρες εκκολάπτεται από κάθε αυγό η 1^ο σταδίου προνύμφη, η οποία τρέφεται κυρίως με οργανική ύλη (κόπρανα ζώων, σάπια φύλλα) και υφίσταται τρεις εκδύσεις. Σε 20-70 ημέρες εξελίσσεται σε 2^ο, 3^ο και 4^ο σταδίου προνύμφη, μετά από μία επιπλέον έκδυση εξελίσσεται σε νύμφη και τελικά, μετά από 10-20 ημέρες εμφανίζονται τα ενήλικα άτομα, τα οποία ζουν 14-21 ημέρες (Lane & Crosskey 1993).

Ο βιολογικός κύκλος των σκνιπών ολοκληρώνεται σε 30 (*P. tobbi*) έως 56 ημέρες (*P. perfiliewi*), ανάλογα με το είδος και κυρίως τις συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία). Στη χώρα μας, οι σκνίπες εμφανίζονται κυρίως από το Μάιο έως και τον Οκτώβριο, οπότε και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι υψηλή και κατάλληλη για την αναπαραγωγή και εξέλιξη του βιολογικού τους κύκλου. Δραστηριοποιούνται κατά κανόνα τη νύχτα, ενώ την ημέρα κρύβονται σε σκιερά μέρη, κορμούς δέντρων, υπόγεια. Τη νύχτα έλκονται από φωτεινές πηγές, πετούν σε χαμηλό ύψος και μικρές αποστάσεις, οι οποίες, βέβαια, μπορεί να γίνουν πολλά μέτρα ή χιλιόμετρα με τη βοήθεια του αέρα (Killick-Kendrick 1990).

Τα ενήλικα αρσενικά άτομα έχουν κοντές λόγχες στοματικών μορίων και τρέφονται με νέκταρ ή χυμούς φυτών σε αντίθεση με τα θηλυκά, τα οποία απομυζούν το απαραίτητο για αυτά αίμα για την ωρίμανση των αυγών τους, κάθε 3-5 ημέρες, από τον άνθρωπο ή άλλα θηλαστικά (σαρκοφάγα, πτηνά, ερπετά), καθώς παρουσιάζουν ειδικότητα ξενιστή. Η μορφολογική ταυτοποίηση των ειδών σκνιπών στηρίζεται στη νεύρωση των πτερύγων, τη μορφολογία του κορμού τους, των γεννητικών οργάνων του αρσενικού, της σπερματοθήκης του θηλυκού κ.ά. (Lane & Crosskey 1993; Killick-Kendrick 1999)



Εικόνα 19: . Σχηματική απεικόνιση βιολογικού κύκλου σκνίπας (Dillon 2008)

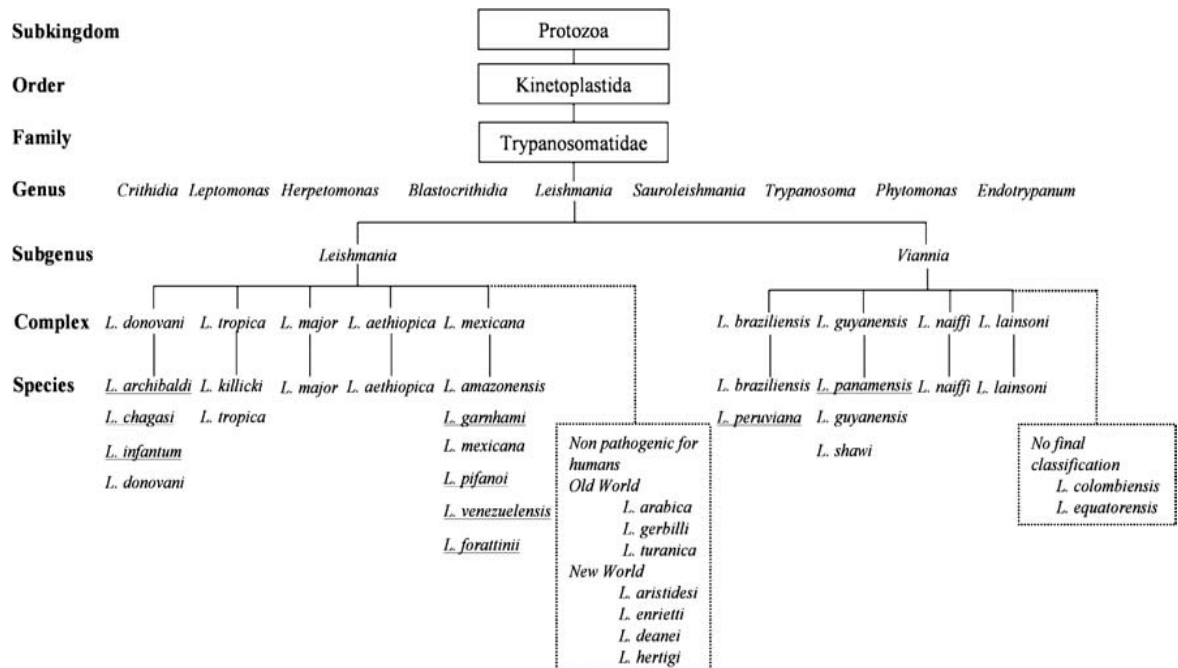


Εικόνα 20: Γεωγραφική κατανομή των σκνιπών-φλεβοτόμων σε διάφορους νομούς στην Ελλάδα (Ntais et al. 2013)

3. ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ *LEISHMANIA*

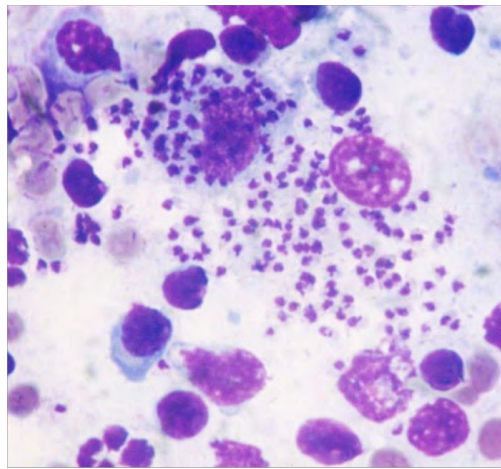
3.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ-ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Μείζονος σημασίας νόσημα το οποίο μεταδίδεται μέσω διαβιβαστών-σκνιπών, και δεύτερο πρωτοζωϊκής προέλευσης παγκοσμίως είναι η λεισμανίαση. Η λεισμανίαση προκαλείται από το ενδοκυτταρικό πρωτόζωο που ανήκει στο φύλο Sarcomastigophora, τάξη Kinetoplastida, οικογένεια Trypanosomatidae, γένος *Leishmania* (Molyneux & Killick-Kendrick 1987), με επιπλέον δύο υπογένη, το υπογένος *Leishmania* και το υπογένος *Viannia* (Lainson *et al.* 1987). Από τη στιγμή που δόθηκε η ονομασία *Leishmania* στο παράσιτο από τον Ross (1903), στην κατάταξη και ονοματολογία των ειδών υπήρξαν διαφορετικές απόψεις και προσεγγίσεις και πολλές φορές αντικρουόμενες. Η προσπάθεια για κατάταξη βάσει μορφολογίας ήταν αδύνατη. Αρχικά, η ταξινόμηση της *Leishmania* γινόταν βάσει οικοβιολογικών κριτηρίων, όπως η γεωγραφική κατανομή, ο τροπισμός και οι κλινικές εκδηλώσεις της (Lumsden 1974; Pratt & David 1981; Bray & Alexander 1987). Εντούτοις, από το 1980 και έπειτα, επιχειρήθηκε η ταυτοποίηση των ειδών του παρασίτου μέσω της τυποποίησης με Πολυεστιακή Ισοενζυμική Ηλεκτροφόρηση (MLEE), (Rioux *et al.* 1990). Έτσι, τα στελέχη της *Leishmania* χαρακτηρίζονται βάσει του ενζυμικού τους προφίλ και κατατάσσονται σε ομοιογενείς ομάδες, τα ζυμοδέματα (Rioux *et al.* 1990).



Εικόνα 21: Σχήμα με την ταξινόμηση του υπογένους της *Leishmania* (Bañuls *et al.* 2007)

Η Λεισμάνια είναι ένας μονοκύτταρος σφαιρικός ή επιμήκης οργανισμός. Εμφανίζεται με δύο διαφορετικές κυτταρικές μορφές, την προμαστιγωτή στο διαβιβαστή και την αμαστιγωτή στο θηλαστικό-ξενιστή. Η βασική αρχιτεκτονική δομή του κυττάρου της χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη κυτταροπλασματικής μεμβράνης -η οποία διατηρεί το σχήμα της σταθερό-, ενός ενδοκυτταρικού ή εξωκυτταρικού μαστιγίου, ενός συστήματος Golgi και ενός κινητοπλάστη (μιτοχόνδριο με μεγάλη ποσότητα DNA), ο οποίος συνδέεται απευθείας με τη βάση του μαστιγίου (Rudzinska *et al.* 1964; Aleman 1969; Wheeler *et al.* 2016). Ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται με απλή διαίρεση και λαμβάνει χώρα σε δύο ξενιστές, στο διαβιβαστή και στο σπονδυλωτό ξενιστή (Sunter & Gull 2017).



Εικόνα 22: Αμαστιγωτή μορφή της *Leishmania*
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmania_infantum.png)



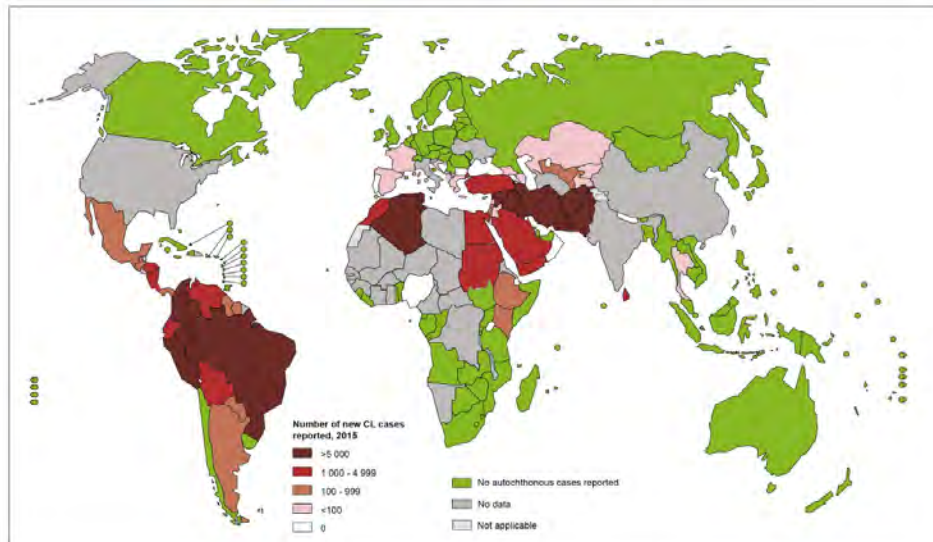
Εικόνα 23: Μαστιγωτή μορφή της *Leishmania*
(<http://www.idbiodiversitas.com/2017/01/pengertian-morfologi-distribusi-siklus.html>)

3.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

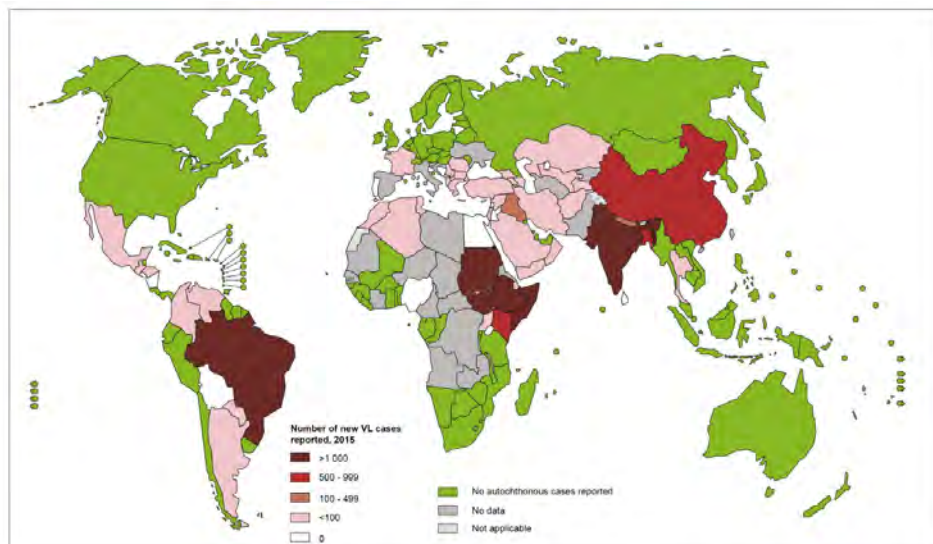
Η νόσος της λεισμανίασης είναι ενδημική κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές όπως και σε όλες τις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου και στην Πορτογαλία, θέτωντας σε κίνδυνο περισσότερα από 350 εκατομμύρια ανθρώπους σε 78 χώρες του Παλαιού Κόσμου (Ευρώπη, Ασία, Αφρική) και 23 του Νέου Κόσμου (Αμερική) (Roberts *et al.* 2000; Alvar *et al.* 2012). Εμφανίζεται με τρεις κύριες κλινικές μορφές, τη δερματική, τη σπλαχνική και τη βλεννογοδερματική λεισμανίαση, με τη σπλαχνική να είναι και η πιο σοβαρή και η οποία χωρίς έγκαιρη και κατάλληλη θεραπεία μπορεί να είναι θανατηφόρος. Μεγάλη σημασία στη γεωγραφική εντόπιση της ασθένειας παίζουν οι κλιματολογικές συνθήκες, και κυρίως τα υψηλά επίπεδα της θερμοκρασίας και υγρασίας που επικρατούν, καθώς αυτές αποτελούν βασικές προϋποθέσεις αναπαραγωγής, ανάπτυξης και δραστηριοποίησης των διαβιβαστών του παρασίτου, δηλαδή των σκνιπών. (Killick-Kendrick 1990).

Σήμερα, είναι γνωστά περισσότερα από 40 είδη *Leishmania* παγκοσμίως. Από αυτά, βρέθηκαν: α) η *Leishmania infantum* στις χώρες της Μεσογείου, της Μέσης Ανατολής, Αραβία, Ιράκ, Ιράν, β) η *Leishmania donovani* επίσης σε χώρες της Μεσογείου, στις Ινδίες και σε χώρες της Αφρικής, γ) η *Leishmania chagasi* στην Αμερική (που στην πραγματικότητα είναι η *Leishmania infantum*), δ) η *Leishmania tropica* σε Ευρώπη, Ασία και Αφρική, ε) η *Leishmania major* στην Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Ιράν, Ιράκ, στ) η *Leishmania enriettii* παγκοσμίως, ζ) η *Leishmania peruviana* στην Αμερική, η) το *Leishmania mexicana complex* (τουλάχιστον 3 είδη) στην Αμερική και θ) το *Leishmania braziliensis complex* (τουλάχιστον 3 είδη) στην Αμερική (Χαραλαμπίδης 2001).

Τα κρούσματα της λεισμανίασης στον άνθρωπο έχουν αυξηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο την τελευταία δεκαετία. Σε αυτό, μείζονος σημασίας ρόλο έχουν διαδραματίσει κυρίως περιβαλλοντικοί παράγοντες και κλιματικές αλλαγές, η παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας, οι βροχοπτώσεις, οι συνεχείς μετακινήσεις πληθυσμού (μετανάστευση, ταξίδια, πόλεμοι) (WHO 2018). Η νόσος εμφανίζεται, συνήθως, στις φτωχότερες και αναπτυσσόμενες χώρες, με αυτές να συγκεντρώνουν και το μεγαλύτερο ποσοστό κλινικών εκδηλώσεων είτε της σπλαχνικής είτε της δερματικής λεισμανίασης.



Εικόνα 24: Χάρτης γεωγραφικής κατανομής νέων κρουσμάτων της δερματικής λείσμανιάσης (WHO 2018)



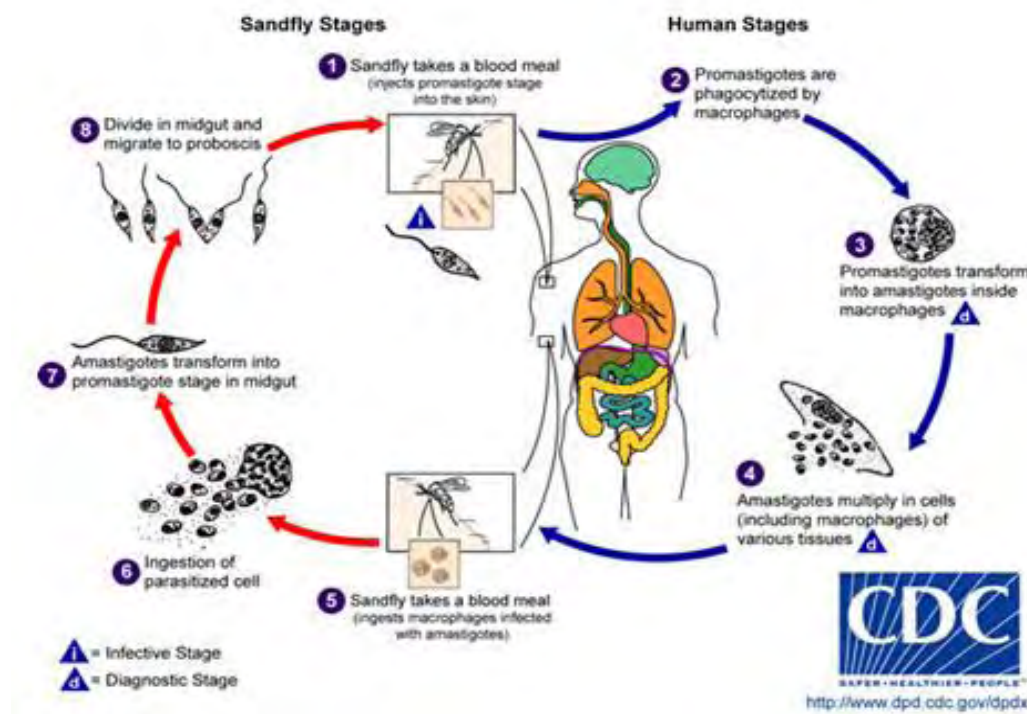
Εικόνα 25: Χάρτης γεωγραφικής κατανομής νέων κρουσμάτων της σπλαχνικής λείσμανιάσης (WHO 2018)

3.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Κύριοι ξενιστές του παρασίτου *Leishmania* στη φύση είναι ο σκύλος, η γάτα, ο επίμυς, ο κρικητός, οι σαύρες, η αλεπού καθώς και ο άνθρωπος. Ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου αποτελείται από δύο στάδια, σε καθένα από τα οποία απαντάται διαφορετική εξελικτική μορφή του παρασίτου, ανάλογα σε ποιον οργανισμό-ξενιστή βρίσκεται. Πιο συγκεκριμένα, η προμαστιγωτή μορφή εντοπίζεται εξωκυτταρικά, στο έντερο της θηλυκής σκνίπας στο οποίο αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται, είναι επιμήκης (12-25 x 1,5-3,5μm), με πυρήνα, κινητοπλάστη και μαστίγιο (12-28μm), κινούμενη προς την κατεύθυνση του μαστιγίου. Η αμαστιγωτή μορφή εντοπίζεται ενδοκυτταρικά, στο αίμα των σπονδυλωτών ξενιστών, προσβάλλοντας τα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα κύτταρα, είναι ωοειδής (2-5 x 1,5-2μm) και διαθέτει πυρήνα, κινητοπλάστη και ενδοκυτταρικό μαστίγιο το οποίο βρίσκεται σε ειδική θήκη (Molyneux & Killick-Kendrick 1987).

Ο βιολογικός κύκλος της *Leishmania* λαμβάνει χώρα με τη συνδρομή μόνο των θηλυκών σκνιπών, καθώς αυτά τα άτομα είναι που τρέφονται με αίμα κατά την αναπαραγωγική τους περίοδο και για την παραγωγή αυγών, ενώ οι διατροφικές τους συνήθειες πριν την αναπαραγωγή είναι ίδιες με αυτές των αρσενικών ατόμων. Κατά την απομύζηση αίματος από το μολυσμένο ξενιστή, η θηλυκή σκνίπα προσλαμβάνει την αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου η οποία βρίσκεται σε μονοκύτταρα/μακροφάγα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η πέψη του μολυσμένου κυττάρου, με το παράσιτο να απελευθερώνεται στο οπίσθιο τμήμα του μεσεντέρου (στομάχι) της σκνίπας, να πολλαπλασιάζεται με απλή διαίρεση για τουλάχιστον 42 ώρες και να διέρχεται τρεις μορφές (αποιοειδή, ελλειπτική και επιμήκη προμαστιγωτή μορφή). Η ανάπτυξη του ολοκληρώνεται, συνήθως, σε 8-10 ημέρες, από τις οποίες, τις τελευταίες 2-3 ημέρες, το παράσιτο προσεγγίζει τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου της σκνίπας και επικαλύπτεται με λιποφωσφογλυκάνες, που παράγονται από αυτά. Ο εγκλεισμός του παρασίτου στο περίβλημα των φωσφογλυκανών στόχο έχει την προστασία του από τα λιπικά ένζυμα του σπονδυλωτού ξενιστή μετά τον ενοφθαλμισμό του στο δέρμα. Μετά, η προμαστιγωτή μορφή μεταναστεύει στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου και από εκεί στον οισοφάγο και στην προβοσκίδα της σκνίπας, όπου και μετεξελίσσεται στη μετακυκλική μολυσματική μορφή της. (Killick-Kendrick & Rioux 2002).

Η μόλυνση πραγματοποιείται όταν η μετακυκλική προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου ενοφθαλμιστεί στην επιδερμίδα των σπονδυλωτών ξενιστών, καθώς η μολυσμένη σκνίπα εισάγει τα στοματικά της μόρια στο δέρμα και εκτελεί τις κινήσεις αναρρόφησης αίματος. (Sacks & Perkins 1984). Το παράσιτο εντός 30 λεπτών μετεξελίσσεται στην αμαστιγωτή μορφή και σε 3-4 ώρες εισβάλλει στα μακροφάγα και εισέρχεται με τα προσβεβλημένα αυτά κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος εντός 24 ωρών. Εντός των μακροφάγων, και συγκεκριμένα στα λυσοσωμάτια, η αμαστιγωτή μορφή πολλαπλασιάζεται με απλή διαίρεση (μίτωση), παράγοντας περίπου 200 παράσιτα ανά κύτταρο και προκαλώντας τη ρήξη και την καταστροφή των κυττάρων κάθε 12-24 ώρες και την εκ νέου προσβολή άλλων. Τέλος, ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου ολοκληρώνεται όταν η θηλυκή σκνίπα προσλάβει από τον ξενιστή-παρακαταθήκη αίμα το οποίο περιέχει μολυσμένα κύτταρα. (Killick-Kendrick 2002).



Εικόνα 26: Βιολογικός κύκλος της *Leishmania tropica* (Centers for Disease Control and Prevention 2018)

Από τα 800 και πλέον είδη σκνιπών που έχουν βρεθεί σε όλο τον κόσμο, τα 40 είδη διαπιστώθηκε ότι είναι μεταδότες των ειδών *Leishmania*. Πιο συγκεκριμένα, οι σκνίπες *Phlebotomus* spp. είναι διαβιβαστές του παρασίτου στο ανατολικό ημισφαίριο (Ευρώπη, Ασία, Αφρική) και οι σκνίπες *Lutzomyia* spp. στο δυτικό ημισφαίριο (Αμερική). Στη λεκάνη της Μεσογείου βρέθηκαν συνολικά 21 είδη σκνιπών (18 *Phlebotomus* spp. και 3 *Sergentomyia* spp.) (Alvar *et al.* 2012; Maroli *et al.* 2013; WHO 2018).

4. Η ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η λείσμανίαση θεωρείται τροπική νόσος, από τις πλέον παραμελημένες, με ένα μεγάλο φάσμα κλινικών εκδηλώσεων και συμπτωμάτων, το οποίο, βέβαια, εξαρτάται από το είδος της *Leishmania* καθώς και την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή (WHO 2018). Οι κλινικές μορφές με τις οποίες εμφανίζεται είναι διαφορετικής βαρύτητας βάσει της θνησιμότητας που προκαλούν, εντούτοις, σε κάθε μία περίπτωση η έγκαιρη διάγνωση και η άμεση θεραπεία αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για την αντιμετώπισή τους. Το πρώτο κλινικό σύνδρομο με το οποίο εμφανίζεται η λείσμανίαση, είναι η Σπλαχνική λείσμανίαση (ΣΛ) (VL, Visceral Leishmaniasis), η οποία αποτελεί και την πιο σοβαρή μορφή της νόσου, και ακολουθούν η Δερματική λείσμανίαση (ΔΛ) (CL, Cutaneous Leishmaniasis) και η Βλεννογοδερματική λείσμανίαση (ΒΛ) (MCL, Mucocutaneous Leishmaniasis) (WHO 2018).

4.1. ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η Σπλαχνική λείσμανίαση (ΣΛ) είναι χρόνια νόσημα των μονοκύτταρων/μακροφάγων των ιστών και των οργάνων του ανθρώπου στις μεσογειακές και άλλες χώρες ανά τον κόσμο (*L. infantum*). Στην Ινδία και στην ανατολική Αφρική απαντάται στον άνθρωπο η ινδική και αφρικανική μορφή του νοσήματος που είναι γνωστή ως kala-azar ή ως πυρετός dum-dum (*L. donovani*).

Το παράσιτο εμφανίζεται με την προμαστιγωτή μορφή στο έντερο της θηλυκής σκνίπας και με την αμαστιγωτή στα κύτταρα του αίματος, του δέρματος και των σπλάχνων του ανθρώπου. Η μόλυνση του ξενιστή γίνεται με τον ενοφθαλμισμό της προμαστιγωτής μορφής του παρασίτου από το διαβιβαστή στο δέρμα, κατά την αναρρόφηση του αίματος. Ο πολλαπλασιασμός του παρασίτου γίνεται κυρίως στα μονοκύτταρα/μακροφάγα των ιστών που έχουν σχετικά υψηλή θερμοκρασία (ήπαρ, σπλήνα, μυελός των οστών). Η περίοδος επώασης στον άνθρωπο είναι 2-6 μήνες, όμως μπορεί να κυμαίνεται και από λίγες ημέρες έως και πολλά χρόνια.

Μετά την περίοδο επώασης (μερικές εβδομάδες έως 9 χρόνια), εμφανίζεται, συνήθως, πυρετός στο 83-95% των ασθενών, σπληνομεγαλία (93-98%), αδυναμία (70-100%), ηπατομεγαλία (55-65%), επίσταξη (44-55%), διάρροια (25-55%), πολυκλωνική γ-σφαιριναιμία >30 g/l (98%), αναιμία (61-92%), θρομβοκυτταροπενία (73%), λευκοματινοπενία <30 g/l (88%), λευκοκυτταροπενία (84%), αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης (40%), τρανσαμινασαιμία (22%), χολερυθριναιμία (17%) και σπανίως ηωσινοφιλία και λεμφαδενοπάθεια (Al-Jurayyan *et al.* 1995; Berman 1997; Prasad *et al.* 2009).

Πολλές φορές, βέβαια, η ΣΛ εμφανίζεται ως ευκαιριακό-δευτερογενές νόσημα στα ανοσοκατεσταλμένα άτομα με AIDS, στα οποία εμφανίζει πολλά, όχι χαρακτηριστικά της νόσου, συμπτώματα, με τη θεραπευτική ανταπόκριση να είναι ελάχιστη. Στα μικρά παιδιά η νόσος, συνήθως, εκδηλώνεται με ελάχιστα συμπτώματα, με χρόνιες υποπυρετώδεις θερμοκρασίες, διόγκωση κοιλιακών οργάνων και καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Neuber 2008). Αξίζει να σημειωθεί πως η ΣΛ χωρίς θεραπεία είναι θανατηφόρα στο 95% των ασθενών, ενώ αντίστοιχα αν δοθεί εγκαίρως είναι επιτυχής στο 95%-98% των περιστατικών, με σπάνιες υποτροπές.



Εικόνα 27. Ασθενής με ηπατοσπληνομεγαλία λόγω σπλαχνικής λείσμανίασης (eNetMD 2018)

4.2. ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ (ΔΛ)

4.2.1. ΕΝΤΟΠΙΣΜΕΝΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η Εντοπισμένη Δερματική λείσμανίαση (ΕΔΛ) είναι χρόνιο νόσημα των μακροφάγων του δέρματος του ανθρώπου (*L. tropica*, *L. major*) και των ζώων (σαρκοφάγα, τρωκτικά, λαγόμορφα) σε μεσογειακές και άλλες χώρες (Ασία, Αφρική, Αμερική). Έχουν περιγραφεί δύο μορφές της νόσου: α) Η υγρή μορφή (ζωννόσος), η οποία οφείλεται στη *L. major* και προσβάλλει κυρίως άγρια ζώα και τρωκτικά και β) η ξηρή μορφή (ανθρωπονόσος), η οποία οφείλεται στη *L. tropica* και προσβάλλει τον άνθρωπο.

Η κλινική εικόνα της νόσου περιλαμβάνει αλλοιώσεις κυρίως στα γυμνά τμήματα του σώματος (πρόσωπο, λαιμός, άκρα), τα οποία είναι εύκολα προσβάσιμα από τους φλεβοτόμους. Οι αλλοιώσεις αυτές περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες ερυθηματώδεις βλατίδες, οι οποίες μπορεί να εξελιχθούν σε οζίδια ή πλάκες και τελικά σε έλκος με υπερτροφικά όρια. Επίσης, υπάρχει περίπτωση ανάπτυξης υποδερματικών οζιδίων πέριξ του έλκους λόγω της λεμφαγγειακής μετάδοσης του παρασίτου καθώς και διόγκωση των λεμφαδένων (Al-Gindan *et al.* 1989). Τέλος, μετά από 6-12 μήνες το έλκος υποχωρεί αφήνοντας μια ουλή με υπερχρωμία ή υποχρωμία.

4.2.2. ΔΙΑΧΥΤΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΙΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η Διάχυτη Δερματική λείσμανίαση (ΔΔΛ) αποτελεί μορφή της ΕΔΛ και οφείλεται στη *L. Aethiopica*. Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει με εξελκωμένα οζίδια πλήρη σε παράσιτα, τα οποία συνήθως διασπείρονται στο υπόλοιπο σώμα (άκρα, πρόσωπο). Η ΔΔΛ ακολουθεί χρόνια πορεία, συνήθως υποτροπιάζει και είναι ανθεκτική στη θεραπεία (Grevelink & Lerner 2001).

4.2.3. ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΥΣΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΙΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η εκδήλωση της Υποτροπιάζουσας Δερματικής λείσμανίασης (ΥΔΛ) προϋποθέτει την αναζωπύρωση αδρανών παρασίτων (*L. tropica*), είτε μετά από επαναμόλυνση είτε μετά από μεταβολή του ανοσολογικού προφίλ του ξενιστή, συνήθως ύστερα από μια περίοδο 1 έως 15 ετών (Grevelink & Lerner 2001). Η κλινική εικόνα της νόσου περιλαμβάνει την εμφάνιση νέων αλλοιώσεων είτε στο κέντρο είτε στην περιφέρεια μιας προϋπάρχουσας ουλής από ΕΔΛ, ύστερα από την επούλωσή της. Οι αλλοιώσεις εμφανίζονται ως ερυθηματώδεις βλατίδες και πλάκες με ενεργά χείλη και κεντρική ίαση και πολλές φορές ως αλλοιώσεις ψωρίασης.

4.2.4. META KALA-AZAR ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΙΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η μετά kala-azar δερματική λείσμανίαση εμφανίζεται συνήθως 1-2 χρόνια μετά την αποδρομή της ΣΛ και οφείλεται στη *L. donovani*, στην Ανατολική Αφρική σε ποσοστό ασθενών 5% (Rashid *et al.* 1986) και στην Ινδία σε ποσοστό 20% (Rees & Kager 1987). Οι αλλοιώσεις περιλαμβάνουν ερυθηματώσεις ή υπερχρωματικές/υποχρωματικές κηλίδες, βλατίδες, εξελκωμένα οζίδια και πλάκες στο πρόσωπο και στα άκρα με

συμμετρική κατανομή. Τέλος, παρατηρείται αυτοϊαση των αλλοιώσεων μετά από μερικούς μήνες, καθώς τα περιστατικά αυτής της μορφής είναι περισσότερο ανθεκτικά στη θεραπεία (Grevelink & Lerner 2001).



Εικόνα 28. Ασθενής με αλλοιώσεις μετα kala-azar δερματική λειψμανίαση (WHO 2018)

4.3. ΒΛΕΝΝΟΓΟΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Η Βλεννογοδερματική λειψμανίαση (ΒΔΛ) αρχικά εκδηλώνεται όπως και η ΕΔΛ και στη συνέχεια εξαπλώνεται στους βλεννογόνους, κυρίως του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Ακολούθως, είναι δυνατόν να επέλθει μερική ή ολική καταστροφή των βλεννογόνων του ρινικού διαφράγματος, των χειλέων, της υπερώας, του φάρυγγα και των αμυγδαλών, με την περαιτέρω συνέχιση στα οστά να είναι σπάνια. Η εξάπλωση των αλλοιώσεων περιλαμβάνει και την κοιλότητα του λάρυγγα, της τραχείας και των βρόγχων, με τον υποσιτισμό και κυρίως την οξεία πνευμονία να αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου των ασθενών (Grevelink & Lerner 2001).



Εικόνα 29. Ασθενής με αλλοιώσεις βλεννογροδερματικής λεισμανίασης (Animalia life 2017)

4.4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η αρχική διαγνωστική προσέγγιση στις μορφές Δερματικής λεισμανίασης περιλαμβάνει την προσεκτική εξέταση του ασθενούς για ανεύρεση τυπικών δερματικών βλαβών και λήψη ιστορικού, με έμφαση σε πρόσφατα ταξίδια σε ενδημικές περιοχές της νόσου. Στην περίπτωση της ΣΛ, η οποία είναι και πιο σοβαρή μορφή, απαιτεί διαφορική διάγνωση από νόσους αντίστοιχης συμπτωματολογίας, όπως AIDS, ηπατίτιδα, λευχαιμία, ελονοσία.

Η επιβεβαίωση της διάγνωσης γίνεται εργαστηριακά με άμεση αναζήτηση των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου σε επιφανειακά επιχρίσματα μολυσμένου ιστού του ασθενούς (ΔΛ, ΒΔΛ), σε υλικά βιοψίας ή σε υλικό αναρρόφησης με λεπτή βελόνα από σπλήνα, μυελό των οστών ή λεμφαδένες στη ΣΛ ή από τις δερματικές αλλοιώσεις στην περίπτωση της ΔΛ-ΒΔΛ. Σε αυτά πραγματοποιείται άμεση ανίχνευση με χρώση Giemsa ή Diff Quick (Guerin *et al.* 2002; Alvar *et al.* 2012; WHO 2018) ή άμεσο ανοσοφθορισμό για εντοπισμό αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στα μακροφάγα. Οι ορολογικές δοκιμασίες της ELISA (Burns *et al.* 1993) και του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFAT) (Pappas *et al.* 1983) για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι της Λεισμανία στον ορό του ασθενή είναι εξαιρετικά χρήσιμα διαγνωστικά μέσα στην περίπτωση της ΣΛ, σε αντίθεση με τη ΔΛ, όπου οι τίτλοι των αντισωμάτων είναι χαμηλοί ή αρνητικοί. Τέλος, νεότερες μέθοδοι ταυτοποίησης του παρασίτου όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα (Pratt & David 1981) η ισοενζυμική ανάλυση (Kilgour *et al.* 1974) και πρωτίστως η μοριακή τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για ανίχνευση γενετικού υλικού του παρασίτου σε βιολογικά δείγματα (Ashford 2000) αποτελούν εξίσου ισχυρά διαγνωστικά μέσα σε συνδυασμό πάντα και με τα εργαστηριακές τεχνικές.

4.5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία της λείσμανίασης είναι χρονοβόρος, υψηλού κόστους και πολλές φορές απαιτεί τη νοσηλεία του ασθενούς. Ιδανική θεραπεία η οποία καλύπτει όλες τις μορφές της νόσου δεν υπάρχει, καθώς η επιλογή του θεραπευτικού σχήματος καθορίζεται από το είδος του παρασίτου και την κλινική εικόνα του πάσχοντος (Herburn 2000; Önder *et al.* 2000). Στη ΔΛ, λόγω του υψηλού βαθμού αυτοϊάσης που παρατηρείται, συχνά δεν απαιτείται θεραπεία, σε αντίθεση με τη ΒΔΛ, τη ΔΔΛ, τη ΥΔΛ και τη ΣΛ και τις περιπτώσεις ΔΛ που εντοπίζεται σε αισθητικά ή λειτουργικά σημαντικές περιοχές του σώματος (πρόσωπο) και στις οποίες η θεραπευτική αγωγή είναι επιβεβλημένη.

Βάση της συστηματικής θεραπείας της λείσμανίασης αποτελούν οι ενώσεις αλάτων πεντασθενούς αντιμονίου, με κύριους εκπροσώπους το στιλβογλυκονικό νάτριο (sodium antimony gluconate-Pentostam) και την αντομονιακή μεγλουμίνη (meglumine antimoniate-Glucantime) (Ashford 2000). Βέβαια, παρά τη χρήση τους για περισσότερα από 100 χρόνια μέχρι σήμερα, τόσο οι σοβαρές παρενέργειές τους (Baneth & Shaw 2002) όσο και η ανάπτυξη αντοχής του παρασίτου σε αυτά (Singh 2006), σταδιακά περιορίζεται η χορήγησή τους και αντικαθίσταται από νέα και βελτιωμένα φαρμακευτικά σχήματα (Murray *et al.* 2005). Έτσι, φάρμακο εκλογής πλέον, θεωρείται η λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β (AmB) η οποία παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα στα πλαίσια της θεραπείας. Εντούτοις, λόγω των σοβαρών παρενεργειών που ενδέχεται να παρουσιάσει ο ασθενής (νεφρική ανεπάρκεια, οξεία ηπατική ανεπάρκεια, καρδιακή ανακοπή και σπασμούς), η χορήγησή της πραγματοποιείται μόνο σε νοσοκομειακή μονάδα. Τέλος, μια νέα δραστική ουσία η οποία σταδιακά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα πλαίσια της αντι-λείσμανιακής θεραπείας, είναι η Μιλτεφοσίνη (hexadecyl phosphocholine-Milteforan), η οποία χορηγείται στη ΣΛ και αντιπροσωπεύει τον πρώτο αναγνωρισμένο αντι-λείσμανιακό παράγοντα με αποτελεσματική χορήγηση από το στόμα (*per os*) (Sundar *et al.* 2002; Virbac 2017).

4.6. ΜΕΤΡΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ-ΠΡΟΛΗΨΗ

Σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της νόσου διαδραματίζουν τα κατάλληλα μέτρα αντιμετώπισης, τα οποία είναι συνάρτηση της γνώσης της επιδημιολογίας τόσο του παρασίτου *Leishmania spp.* όσο και των διαβιβαστών του. Πιο συγκεκριμένα, σε περιοχές στις οποίες είναι αποδεδειγμένη η παρουσία φλεβοτόμων-διαβιβαστών του παρασίτου συνιστάται η περιοδική χρήση εντομοκτόνων για την καταπολέμησή τους, με προσεκτική επιλογή σκευάσματος, καθώς πολλοί πληθυσμοί έχουν αναπτύξει αντοχή σε αυτά (Desjeux 1996). Επιπλέον, ο εξοπλισμός των κατοικιών με συρμάτινα πλέγματα προστασίας στα παράθυρα, ο σωστός ρουχισμός (ρούχα που καλύπτουν τα άκρα) των

ατόμων που εργάζονται κοντά στα ενδονοσήμια των φλεβοτόμων καθώς και η εφαρμογή εντομοαπωθητικών στα ακάλυπτα τμήματα του σώματος, αποτελούν μέτρα πρόληψης της νόσου. Τέλος, βαρύνουσας σημασίας είναι και ο ρόλος των κατοικίδιων ζώων, και κυρίως του σκύλου –ο οποίος αποτελεί κύρια δεξαμενή του παρασίτου στη φύση. Η προστασία των σκύλων με ειδικά εντομοαπωθητικά κολάρα καθώς και ο ορολογικός έλεγχός τους τουλάχιστον δύο φορές το χρόνο και κυρίως τους θερμούς μήνες του έτους- αποτελεί παράγοντα πρόληψης και περιορισμού της νόσου (Desjeux 2001).

5. Η ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ ΣΤΟ ΣΚΥΛΟ

Η λειψμανίαση του σκύλου (CanL) είναι λοιμώδης και πολυσυστηματικό νόσημα που προκαλείται από τη *L. infantum* και θεωρείται ενδημικό στις χώρες της Μεσογείου και την Πορτογαλία (Baneth 2005). Ο σκύλος είναι η κύρια δεξαμενή στη φύση του συγκεκριμένου είδους *Leishmania*, γεγονός το οποίο επηρεάζει και την εκδήλωση της νόσου στον άνθρωπο, κυρίως σε περιοχές με αυξημένο αριθμό μολυσμένων σκύλων (Christodoulou *et al.* 2012). Η λειψμανίαση στο σκύλο αποτελεί από τα συχνότερα πρωτοζωικής προέλευσης παρασιτικό νόσημα στη λεκάνη της Μεσογείου, με το ποσοστό των οροθετικών ζώων να αγγίζει το 85% (Gradoni 2002).

5.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ

Στην Ελλάδα, η λειψμανίαση στο σκύλο εμφανίζεται τα τελευταία χρόνια σε υψηλά ποσοστά, ανάλογα την περιοχή, γεγονός το οποίο σχετίζεται άμεσα με το κλίμα και κατ' επέκταση τη δυνατότητα αναπαραγωγής και δραστηριοποίησης των φλεβοτόμων που είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση του παρασίτου. Πιο συγκεκριμένα, το χρονικό διάστημα 1986-1994, το ποσοστό οροθετικότητας στους σκύλους ανερχόταν στο 22,4% στην περιοχή της Αθήνας (Sideris *et al.* 1999), ενώ στην Κρήτη, από ποσοστό οροθετικότητας 10% το 1990, την περίοδο 1990-2006 αυξήθηκε κατά 2,4% (Antoniou *et al.* 2009) και μέχρι σήμερα συνεχίζεται η ανοδική πορεία. Γενικότερα, στις χώρες της Μεσογείου και την Πορτογαλία, το ποσοστό των οροθετικών ζώων στο σύνολο του πληθυσμού, ενδεχομένως να υπερβαίνει το 80% (Berrahal *et al.* 1996; Dereure *et al.* 1999; Gradoni 2002).

Η υψηλή συχνότητα της CanL αποτελεί παράγοντα επικινδυνότητας (risk factor) για τη Δημόσια Υγεία, καθώς αυξημένα ποσοστά οροθετικότητας σε σκύλους σημαίνει και αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης της ασθένειας στον άνθρωπο. Επιπλέον παράγοντες επικινδυνότητας οι οποίοι αυξάνουν τον επιπολασμό της νόσου, είναι και οι εξής: α) οι κλιματικές αλλαγές και συγκεκριμένα το ζεστό κλίμα και η σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας στις χώρες της Μεσογείου και στην Πορτογαλία, γεγονός το οποίο ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των φλεβοτόμων (Feidas & Lalas 2001), β) η ανεξέλεγκτη αύξηση των αδέσποτων σκύλων οι οποίοι εκτίθενται στο παράσιτο χωρίς μέτρα προστασίας και χωρίς θεραπεία εφόσον μολυνθούν, γ) η μη εφαρμογή παλαιότερων τεχνικών αποπαρασιτισμού στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις των αγροτικών περιοχών, οι οποίες κατά το παρελθόν είχαν εξοντώσει πληθυσμούς φλεβοτόμων και δ) η αύξηση της μεταναστευτικής εισροής από το 1990 και κυρίως τα τελευταία 2 χρόνια, με την οποία υπάρχει πιθανότητα εισαγωγής νέων ειδών του παρασίτου τα οποία ενδημούν στη Μέση Ανατολή και την Τουρκία.

5.2. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Η λεϊσμανίαση στο σκύλο είναι ένα πολυσυστηματικό, χρόνιο νόσημα, με σπλαχνική και δερματική εκδήλωση και προκαλείται κυρίως από τη *L. infantum*, ύστερα από μια περίοδο επώασης από 3 μήνες μέχρι 7 χρόνια (Koutinas *et al.* 1999). Η προσβολή του σκύλου από το παράσιτο γίνεται ανεξάρτητα φυλής, φύλου ή ηλικίας και ο εντοπισμός του περιλαμβάνει όλα τα όργανα και συστήματα του οργανισμού, ακόμα και το κεντρικό νευρικό σύστημα (Vinuelas *et al.* 2001).

Στις δερματικές αλλοιώσεις της λεϊσμανίασης στο σκύλο περιλαμβάνονται έλκη, οζίδια, αποφολιδωτική δερματίτιδα, περιοφθαλμική αλωπεκία, ονυχογρύπωση, υπερκεράτωση πελματικών φυμάτων, άσηπτη φλυκταινώδης δερματίτιδα, υπερκεράτωση και αποχρωματισμός ακρορρινίου και παρωνυχία. Στις περιπτώσεις της ονυχογρύπωσης και της παρωνυχίας, συνήθως υπάρχει επιπλοκή με *Staphylococcus intermedius* (Koutinas *et al.* 1999).

Στα πλαίσια της σπλαχνικής μορφής της νόσου, η αρχική συμπτωματολογία είναι παρόμοια με αυτή άλλων συνδρόμων και περιλαμβάνει ανορεξία, κατάπτωση, μείωση σωματικού βάρους, παρά την κανονική ή/και αυξημένη όρεξη, πολυδιψία, πυρετό και εύκολη κόπωση. Επιπλέον, κύριο σύμπτωμα είναι και η περιφερική λεμφαδενοπάθεια και η σπληνομεγαλία. Στους οφθαλμούς συχνά παρατηρείται επιπεφυκίτιδα, ελκώδης βλεφαρίτιδα και ξηρά κερατοεπιπεφυκίτιδα (Koutinas *et al.* 1999). Συνέχεια των οφθαλμικών κλινικών εκδηλώσεων της νόσου είναι και αυτές της ρινικής κοιλότητας, με ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη επίσταξη λόγω ελκώδους ρινίτιδας σε συνδυασμό με τη θρομβοκυτταροπενία (Juttner *et al.* 2001). Τέλος, άλλα συνήθη συμπτώματα της σπλαχνικής μορφής της νόσου είναι η χρόνια ηπατίτιδα λόγω της άμεσης δράσης των παρασίτων στα μακροφάγα του ήπατος, καθώς και η χρόνια κολίτιδα και εντερίτιδα (Koutinas *et al.* 1999).



Εικόνα 30. Σκύλος με κερατοεπιπεφυκίτιδα και βλεφαρίτιδα λόγω λεϊσμανίασης (Nilüfer *et al.*, 2017)



Εικόνα 31. Σκύλος με επίσταξη λόγω λείσμανίασης (Nilüfer et al., 2017)

5.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της λείσμανίασης στο σκύλο στηρίζεται στο συνδυασμό ευρημάτων από την κλινική εικόνα του ζώου και αποτελέσματα ειδικών εργαστηριακών εξετάσεων από βιολογικά δείγματα (αίμα, υλικό παρακέντησης κ.ά.).

Κατά την κλινική εξέταση του ζώου, παρατηρούνται κάποια ή συνδυασμός κάποιων από τα προαναφερθέντα συμπτώματα (επίσταξη, ονυχογρύπωση, απώλεια σωματικού βάρους κ.ά.), εντούτοις, πολλές φορές δεν παρουσιάζονται καθόλου συμπτώματα, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% (Pinelli *et al.* 1995; Saridomichelakis *et al.* 2005). Στα πλαίσια των αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων, συνήθως παρατηρείται μη αναγεννητική αναιμία, υπολευκωματιναιμία, υπερσφαιριναιμία, πρωτεϊνουρία, σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των ηπατικών ενζύμων, αζωθαιμία και θρομβοκυτταροπενία.

Επιβεβαίωση της διάγνωσης γίνεται με την πραγματοποίηση ειδικών εργαστηριακών εξετάσεων. Συγκεκριμένα, η παρασιτολογική εξέταση πραγματοποιείται σε βιολογικά δείγματα (λεμφογάγγλια, αίμα, μυελό των οστών, σπλήνα), για την ανεύρεση αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου, εντούτοις έχει χαμηλή ευαισθησία, ειδικά σε ασυμπτωματικά ζώα. Επιπλέον, η διάγνωση μπορεί να στηριχθεί και στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι του παρασίτου. Έτσι, η χρήση του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFAT) (Pappas *et al.* 1983), της ανοσοενζυμικής δοκιμής ELISA (Burns *et al.* 1993; Martin-Sanchez *et al.* 2001) καθώς και η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Handman *et al.* 1984; Sinha *et al.* 1992), αποτελούν αξιόπιστες μεθόδους προσδιορισμού του τίτλου του παρασίτου στα νοσούντα ζώα. Τέλος, εξίσου αξιόπιστη

και με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα διαγνωστική μέθοδος αποτελεί και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), στην οποία πραγματοποιείται ανίχνευση του γενετικού υλικού του παρασίτου σε βιολογικά δείγματα (Roura *et al.* 1999; Solano-Gallego *et al.* 2001).

5.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Στα πλαίσια της φαρμακευτικής αγωγής, πλέον χρησιμοποιείται συνδυασμός ενώσεων αλάτων πεντασθενούς αντιμονίου (sodium antimony gluconate (Pentostam) και meglumine antimoniate (Glucantime)) (Ashford 2000) και αλλοπουρινόλης (Roura *et al.* 1999), σε διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα, τα οποία είναι δυνατόν να χορηγηθούν υποδόρια, ενδομυϊκά ή/και ενδοφλέβια. Εντούτοις, η διάρκεια αυτών των πρωτοκόλλων είναι μεγάλη χρονικά, με σοβαρές παρενέργειες και σταδιακά τη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών του παρασίτου (Baneth & Shaw 2002; Lamothe 2002), η οποία ήδη καταγράφεται (Singh 2006). Τέλος, νέο φάρμακο το οποίο χορηγείται είναι το Milteforan (hexadecyl phosphocholine, Miltefosine), το οποίο χορηγείται από στόματος (per os) και από τον ίδιο τον ιδιοκτήτη. Παρά το υψηλό κόστος και την τερατογόνο δράση του, η χορήγησή του σε συνδυασμό με αλλοπουρινόλη έχει πολύ καλά αποτελέσματα, ακόμα και σε ζώα με ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια (Sundar *et al.* 2002).

5.5. ΜΕΤΡΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ-ΠΡΟΛΗΨΗ

Η πρόληψη της μόλυνσης του σκύλου στηρίζεται στην προφύλαξή του έναντι των σκνιπών-διαβιβαστών του παρασίτου της Λεισμάνιας. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ειδικού φαρμακευτικού εντομοαπωθητικού περιλαίμιου στο σκύλο καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, με έμφαση τους θερμότερους μήνες (Μάιος-Οκτώβριος) (Maroli *et al.* 2001; Foglia Manzillo *et al.* 2006), καθώς και ειδικής φαρμακευτικής εντομοαπωθητικής αμπούλας στον αυχένα και στο υπόλοιπο σώμα του σκύλου κάθε μήνα. Επιπλέον, θα πρέπει να διενεργείται τουλάχιστον δύο φορές το χρόνο, προληπτική ορολογική εξέταση, ώστε σε περίπτωση μόλυνσης από το παράσιτο να τίθεται άμεσα η φαρμακευτική αγωγή. Τέλος, σημαντικό μέτρο πρόληψης είναι και η αποφυγή έκθεσης του σκύλου σε πιθανά ενδιαιτήματα των σκνιπών κατά τη διάρκεια της δραστηριοποίησής τους (αργά το απόγευμα), με τις βόλτες να διενεργούνται νωρίς το απόγευμα, κυρίως τους θερμότερους μήνες.

B) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η περιοχή μελέτης αφορά σε 11 νησιά του Αιγαίου. Η επιλογή των 11 νησιών (Ανάφη, Μήλος, Σίφνος, Άνδρος, Κάρπαθος, Νίσυρος, Λέρος, Ικαρία, Σαντορίνη, Πάτμος, Φολέγανδρος), έγινε με βασικό κριτήριο την απουσία στοιχείων και δεδομένων αναφορικά με την επιδημιολογία-επιζωοτιολογία της παρασιτικής νόσου λείσμανιασης σε αυτά. Τα νησιά αυτά αποτελούν μονοπάτια-διόδους ανάμεσα στην Ελλάδα και την Τουρκία όπου η νόσος ενδημεί. Θα ήταν, λοιπόν, ενδιαφέρον να μελετηθούν αυτές οι περιοχές, σε ό,τι αφορά στα διάφορα είδη σκνιπών σε αυτά και κυρίως του *P. neglectus*, ο οποίος αποτελεί το βασικό διαβιβάστη-ξενιστή του παρασίτου στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου. Επιπλέον, τα νησιά αυτά βρίσκονται ανάμεσα σε περιοχές (Κρήτη, Τουρκία, Κύπρος, ηπειρωτική Ελλάδα), στις οποίες έχουν γίνει μελέτες σχετικά με τους πληθυσμούς και την ταυτοποίηση ειδών σκνιπών στο παρελθόν (Mazeris *et al.* 2010; Ntais *et al.* 2013; Dokianakis *et al.* 2016), γεγονός πολύ σημαντικό για συγκριτικές έρευνες μεταξύ των περιοχών αυτών.

Η παρουσία πληθυσμών σκνιπών και μάλιστα διαφορετικών ειδών στην Κρήτη και στην ηπειρωτική Ελλάδα, κυρίως Αθήνα (Léger 1993; Ntais *et al.* 2013) στην Κύπρο (Deraquit *et al.* 2001; Mazeris *et al.* 2010) και στην Τουρκία (Simsek *et al.* 2007; Alten *et al.* 2016), αποτελεί χρήσιμο στοιχείο το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί στη σύγκριση των πληθυσμών αυτών με τους αντίστοιχους των υπό μελέτη νησιών και πιθανόν να καταδείξει την προέλευσή τους. Καθότι οι σκνίπες αδυνατούν να πετάξουν σε μεγάλες αποστάσεις (περίπου μέχρι και 500 μέτρα) (Lane & Crosskey 1993), οι κοντινές αποστάσεις μεταξύ των παραπάνω νησιών και των γειτονικών τους περιοχών (Εικόνα 32), πιθανόν ευνοούν τη μεταφορά πληθυσμών σκνιπών μέσω ρευμάτων αέρα ή με μέσα μεταφοράς (π.χ. πλοία).

Επιπρόσθετα, η επιλογή των συγκεκριμένων νησιών έγινε και με γνώμονα τα διαφορετικά γεωγραφικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά καθενός από αυτά, καθώς παρουσιάζουν ποικιλία τόσο στην έκτασή τους, στο μέγιστο υψόμετρό τους καθώς και στον πληθυσμό τους. Το εύρος της έκτασης κυμαίνεται από 32,384 τ.χιλ. (Φολέγανδρος) έως 374 τ.χιλ. (Άνδρος), το δε μέγιστο υψόμετρο από 270μ. (Πάτμος) έως 1220μ. (Κάρπαθος) και τέλος, ο πληθυσμός από 190 κατοίκους (Ανάφη) έως 15.250 κατοίκους (Σαντορίνη) (Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛΣΤΑΤ) 2011). Αναλυτικά τα γεωγραφικά και δημογραφικά στοιχεία του κάθε νησιού φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Τέτοιου είδους διαφορές διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην εξάπλωση πληθυσμών σκνιπών, καθώς μεγαλύτερη έκταση ευνοεί και μεγαλύτερη εξάπλωση, όσο και στη δραστηριότητά τους, καθώς μεγαλύτερος ανθρώπινος και ζωικός πληθυσμός συνεπάγεται και περισσότερες πιθανότητες τροφής των θηλυκών σκνιπών. Ο ρόλος του υψομέτρου είναι και αυτός σημαντικός, καθώς η δυνατότητα των σκνιπών να πετάξουν σε μεγάλο ύψος είναι περιορισμένος (περίπου μέχρι 18μ.) (Lane & Crosskey 1993), γεγονός το οποίο σημαίνει πως σε νησιά με μεγαλύτερο υψόμετρο πιθανόν να είναι και πιο περιορισμένος ο πληθυσμός των σκνιπών.

Τέλος, στα νησιά αυτά επικρατούν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους αδύναμοι άνεμοι (Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία (Ε.Μ.Υ.) 2017), με διττή σημασία: αφενός ευνοούν τη μετακίνηση πληθυσμών σκνιπών μεταξύ κοντινών αποστάσεων, είτε εντός του ίδιου νησιού είτε μεταξύ γειτονικών νησιών, και αφετέρου, παρεμποδίζουν έμμεσα τη μετακίνησή τους, καθώς μεγάλη σφοδρότητα ανέμων αποτρέπει τις σκνίπες στο να εγκαταλείψουν το ενδιαίτημά τους και να εκτεθούν στα ρεύματα αέρα. Ο ρόλος του αέρα φαίνεται αντιφατικός ως προς τη μετακίνηση των πληθυσμών, καθώς άλλοτε την ευνοεί και άλλοτε την αναστέλλει, εντούτοις, το πώς πραγματικά επηρεάζεται μια σκνίπα σχετίζεται με την εκάστοτε χρονική στιγμή κατά την οποία δραστηριοποιείται ή όχι, και συνεπακόλουθα στο βαθμό έκθεσής της στον αέρα.



Εικόνα 32: Χάρτης με τα υπό μελέτη νησιά του Αιγαίου αριθμημένα κατά αλφαβητική σειρά. (1) Ανάφη, (2) Άνδρος, (3) Ικαρία, (4) Κάρπαθος, (5) Λέρος, (6) Μήλος, (7) Νίσυρος, (8) Πάτμος, (9) Σαντορίνη, (10) Σίφνος, (11) Φολέγανδρος (Google Earth)

Πίνακας 1: Γεωγραφικά και δημογραφικά στοιχεία των υπό μελέτη νησιών του Αιγαίου

ΝΗΣΙΑ	ΕΚΤΑΣΗ (km ²)	ΜΕΓΙΣΤΟ ΥΨΟΜΕΤΡΟ (m.)	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ
Ανάφη	38,636	582	190
Άνδρος	374	994	9.221
Ικαρία	255	1.041	8.423
Κάρπαθος	302,152	1.220	7.310
Λέρος	54,052	320	7.917
Μήλος	151	751	5.129
Νίσυρος	41,263	698	987
Πάτμος	34,142	270	3.047
Σαντορίνη	76,19	567	15.250
Σίφνος	73,942	682	2.442
Φολέγανδρος	32,384	415	780

2. ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Η περισυλλογή των σκνιπών έγινε από τα παραπάνω νησιά του Αιγαίου την περίοδο Ιουνίου 2016-Σεπτεμβρίου 2016, στα πλαίσια χρηματοδοτούμενου προγράμματος από το AVIA-GIS. Οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν ήταν από 2 έως 4 ανά νησί, προκειμένου να καλυφθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι και διαφορετικοί οικότοποι (δασώδεις εκτάσεις είτε με πεύκα, είτε με πλατάνια και είτε με ελιές, εκτάσεις με ψηλή και πυκνή βλάστηση, παραποτάμιες περιοχές, ερειπωμένα κτίρια, περιοχές με υψόμετρο, στάβλοι, ορνιθώνες, περιοχές με πολλά σκυλιά). Στα πλαίσια της δειγματοληψίας, τοποθετήθηκαν 10-15 παγίδες (CDC light trap) (Alten *et al.* 2016) σε αριθμητικά αντίστοιχους οικότοπους, μεταξύ 18:00 και 06:00, χρονικό διάστημα, δηλαδή, κατά το οποίο δραστηριοποιούνται οι σκνίπες.

Η επιλογή του συγκεκριμένου είδους παγίδας έναντι των παγίδων με κολλητικές ταινίες (sticky traps), έγινε με κριτήριο την εκούσια προσέλκυση των σκνιπών μέσω του φωτισμού και όχι την τυχαία σύλληψή τους που συμβαίνει στο δεύτερο είδος παγίδας (Hagstrum *et al.* 1994). Επιπλέον, οι παγίδες με κολλητική ταινία είναι πιο δύσχρηστες, καθώς η απομάκρυνση των ατόμων από αυτήν είναι δύσκολη και πολλές φορές μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή τους, γεγονός το οποίο σημαίνει απώλεια δειγμάτων. Τέλος, βασικό μειονέκτημα των κολλητικών αυτών παγίδων είναι πως στη συνέχεια, κατά τη διενέργεια μοριακών τεχνικών ανάλυσης του γενετικού υλικού των σκνιπών, ενέχεται ο κίνδυνος αλλοίωσης των αποτελεσμάτων, καθώς υπάρχει πιθανότητα παρουσίας στοιχείων της κολλητικής ουσίας (γόμα) στα δείγματα. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκαν οι παγίδες CDC light traps, οι οποίες με τον λαμπτήρα που διαθέτουν προσελκύουν τις

σκνίπες και στη συνέχεια με τον ανεμιστήρα που διαθέτουν στην κορυφή τους, τις εγκλωβίζουν στον πυθμένα τους (Εικόνα 33.).



Εικόνα 33: Παγίδα τύπου CDC light trap πλησίον ορνιθώνα με αριθμημένα τα διάφορα τμήματά της. (1) Λαμπτήρας, (2) ανεμιστήρας, (3) πυθμένας παγίδας (Photo by: Tsirigotakis Nikolaos)

3. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΙ ΥΛΙΚΩΝ

3.1) ΕΞΑΓΩΓΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA-EXTRACTION)

Το πρώτο στάδιο των μοριακών τεχνικών περιλαμβάνει την εξαγωγή γενετικού υλικού από τα άτομα σκνιπών τα οποία περισυλλέχθηκαν από τα προαναφερθέντα νησιά του Αιγαίου. Τα δείγματα αυτά, αρχικά ταυτοποιήθηκαν μορφολογικά με τη χρήση κλειδών (ομάδα κοινών μορφολογικών χαρακτηριστικών ανά είδος) (Lane & Crosskey 1993). Κατά τη διαδικασία αυτή, παρατηρήθηκαν σε στερεοσκόπιο συγκεκριμένα τμήματα των

σκνιπών, στα οποία εντοπίζονται διαφορές ανά είδος. Τα κύρια αυτά τμήματα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν το κεφάλι και το γεννητικό σύστημα για τα αρσενικά άτομα και το κεφάλι, το γεννητικό σύστημα και επιπλέον το ένα από τα δύο φτερά για τα θηλυκά άτομα. Το υπόλοιπο σώμα και τα άκρα τους αποθηκεύτηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την εξαγωγή του γενετικού υλικού, το οποίο με τη σειρά του χρησιμοποιήθηκε στις μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης οι οποίες επακολούθησαν.

Στα πλαίσια της εξαγωγής του γενετικού υλικού από τις σκνίπες, χρησιμοποιήθηκε το QIAGEN QIAamp DNA micro kit (QIAGEN, EU). Η επιλογή του εν λόγω kit έγινε καθότι το συγκεκριμένο απευθύνεται σε μικρούς ποσοτικά ζωικούς ιστούς οι οποίοι κατ' επέκταση, περιέχουν και μικρή ποσότητα γενετικού υλικού, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση οι σκνίπες. Η χρήση του συγκεκριμένου kit περιελάμβανε και συγκεκριμένο πρωτόκολλο εφαρμογής της διαδικασίας εξαγωγής του γενετικού υλικού από τις σκνίπες, το οποίο ακολουθήθηκε επακριβώς, πλην κάποιων τροποποιήσεων που στόχευαν στην επίτευξη μεγαλύτερης δυνατής συγκέντρωσης (συμπύκνωση) του γενετικού υλικού, το οποίο ήταν ήδη ποσοτικά λιγοστό.

Πρωτοκόλλο εξαγωγής DNA από σκνίπα:

1. Λήψη ενός ατόμου σκνίπας (τα υπολείμματα του ιστού του ατόμου από τη διαδικασία της στερεοσκοπικής παρατήρησης) από σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml 70% αιθανόλης και θερμοκρασίας -20°C και μεταφορά του με τη χρήση λαβίδας σε νέο σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml.
2. Τοποθέτηση του σωληναρίου Eppendorf 1,5 ml που περιέχει τον ιστό σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 15-20 λεπτά, μέχρι πλήρους εξάτμισης όποιας ποσότητας αιθανόλης είχε παραμείνει κατά τη μεταφορά της σκνίπας.
3. Προσθήκη 180 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL στο σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Περαιτέρω τεμαχισμός και σύνθλιψη των τμημάτων της σκνίπας με τη χρήση PESTLES.
5. Προσθήκη 20 μl πρωτεϊνάσης K και ανάδευση με ελαφρό vortex για 15 δευτερόλεπτα.
6. Τοποθέτηση του δείγματος σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 56°C και επώαση ολόκληρη τη νύχτα έως την ολοκληρωτική διάλυση του ιστού.
7. Απομάκρυνση του δείγματος από το υδατόλουτρο την επόμενη ημέρα και προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL και στη συνέχεια ανάδευση με ελαφρό vortex για 15 δευτερόλεπτα.
8. Προσθήκη 200 μl αιθανόλη 100% και ανάδευση με ελαφρό vortex για 15 δευτερόλεπτα.
9. Επώαση του δείγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Σύντομη φυγοκέντρηση του δείγματος για να συγκεντρωθεί το περιεχόμενο στη βάση του σωληναρίου.
11. Μεταφορά του δείγματος σε μια κολώνα QIAmp MinElute.
12. Φυγοκέντρηση στα 6000 g (8000 rpm) για 1 λεπτό.

13. Απομάκρυνση του υγρού που συγκεντρώθηκε στο σωληνάριο συλλογής και αντικατάσταση του.
14. Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα AW1.
15. Φυγοκέντρηση στα 6000 g (8000 rpm) για 1 λεπτό.
16. Απομάκρυνση του υγρού που συγκεντρώθηκε στο σωληνάριο συλλογής και αντικατάσταση του.
17. Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα AW2.
18. Φυγοκέντρηση στα 6000 g (8000 rpm) για 1 λεπτό.
19. Απομάκρυνση του υγρού που συγκεντρώθηκε στο σωληνάριο συλλογής και αντικατάσταση του.
20. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (20000 g – 14000 rpm) για 3 λεπτά.
21. Απομάκρυνση του υγρού που συγκεντρώθηκε στο σωληνάριο συλλογής και αντικατάσταση του με ένα σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml.
22. Προσθήκη 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος ΑΕ.
23. Επώαση του δείγματος για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
24. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (20000 g – 14000 rpm) για 1 λεπτό.
25. Απομάκρυνση της κολώνας.
26. Αποθήκευση στους -20°C.

3.2) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, POLYMERASE CHAIN REACTON)

Το επόμενο βήμα που ακολουθεί την εξαγωγή του γενετικού υλικού, είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η οποία αποτελεί μοριακή τεχνική πολλαπλασιασμού γενετικού υλικού. Με τη διαδικασία αυτή, θα πολλαπλασιάσουμε συγκεκριμένο τμήμα ενός γονιδίου, αυτού της υπομονάδας 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COI) (Folmer *et al.* 1994; Hebert *et al.* 2003), από το συνολικό γονιδίωμα της σκνίπας. Τα υλικά καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων της PCR που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

Τελική συνταγή PCR αντιδράσεων

Αντιδραστήριο	Αρχική Συγκέντρωση	Όγκοι αντιδραστηρίων (μl) αντίδρασης 25 μl	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10X	2.5	1X
MgCl ₂	25 mM	3	3 mM
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Εκκινητής F	10 μM	1	0.4 μM
Εκκινητής R	10 μM	1	0.4 μM
Ποσότητα DNA		1-3*	
taq DNA pol	5 units/μl	0.2	0,04 units/reaction
H ₂ O		Στον όγκο	

*Η ποσότητα DNA που προστίθεντο σε κάθε αντίδραση εξαρτιόταν από την ποσότητα DNA κάθε δείγματος. Στα δείγματα που μελετήθηκαν, η ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1-3μl.

Συνθήκες PCR αντίδρασης

Βήμα αντίδρασης PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
Αρχική αποδιάταξη	94	5
Αποδιάταξη	94	1
Υβριδοποίηση	50	1
Επιμήκυνση	72	1
Τελική επιμήκυνση	72	10

*Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Folmer et al., 1994)

LC01490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Στη διαδικασία της PCR, επιλέξαμε να πολλαπλασιάσουμε τμήμα μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) από τα άτομα σκνιπών, και όχι πυρηνικού DNA. Η επιλογή αυτή έγινε με κριτήριο το μικρό μέγεθός του και κατ' επέκταση την ευκολία στους μοριακούς χειρισμούς του, καθώς και το μεγαλύτερο ρυθμό με τον οποίο μεταλλάσσονται ακολουθίες γονιδίων του, γεγονός το οποίο αποτυπώνει τη συνεχή εξελικτική διαδικασία που υφίσταται ένας οργανισμός μέσα στο χρόνο (Vawter & Brown 1986). Συνεπώς, στηριζόμενοι στους ταχύτατους ρυθμούς με τους οποίους μεταλλάσσεται το mtDNA, είναι δυνατόν να εντοπίσουμε σε μοριακό επίπεδο διαφορές στην εξελικτική διαδικασία ακόμα και ατόμων ίδιου είδους (Brown *et al.* 1979).

Στη συνέχεια επιλέξαμε να πολλαπλασιάσουμε ένα τμήμα ενός διεθνώς αναγνωρισμένου μιτοχονδριακού γονιδίου, αυτό της υπομονάδας 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COI). Η επιλογή του συγκεκριμένου έγινε, καθώς θεωρείται από τα πιο "ισχυρά" μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιεί πρωτεΐνες, δηλαδή κατά την εξελικτική διαδικασία των οργανισμών δεν έχει υποστεί κάποια αλλοίωση ούτε έχει απολεστεί, αλλά συντηρείται και παραμένει στους οργανισμούς (Folmer *et al.* 1994). Επιπλέον, το (COI) παρουσιάζει υψηλούς ρυθμούς μεταβολών στην αλληλουχία του, χωρίς, όπως προαναφέρθηκε, να αλλοιώνεται ως γονίδιο, και επιδέχεται εύκολα μεταλλάξεις και μάλιστα σε σύντομα χρονικά διαστήματα (Hebert *et al.* 2003). Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει πως υπάρχει δυνατότητα μέσω του (COI), όχι μόνο η διαφοροποίηση μεταξύ φύλων και ειδών, αλλά και μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους (Moritz *et al.* 1987; Hebert *et al.* 2003).

Το επόμενο βήμα μετά την επιλογή του γονιδίου (COI), ήταν η επιλογή των συγκεκριμένων εκκινητών LCO1490 και HCO2198. Κριτήριο επιλογής αυτών ήταν η γνώση της αλληλουχίας τους, καθώς και το πλήθος μελετών που έγιναν και έδειξαν πως το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών πολλαπλασιάζει σταθερά ένα τμήμα του γονιδίου (COI), μήκους 710 ζευγών βάσεων σε ένα μεγάλο εύρος των ασπόνδυλων οργανισμών (Hebert *et al.* 2003). Συνεπώς, η λειτουργικότητα και η σταθερότητα με την οποία το ζεύγος αυτό ανταποκρίνεται στον πολλαπλασιασμό τμήματος του COI, και στα άτομα των σκνιπών, οδήγησε στη χρήση του κατά τη διαδικασία της PCR.

Η τελική συνταγή καθώς και οι τελικές συνθήκες της PCR αντίδρασης που περιγράφονται παραπάνω ήταν αποτέλεσμα δοκιμών και εναλλαγών τόσο στις ποσότητες (συγκεντρώσεις) των αντιδραστηρίων, όσο και στις θερμοκρασίες και στους χρόνους στα διάφορα βήματα των αντιδράσεων της PCR. Κριτήριο για την τελική επιλογή και ποσοτική σταθεροποίηση όλων των παραπάνω παραγόντων ήταν το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα που προέκυπτε μετά από κάθε διαδικασία της PCR, το οποίο αποτυπωνόταν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης.

Πιο συγκεκριμένα, στη συνταγή των αντιδράσεων της PCR, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του MgCl₂. Κατά σειρά δοκιμάστηκαν τελικές συγκεντρώσεις C₁=1mM, C₂=1,5mM, C₃=2mM, C₄=2,5mM και C₅=3mM με τελικούς όγκους αντιδραστηρίων V₁=1μl, V₂=1,5μl, V₃=2μl, V₄=2,5μl και V₅=3μl αντίστοιχα. Επιπλέον, ποσοτικές δοκιμές

έγιναν και στους δύο εκκινητές (F και R) που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις $C_6=0,1\text{mM}$, $C_7=0,2\text{mM}$, $C_8=0,3\text{mM}$ και $C_9=0,4\text{mM}$, με τελικούς όγκους αντιδραστηρίων $V_6=0,25\mu\text{l}$, $V_7=0,5\mu\text{l}$, $V_8=0,75\mu\text{l}$ και $V_9=1\mu\text{l}$ αντίστοιχα. Τέλος, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις και στην taq DNA pol., $C_{10}=0,025$ units/reaction, $C_{11}=0,03$ units/reaction, $C_{12}=0,035$ units/reaction και $C_{13}=0,04$ units/reaction με τελικούς όγκους $V_{10}=0,125\mu\text{l}$, $V_{11}=0,15\mu\text{l}$, $V_{12}=0,175\mu\text{l}$ και $V_{13}=0,2\mu\text{l}$ αντίστοιχα. Από τις παραπάνω ποσοτικές δοκιμές των αντιδραστηρίων και στηριζόμενοι στην εικόνα που προέκυπτε κατά την ηλεκτροφόρηση του τελικού προϊόντος της PCR, καταλήξαμε πως το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις τους και πιο ειδικά: MgCl_2 ($C_5=3\text{mM}$ και $V_5=3\mu\text{l}$), εκκινητές F και R ($C_9=0,4\text{mM}$ και $V_9=1\mu\text{l}$) και taq DNA pol. ($C_{13}=0,04$ units/reaction και $V_{13}=0,2\mu\text{l}$).

Επιπρόσθετα, και στις συνθήκες της PCR αντίδρασης έγιναν δοκιμές στα διάφορα βήματά της τόσο στη θερμοκρασία όσο και στο χρόνο διάρκειάς τους. Πιο συγκεκριμένα, στην αρχική αποδιάταξη δοκιμάστηκαν θερμοκρασίες εύρους 94°C - 95°C , διάρκειας 5 λεπτών. Στη συνέχεια, στην αποδιάταξη η θερμοκρασία έμεινε σταθερή στους 94°C , με τη χρονική διάρκειά της να δοκιμάζεται μεταξύ 30 δευτερολέπτων-1 λεπτού. Στο στάδιο της υβριδοποίησης έγιναν δοκιμές σε θερμοκρασία 40 - 55°C . Τέλος, στην επιμήκυνση και την τελική επιμήκυνση έγιναν δοκιμές στη θερμοκρασία (70°C , 71°C και 72°C), και στο χρόνο διάρκειάς τους, ενώ η επιμήκυνση παρέμεινε σταθερή στο 1 λεπτό, η δε τελική επιμήκυνση κυμάνθηκε σε χρόνους μεταξύ 5 λεπτών-10 λεπτών. Και στις συνθήκες της PCR αντίδρασης, η τελική επιλογή τους έγινε με κριτήριο το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα που προέκυπτε κατά την ηλεκτροφόρηση του τελικού προϊόντος της διαδικασίας και πιο ειδικά: αρχική αποδιάταξη (94°C για 5 λεπτά), αποδιάταξη (94°C για 1 λεπτό), υβριδοποίηση (50°C /κύκλος για 1 λεπτό), επιμήκυνση (72°C για 1 λεπτό) και τελική επιμήκυνση (72°C για 10 λεπτά). Τέλος, η επιλογή των 35 κύκλων της διαδικασίας της PCR έγιναν εφόσον επιτυγχανόταν το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα σε αυτούς, παρά το ό,τι δοκιμάστηκαν 45 κύκλοι βάσει προϋπάρχοντος πρωτοκόλλου.

Το τελικό προϊόν της αντίδρασης της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε 1,5% gel agarose (πηκτική αгарόζης).

3.3) ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ ΕΚ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (PCR-RFLP, POLYMERASE CHAIN REACTION-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

Τη διαδικασία της PCR, ακολουθεί αυτή του πολυμορφισμού μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (PCR-RFLP, Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism). Στα πλαίσια αυτής της μοριακής μεθόδου, λαμβάνουμε το προϊόν της PCR του προηγούμενο βήματος και με τη χρήση συγκεκριμένου ενζύμου περιορισμού (MboI, Minotech, EU), στοχεύουμε την τμήση του γονιδίου COI που πολλαπλασιάσαμε προηγουμένως, σε συγκεκριμένα σημεία, ώστε να προκύψουν συγκρίσιμα τμήματα αλληλουχιών γενετικού υλικού από τα υπό μελέτη άτομα σκνιπών. Τα υλικά καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων της PCR-RFLP που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

Συνταγή RFLP αντίδρασης (Minotech, EU)

Αντιδραστήριο	Αρχική Συγκέντρωση	Όγκοι αντιδραστηρίων (μl) αντίδρασης 20 μl	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα	10X	2	1X
BSA		0.2	
PCR προϊόν		13	
Ένζυμο περιορισμού		0,5	
H ₂ O		4.3	

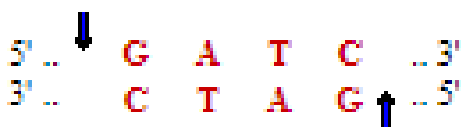
Συνθήκες RFLP αντίδρασης

Επώαση των αντιδράσεων στους 37°C χρησιμοποιώντας τη μηχανή PCR για 2 ώρες και 30 λεπτά.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων της RFLP αντίδρασης επιλέχθηκαν βάσει των προτεινόμενων τιμών από τον κατασκευαστή (Minotech, EU).

Στην παραπάνω συνταγή της RFLP αντίδρασης, το περιοριστικό ένζυμο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το MboI (Minotech, EU), το οποίο αποτελείται από 4 ζεύγη βάσεων (Roberts *et al.* 2015). Αυτά, κατά τη διάρκεια της RFLP, χρησιμοποιούνται ως μίτρα για να τμήσουν το προϊόν της PCR στις συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων και να προκύψουν τμήματα γονιδιώματος συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η επιλογή του

συγκεκριμένου περιοριστικού ενζύμου έγινε με κριτήριο την καταλληλότητά του στην ταξινόμηση ατόμων ίδιου είδους αλλά διαφορετικών πληθυσμών, γεγονός το οποίο προκύπτει κατά τη σύγκριση των τμημάτων που προκύπτουν από την RFLP και τα οποία διαφέρουν στο μέγεθός τους (σε ζεύγη βάσεων) (da Silva *et al.* 2010). Η διαφοροποίηση αυτή προκύπτει είτε λόγω ατόμων διαφορετικών ειδών, είτε ατόμων ίδιου είδους αλλά διαφορετικών πληθυσμών, τα οποία ενδεχομένως υπέστησαν κάποιες μεταλλάξεις (Dokianakis *et al.* 2016). Συνεπώς, η γνώση της λειτουργικότητας του συγκεκριμένου περιοριστικού ενζύμου σε άτομα σκνιπών καθώς και η δυνατότητα σύγκρισης ατόμων μεταξύ τους, ακόμα και του ίδιου είδους, οδήγησαν στη χρήση του MboI.



Εικόνα 34: Η αλληλουχία του περιοριστικού ενζύμου MboI (Minotech, EU)

3.4) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (GEL AGAROSE)

Μετά την ολοκλήρωση των μοριακών τεχνικών της PCR και της PCR-RFLP, τα προϊόντα τους ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (gel agarose), περιεκτικότητας 1,5% και 3,5% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας φωτογραφήθηκαν υπό υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Οι συνταγές για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης περιγράφονται παρακάτω.

Συνταγή TAE (Tris-acetate-EDTA) 50X όγκου 1 L

1. Σε ογκομετρικό σωλήνα γίνεται προσθήκη:
 - 242 g Tris Base (MW=121.1)
 - 57.1 ml Glacial Acetic Acid
 - 100 ml 0.5 M EDTA
2. Συμπληρώνουμε νερό έως το τελικό όγκο (1 λίτρο)
3. Ανάδευση με μαγνητισμό έως ότου το μίγμα να γίνει διαυγές
4. Τοποθέτηση και αποθήκευση σε κατάλληλο δοχείο – μπουκάλι

*Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη παρασκευή gel αγαρόζης είναι 1X οπότε γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις με απιονισμένο – απεσταγμένο νερό.

Συνταγή για gel αγαρόζης x %

1. Ζύγιση x γραμμαρίων αγαρόζης ηλεκτροφόρησης
2. Τοποθέτηση της αγαρόζης σε κωνική φιάλη
3. Προσθήκη 100 ml TAE 1X
4. Θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου βράσει και αποκτήσει διαυγή εμφάνιση
5. Αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει με προσοχή να μη πήξει
6. Προσθήκη 10μl GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain
7. Ελαφρά ανάδευση μέχρι το διάλυμα να αποκτήσει ομοιογενές πορτοκαλί χρώμα
8. Εφαρμογή του διαλύματος στη βάση ηλεκτροφόρησης και αναμονή για πήξιμο

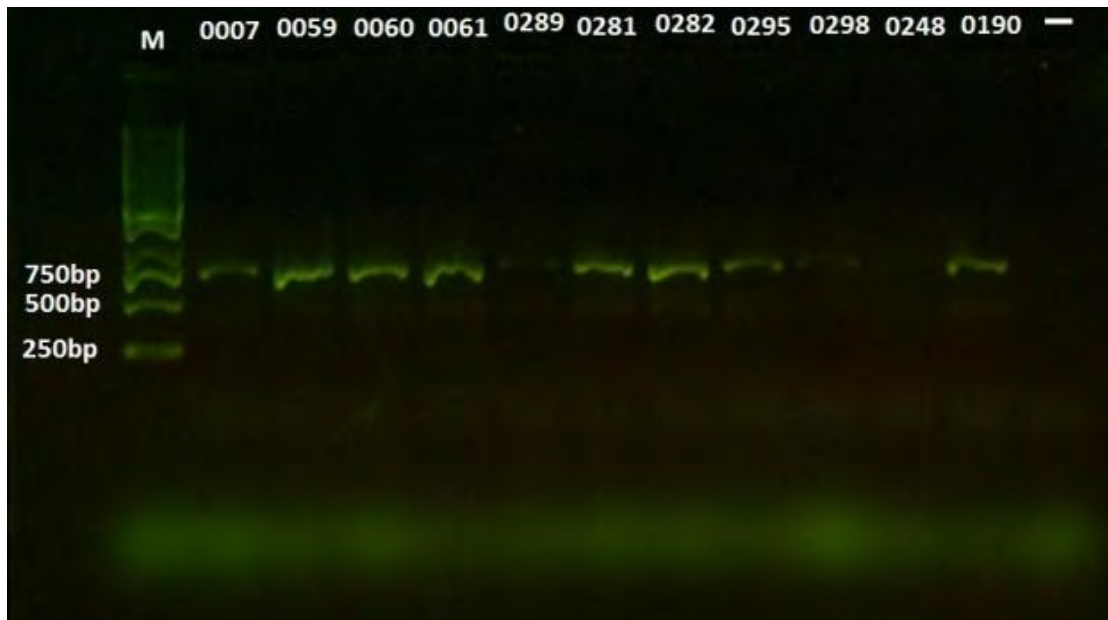
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τις δειγματοληψίες που έγιναν, περισυλλέχθηκαν 2918 άτομα σκνιπών από διάφορα νησιά του Αιγαίου εκ των οποίων τα 1459 ανήκαν στο υπογένος *Larroussius*. Από αυτό το υπογένος, προσδιορίστηκαν μορφολογικά 3 είδη (*P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*). Επιλέχθηκαν 78 από τα παραπάνω άτομα του υπογένους *Larroussius* και επιπλέον για σύγκριση, 2 άτομα *Sergentomyia dentata* στα οποία έγινε εξαγωγή γενετικού υλικού και ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Από τα 80 δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για PCR, τα 48 εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα βάσει ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης ενώ τα 32 εμφάνισαν αρνητικά, γεγονός το οποίο ενδεχομένως να οφείλεται στον τρόπο συντήρησης των δειγμάτων (70% αιθανόλη αντί 100% αιθανόλη), του χρόνου που παρεμβλήθηκε μεταξύ συλλογής των σκνιπών και εξαγωγής γενετικού υλικού καθώς και τη μικρή ποσότητα γενετικού υλικού του κάθε ατόμου σκνίπας. Στη συνέχεια, από τα 48 θετικά δείγματα της PCR επιλέχθηκαν 40 για τη διαδικασία του πολυμορφισμού μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (PCR-RFLP) βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών και λόγω πυκνότητας γενετικού υλικού στην πηκτή αγαρόζης (άτονες μπάντες). Όλα τα θετικά δείγματα της διαδικασίας της PCR, είτε υποβλήθηκαν στη διαδικασία της RFLP είτε όχι, θα αποσταλούν για αλληλούχιση γενετικού υλικού (DNA sequencing) προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση του είδους των σκνιπών και επαλήθευση των αποτελεσμάτων του μοριακού προσδιορισμού τους που έγινε αρχικά.

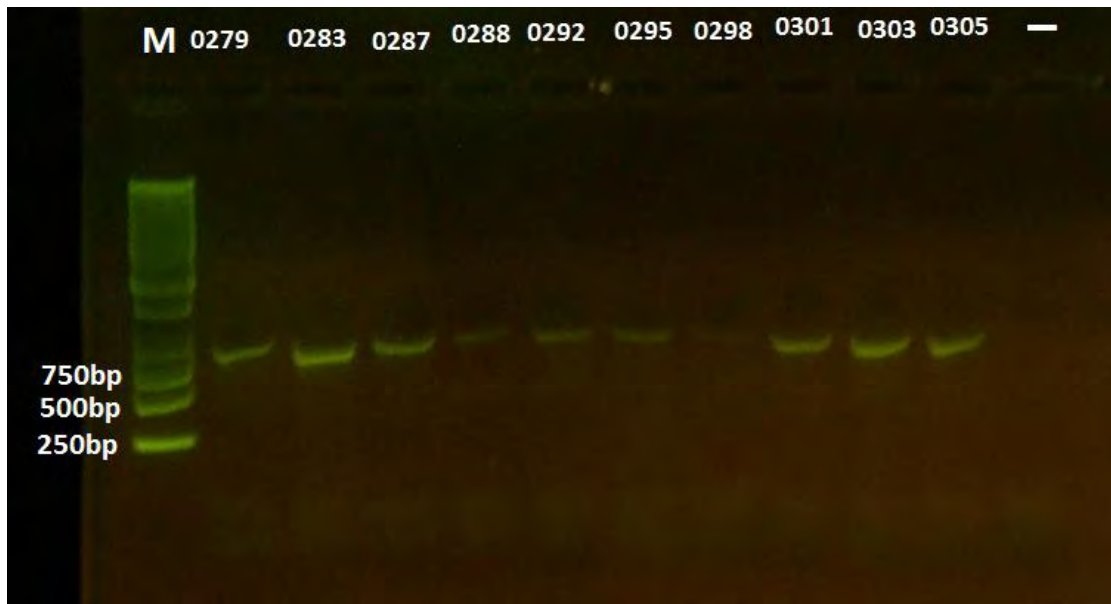
Πίνακας 2: Πληροφορίες θετικών δειγμάτων PCR

ΝΗΣΙΑ	ΑΤΟΜΑ		ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
	ΑΡΣΕΝΙΚΑ	ΘΗΛΥΚΑ	
Ανάφη	1	2	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Άνδρος	2	0	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Ικαρία	6	0	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Κάρπαθος	1	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Κρήτη-Ηράκλειο	3		Άγνωστο
Κρήτη-Φόδελε	0	3	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Κύπρος	1	1	<i>Phlebotomus tobbi</i>
Λέρος	4	0	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Μήλος	0	2	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Μήλος	1	2	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>
Νίσυρος	4	3	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Νίσυρος	0	1	<i>Phlebotomus tobbi</i>
Νίσυρος	2	0	<i>Sergentomyia dentata</i>
Πάτμος	3	0	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Σίφνος	0	5	<i>Phlebotomus neglectus</i>

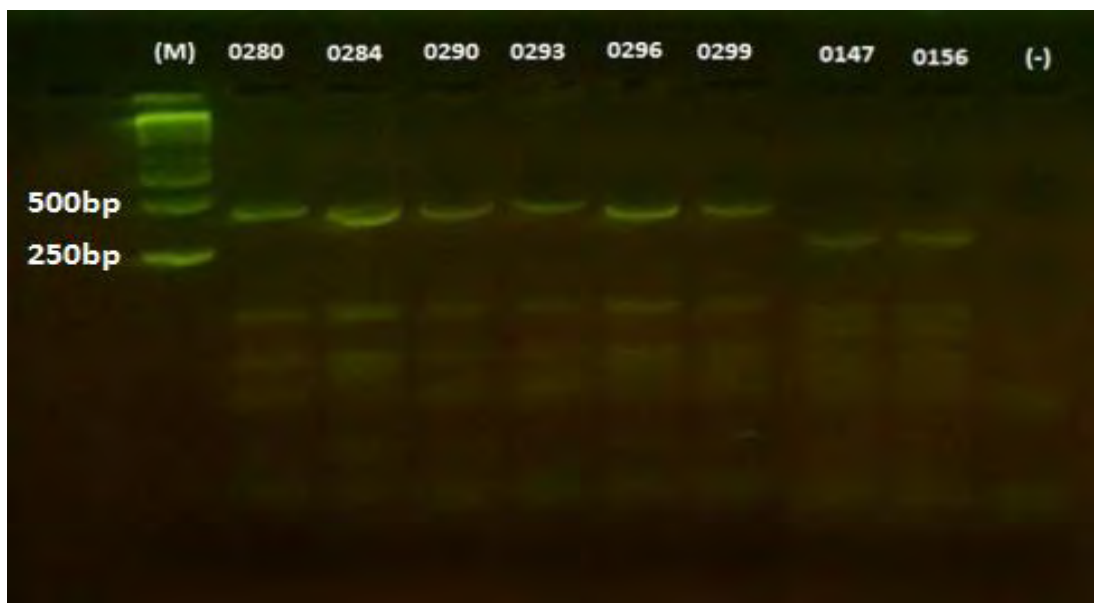
Από τα 48 θετικά δείγματα της PCR, τα 40 ανήκουν σε άτομα σκνιπών από τα υπό μελέτη νησιά του Αιγαίου (Νίσυρος, Άνδρος, Κάρπαθος, Ανάφη, Σίφνος, Πάτμος, Λέρος, Ικαρία, Μήλος) και τα 8 σε άτομα από Κρήτη (Φόδελε, Ηράκλειο) και Κύπρο, με σκοπό να υπάρχει μέτρο αναφοράς και σύγκρισης των αποτελεσμάτων. Από τα υπό μελέτη νησιά του Αιγαίου, αποκλείστηκε η Φολέγανδρος και η Σαντορίνη καθώς ο αριθμός ατόμων σκνιπών ήταν πολύ μικρός (1 άτομο από κάθε νησί) και ενδεχομένως το γενετικό υλικό αυτών των ατόμων να αποσταλεί κατευθείαν για DNA-sequencing, με σκοπό την προστασία και εξοικονόμησή του. Τέλος, ως μέτρο αναφοράς και σύγκρισης των αποτελεσμάτων, πέραν αυτών που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης ατόμων σκνιπών που έγινε σε δείγματα από Κρήτη και Κύπρο (Dokianakis *et al.* 2016). Στον Πίνακα 2 φαίνονται συγκεντρωτικά οι πληροφορίες των θετικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 35: Φωτογραφία δειγμάτων PCR από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. M: Marker, 0007, 0190, 0248: Female *P. neglectus* (Crete, Fodele), 0059, 0060, 0061: Unknown (Crete, Heraklion), 0289: Female *P. tobbi* (Nisyros), 0281, 0282: Female, *P. perfiliewi* (Milos), 0295, 0298: Male, *P. neglectus* (Icaria)

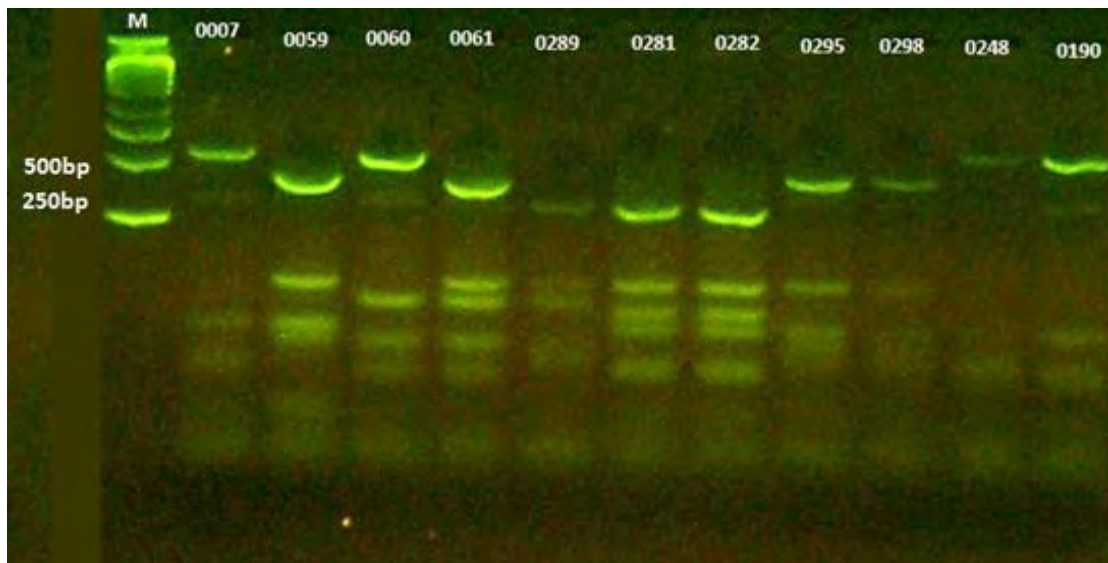


Εικόνα 36: Φωτογραφία δειγμάτων PCR από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη. M: Marker, 0279: Male, *P. neglectus* (Leros), 0283: Female, *P. neglectus* (Milos), 0287: Male, *P. neglectus* (Patmos), 0288: Female, *P. neglectus* (Nisyros), 0292: Male, *P. neglectus* (Nisyros), 0295, 0298: Male, *P. neglectus* (Ikaria), 0301: Male, *P. neglectus* (Andros), 0303, 0305: Female, *P. neglectus* (Sifnos)

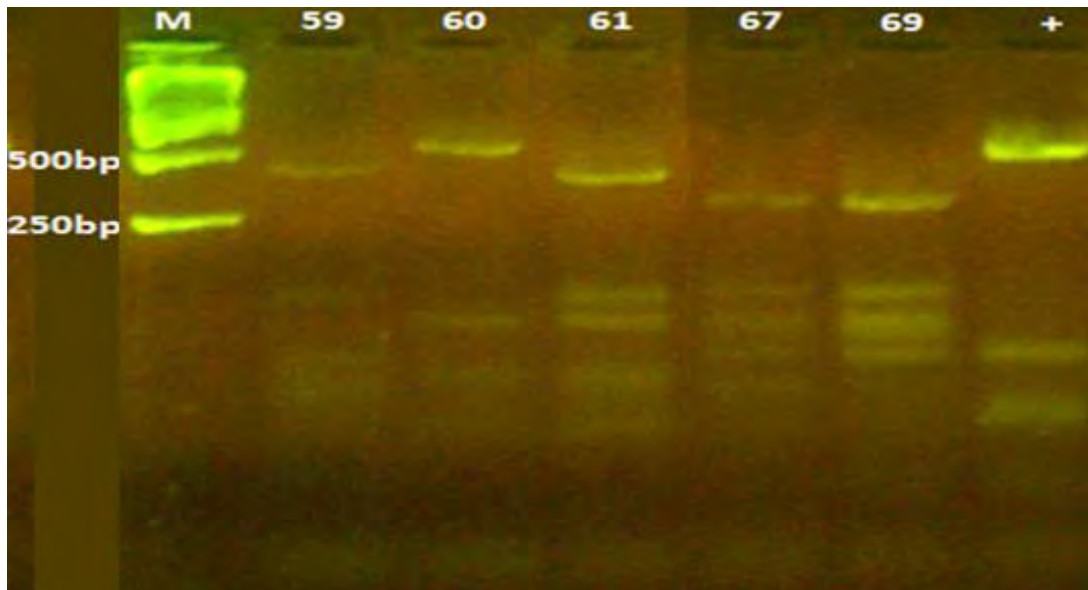


Εικόνα 37: Φωτογραφία δειγμάτων PCR-RFLP από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη. M: Marker, 0280: Male, *P. neglectus* (Leros), 0284: Female, *P. neglectus* (Milos), 0290: Female, *P. neglectus* (Nisyros), 0293: Male, *P. neglectus* (Nisyros), 0296, 0299: Male, *P. neglectus*, 0147: Male, *P. tobbi* (Cyprus), 0156: Female, *P. tobbi* (Cyprus)

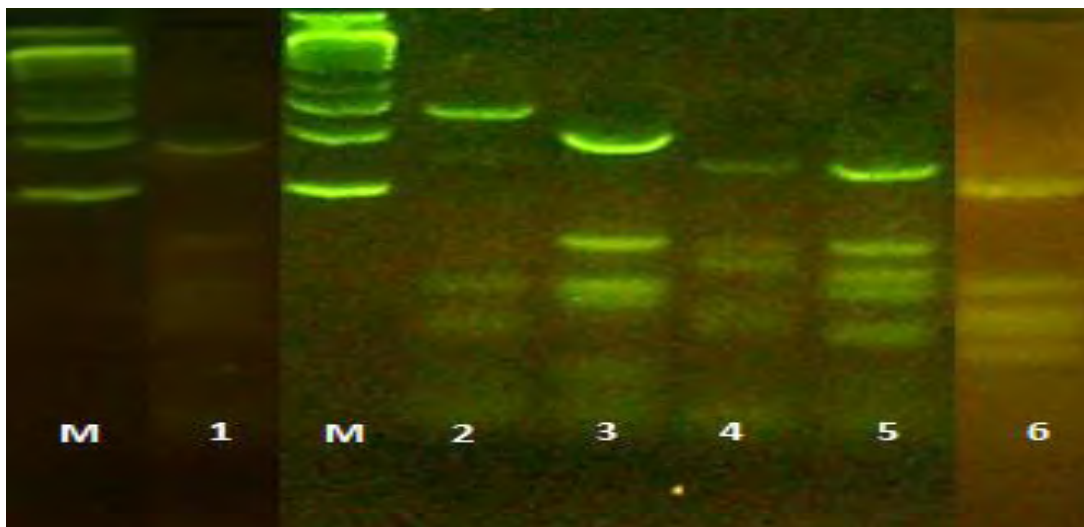
Στις φωτογραφίες 35 και 36 απεικονίζεται το αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης δειγμάτων που υποβλήθηκαν στη διαδικασία της PCR. Τα δείγματα αυτά είναι αντιπροσωπευτικά από άτομα σκνιπών από τα υπό μελέτη νησιά του Αιγαίου και την Κρήτη. Βάσει του M (Marker) που χρησιμοποιήθηκε, το μέγεθος του γονιδίου COI των δειγμάτων αυτών είναι περίπου 600-650 (Clark *et al.* 2016). Τέλος, η διάφορα στην ένταση του χρώματος των μπαντών των δειγμάτων οφείλεται στην ποσότητα του γενετικού υλικού από κάθε άτομο (πιο άτονη μπάντα παραπέμπει σε μικρότερη ποσότητα γενετικού υλικού). Τα δείγματα της PCR τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν και έδωσαν θετικό αποτέλεσμα, στη συνέχεια υποβλήθηκαν στη διαδικασία της PCR-RFLP.



Εικόνα 38: Φωτογραφία δειγμάτων PCR-RFLP από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. M: Marker, 0007, 0190, 0248: Female, *P. neglectus* (Crete, Fodele), 0059, 0060, 0061: Unknown (Crete, Heraklion), 0289: Female, *P. tobbi* (Nisyros), 0281, 0282: Female, *P. perfiliewi* (Milos), 0295, 0298: Male, *P. neglectus* (Ikaria)



Εικόνα 39: Φωτογραφία δειγμάτων PCR-RFLP από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. M: Marker, 59, 60, 61: Unknown (Crete-Heraklion), 67, 69: Male, *Sergentomyia dentata* (Nisyros), +: *P. neglectus* (Crete)



Εικόνα 40: Φωτογραφία δειγμάτων PCR-RFLP με διαφορετικά πρότυπα μαντών, από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. M: Marker, 1-6: Διαφορετικά πρότυπα μαντών. 1: *P. neglectus* (Ikaria), 2: *P. neglectus* (Crete, Fodele), 3: Unknown (Crete, Heraklion), 4: *P. tobbi* (Nisyros), 5: *P. perfiliewi* (Milos), 6: *Sergentomyia dentata* (Nisyros)

Στις φωτογραφίες 37,38 και 39 απεικονίζεται το αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης δειγμάτων που υποβλήθηκαν στη διαδικασία της PCR-RFLP. Τα δείγματα αυτά είναι αντιπροσωπευτικά από άτομα σκνιπών από τα υπό μελέτη νησιά του Αιγαίου, την Κρήτη και την Κύπρο και τα οποία ανήκουν στα είδη *P. neglectus*, *P. tobbi* και *P. perfiliewi*. Όπως φαίνεται και από τις εικόνες, τα άτομα που ανήκουν στο είδος *P.*

neglectus και προέρχονται από τα υπό μελέτη νησιά (π.χ. 0295, 0298, Ικαρία, Εικόνα 38) διαφέρουν από άτομα που ανήκουν στο ίδιο είδος αλλά προέρχονται από την Κρήτη (π.χ. 0007, 0190 και 0248, Κρήτη-Φόδελε, Εικόνα 38) καθώς εμφανίζονται στην ηλεκτροφόρηση με διαφορετικό πρότυπο στις μπάντες (διαφορετικό τρόπο εμφάνισης των μπαντών). Επιπλέον, διαφορές στο πρότυπο παρατηρούνται και μεταξύ πληθυσμών του είδους *P. perfiliewi* που προέρχονται από νησιά του Αιγαίου (π.χ. 0281 και 0282, Μήλος, Εικόνα 38) και από την Κύπρο (Dokianakis *et al.* 2016). Αντιθέτως, ομοιότητα στο πρότυπο παρατηρείται μεταξύ πληθυσμών του είδους *P. tobbi*, παρά το γεγονός ότι προέρχονται από διαφορετικές περιοχές (π.χ. 0147 και 0156, Κύπρος, Εικόνα 37, 0289, Νίσυρος, Εικόνα 38). Αξίζει να σημειωθεί ότι 3 από τα δείγματα δεν είχαν προσδιοριστεί μορφολογικά (0059, 0060, 0061, Κρήτη-Ηράκλειο, Εικόνα 38). Βάσει των παραπάνω φωτογραφιών, ομοιότητα εμφανίζει το πρότυπο του 0060 (Εικόνα 38) με το αντίστοιχο του 0007, 0190 και 0248 (Εικόνα 38) και επιπλέον, το πρότυπο του 0061 (Εικόνα 38) με το αντίστοιχο του 0289 (Εικόνα 38) καθώς και αντίστοιχων προηγούμενης μελέτης (Dokianakis *et al.* 2016). Το πρότυπο του δείγματος 0059 δεν είναι όμοιο με το αντίστοιχο κάποιου από τα υπόλοιπα δείγματα. Τέλος, τα πρότυπα μπαντών των δειγμάτων 67 και 69, τα οποία ανήκουν στο είδος *Sergentomyia dentata* είναι όμοια μεταξύ τους αλλά όχι με οποιοδήποτε από τα υπόλοιπα δείγματα.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μοριακού προσδιορισμού των δειγμάτων με PCR-RFLP

ΝΗΣΙΑ	ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΠΑΝΤΩΝ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
Ανάφη	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Ανδρος	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Ικαρία	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Κάρπαθος	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Κρήτη-Ηράκλειο	2	<i>Phlebotomus neglectus</i> (διαφορετικός πληθυσμός)
Κρήτη-Ηράκλειο	3	<i>Unknown</i>
Κρήτη-Ηράκλειο	4	<i>Phlebotomus tobbi</i>
Κρήτη-Φόδελε	2	<i>Phlebotomus neglectus</i> (διαφορετικός πληθυσμός)
Κύπρος	4	<i>Phlebotomus tobbi</i>
Λέρος	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Μήλος	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Μήλος	5	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>
Νίσυρος	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Νίσυρος	4	<i>Phlebotomus tobbi</i>
Νίσυρος	6	<i>Sergentomyia dentata</i>
Πάτμος	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>
Σίφνος	1	<i>Phlebotomus neglectus</i>

Βάσει των αποτελεσμάτων του μοριακού προσδιορισμού με PCR-RFLP των ατόμων σκνιπών από νησιά του Αιγαίου, την Κρήτη και την Κύπρο και βάσει των προτύπων μπαντών της ηλεκτροφόρησης (Πίνακας 3), προκύπτουν τα εξής: Α) Τα άτομα σκνιπών του είδους *P. neglectus*, τα οποία προέρχονται από νησιά του Αιγαίου έχουν διαφορετικό μοριακό προφίλ από τα αντίστοιχα άτομα του ίδιου είδους, τα οποία προέρχονται από την Κρήτη, συνεπώς αποτελούν δύο διαφορετικούς πληθυσμούς. Β) Τα άτομα σκνιπών του είδους *P. perfiliewi*, τα οποία προέρχονται από νησιά του Αιγαίου (Μήλος) έχουν διαφορετικό μοριακό προφίλ από τα αντίστοιχα άτομα του ίδιου είδους, τα οποία προέρχονται από την Κύπρο (Dokianakis *et al.* 2016). Γ) Τα άτομα σκνιπών του είδους *P. tobbi*, τα οποία προέρχονται από νησιά του Αιγαίου (Νίσυρος) έχουν το ίδιο μοριακό προφίλ με τα αντίστοιχα άτομα του ίδιου είδους, τα οποία προέρχονται από την Κρήτη αλλά και από την Κύπρο (Dokianakis *et al.* 2016). Δ) Τα άτομα σκνιπών του είδους *Sergentomyia dentata*, τα οποία προέρχονται από νησιά του Αιγαίου (Νίσυρος) έχουν διαφορετικό μοριακό προφίλ από όλα τα υπόλοιπα άτομα των τριών διαφορετικών ειδών που προσδιορίστηκαν (*P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*). Ε) Δύο από τα απροσδιόριστα μορφολογικά άτομα σκνιπών που προέρχονται από την Κρήτη έχουν ίδιο μοριακό προφίλ με άτομα σκνιπών, επίσης προερχόμενα από Κρήτη και τα οποία τόσο από το μορφολογικό όσο και από το μοριακό προσδιορισμό, προέκυψε ότι ανήκαν στα είδη *P. neglectus* και *P. tobbi* αντίστοιχα (Dokianakis *et al.* 2016). Τέλος, ένα άτομο σκνίπας που προέρχεται από την Κρήτη και είχε προσδιοριστεί μορφολογικά, από το μοριακό προσδιορισμό και το πρότυπο μπαντών της ηλεκτροφόρησής του, δεν προέκυψε ότι παρουσιάζει ομοιότητα στο μοριακό του προφίλ με κάποιο ή κάποια από τα υπόλοιπα είδη που προσδιορίστηκαν. ΣΤ) Συνοψίζοντας, λαμβάνοντας υπόψη το μορφολογικό και το μοριακό προσδιορισμό των ατόμων σκνιπών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματά τους ήταν ταυτόσημα, καθώς έδειξαν τα ίδια είδη.

Δ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι σκνίπες (*Phlebotomus* spp.), αποτελούν τους αποκλειστικούς διαβιβαστές του πρωτόζωου παρασίτου *Leishmania* που ευθύνεται για τη νόσο της λείσμανίασης. Η νόσος απαντάται τόσο στον άνθρωπο όσο και σε άλλα θηλαστικά και μπορεί να αποβεί θανατηφόρος αν δε δοθεί άμεσα κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή (Lane & Crosskey 1993). Το παράσιτο μεταδίδεται μέσω νύγματος της θηλυκής σκνίπας, η οποία προηγουμένως είχε προσλάβει το παράσιτο, μέσω γεύματος αίματος, από μολυσμένο θηλαστικό (Killick-Kendrick 1999).

Βασική προϋπόθεση για την παρουσία του παρασίτου, και κατ' επέκταση εκδήλωσης της νόσου σε μια περιοχή, είναι η παρουσία πληθυσμών σκνιπών ικανών να διαβιβάσουν το παράσιτο σε αυτήν, καθώς και αντίστοιχη παρουσία του θηλαστικού-ξενιστή τους ώστε να μπορεί να ολοκληρωθεί ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου. Οι σκνίπες δραστηριοποιούνται, κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, όπου η νόσος θεωρείται ενδημική –όπως οι χώρες της λεκάνης της Μεσογείου-, εντούτοις, πρόσφατα έχουν καταγραφεί περιστατικά και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες όπως η βόρεια Ιταλία, η νότια Γερμανία και η νότια Ελβετία (Bogdan *et al.* 2001; Maroli *et al.* 2008).

Στην Ελλάδα έχουν βρεθεί και προσδιοριστεί δεκατρία είδη φλεβοτόμων, εκ των οποίων τα δέκα ανήκουν στο γένος *Phlebotomus* και τρία στο γένος *Sergentomyia*. Από αυτά, πέντε έχουν αποδειχθεί ως πιθανοί διαβιβαστές της *Leishmania* και είναι οι: *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. similis* και *P. papatasi* (Christodoulou *et al.* 2012; Ntais *et al.* 2013). Πιο συγκεκριμένα, η Κρήτη λόγω της γεωγραφικής της θέσης και συνεπώς των θερμοκρασιών που καταγράφονται σε αυτή, αποτελεί περιοχή η οποία βρίθεται σε πληθυσμούς σκνιπών διαφόρων ειδών και κυρίως του υπογένη *Larroussius* (*P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. perniciosus*). Επιπρόσθετα, πληθυσμοί διαφόρων ειδών σκνιπών ανευρίσκονται σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, με την ανάγκη χαρτογράφησης τους να είναι επιτακτική αναφορικά με την πιθανή απειλή της λείσμανίασης σε σχέση με τη Δημόσια Υγεία (Ntais *et al.* 2013).

Σε έρευνα που έγινε το 2016 (Ιούνιος -Σεπτέμβριος) από τους Tsirigotakis *et al.* (Tsirigotakis *et al.* 2017) (in press) έγινε προσπάθεια χαρτογράφησης των ειδών των σκνιπών που απαντώνται σε νησιά του Αιγαίου, με τη συλλογή ατόμων από αυτά και το μορφολογικό προσδιορισμό τους βάσει κλειδών (Lewis 1982; Lane & Crosskey 1993). Από τα νησιά αυτά (Ανάφη, Μήλος, Σίφνος, Άνδρος, Κάρπαθος, Νίσυρος, Λέρος, Ικαρία, Σαντορίνη, Πάτμος, Φολέγανδρος) συλλέχθηκαν συνολικά 2918 άτομα σκνιπών, εκ των οποίων τα 1459 ανήκαν στο υπογένος *Larroussius* και συγκεκριμένα στα είδη *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, βάσει μορφολογικού προσδιορισμού.

Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας, χρησιμοποιήθηκαν άτομα από τα είδη *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, από τα παραπάνω νησιά με σκοπό, μέσω του μοριακού προσδιορισμού τους, να γίνει επαλήθευση του μορφολογικού προσδιορισμού που προηγήθηκε καθώς και συγκριτική μελέτη ατόμων του ίδιου είδους, τόσο από τα διάφορα νησιά όσο και μεταξύ ατόμων που προέρχονται από την Κρήτη και την Κύπρο, τα οποία είχαν συλλεχθεί τον προηγούμενο χρόνο. Τα άτομα που επιλέχθηκαν ήταν και αρσενικά και θηλυκά και επιπλέον η επιλογή έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να καλυφθούν όλα τα εύρη

των μορφολογικών χαρακτηριστικών που παρατηρήθηκαν κατά το μορφολογικό προσδιορισμό, ανάλογα το φύλο και το είδος. Κάθε είδος φλεβοτόμου έχει συγκεκριμένο εύρος στο μήκος φτερών (θηλυκά) και συγκεκριμένο στο μήκος κοξίτη και στύλου (αρσενικά). Οι κλείδες που χρησιμοποιήθηκαν στο μορφολογικό προσδιορισμό (Lane & Crosskey 1993) σχετίζονταν και με τα παραπάνω εύρη για το διαχωρισμό και κατηγοριοποίηση των ειδών, το οποίο επαληθεύτηκε στη συνέχεια με το μοριακό προσδιορισμό των ατόμων.

Πράγματι, άτομα από νησιά του Αιγαίου τα οποία είχαν αρχικά προσδιοριστεί ως *P. neglectus*, στη συνέχεια, στο μοριακό προσδιορισμό εμφάνισαν όλα το ίδιο πρότυπο μπαντών μεταξύ τους, γεγονός το οποίο επαληθεύει τον αρχικό μορφολογικό προσδιορισμό τους. Εντούτοις, άτομα του ίδιου είδους που προέρχονταν, από την Κρήτη, στο μοριακό προσδιορισμό τους εμφάνισαν το ίδιο πρότυπο μπαντών μεταξύ τους (βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης καθώς και προηγούμενης (Dokianakis *et al.* 2016)) αλλά διαφορετικό από το αντίστοιχο των ατόμων του ίδιου είδους, των νησιών. Η διαπίστωση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανόν να έχουμε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς του ίδιου είδους, με διαφορετικό μοριακό προφίλ, δηλαδή, εντός του ίδιου είδους πιθανόν να υπάρχουν περισσότεροι απλότυποι. Βέβαια, εναλλακτική ερμηνεία του παραπάνω συμπεράσματος είναι ότι το διαφορετικό μοριακό προφίλ ενδεχομένως να οφείλεται στο ό,τι τα άτομα των νησιών ανήκουν σε κάποιο άλλο είδος (π.χ. *P. syriacus*) και όχι στο είδος *P. neglectus*. Επιβεβαίωση ή απόρριψη των παραπάνω ερμηνειών θα δοθεί με την αλληλούχιση του γενετικού υλικού (DNA-sequencing) των ατόμων των νησιών το οποίο θα γίνει στη συνέχεια της έρευνας.

Η ίδια προσέγγιση ισχύει και για τα άτομα του είδους *P. perfiliewi*, προερχόμενα από νησιά του Αιγαίου και τα οποία προσδιορίστηκαν μορφολογικά και μοριακά. Ο μοριακός τους προσδιορισμός έδειξε ίδιο πρότυπο μπαντών σε άτομα από τα νησιά αυτά και διαφορετικό σε άτομα που προέρχονταν από την Κύπρο (Dokianakis *et al.* 2016). Οπότε και στην περίπτωση αυτή ενδέχεται η ύπαρξη δύο διαφορετικών πληθυσμών του ίδιου είδους με διαφορετικό απλότυπο ή ύπαρξη διαφορετικών ειδών, ισχυρισμοί οι οποίοι θα απαντηθούν με την αλληλούχιση του γενετικού υλικού των σκνιπών.

Την ίδια προσέγγιση δε μπορούμε να κάνουμε για τα άτομα που μορφολογικά προσδιορίστηκαν ότι ανήκουν στο είδος *P. tobbi*, καθώς ο μοριακός τους προσδιορισμός έδειξε το ίδιο πρότυπο μπαντών σε όλα τα άτομα, είτε προέρχονταν από τα νησιά του Αιγαίου, είτε από την Κρήτη (απροσδιόριστο μορφολογικά άτομα) και την Κύπρο (Dokianakis *et al.* 2016). Το αποτέλεσμα αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως αναφορικά με το είδος *P. tobbi*, ενδεχομένως ο πληθυσμός να είναι ένας, με το ίδιο μοριακό προφίλ και έναν απλότυπο. Συνεπώς, καμία αλλαγή σε μοριακό επίπεδο δεν παρατηρήθηκε στα άτομα *P. tobbi*, ανεξάρτητα της προέλευσής τους. Αυτό που αξίζει να τονιστεί είναι πως στην περίπτωση που το απροσδιόριστο μορφολογικά άτομο που προέρχεται από την Κρήτη, προσδιοριστεί τελικά ως *P. tobbi* μέσω του DNA-sequencing, προκύπτουν νέα δεδομένα για το νησί αναφορικά με τη λεισμανίαση. Συγκεκριμένα, προηγούμενες μελέτες αναφέρουν την απουσία του είδους *P. tobbi* από την Κρήτη (Ινονίς *et al.* 2007; Christodoulou *et al.* 2012). Αν τελικά επιβεβαιωθεί το παραπάνω αποτέλεσμα, τότε αναδύεται ο κίνδυνος για πιθανή είσοδο του παρασίτου της *Leishmania donovani* στο νησί (το οποίο προκαλεί τη σπλαχνική λεισμανίαση στον άνθρωπο) μέσω του φλεβοτόμου-διαβιβαστή του, του *P. tobbi* (Rioux *et al.* 1998).

Μία πιθανή ερμηνεία για τη διαφορά που παρατηρείται στους πληθυσμούς του *P. neglectus* και *P. perfiliewi* που βρέθηκαν στα νησιά του Αιγαίου και την Κρήτη στηρίζεται στην εξέλιξη της γεωλογίας της Ελλάδας και του Αιγαίου πελάγους. Πιο συγκεκριμένα, η Κρήτη ανήκει στη γεωτεκτονική ζώνη Ολωνού-Πίνδου ενώ τα νησιά του Αιγαίου στην Κυκλαδική ζώνη (Lister *et al.* 1984). Κατά το Μεσσήνιο (5,59-5,33 εκ. χρόνια πριν), η βορειοδυτική Αφρική συγκρούστηκε με την Ευρασιατική πλάκα λόγω της υποχώρησης της λιθόσφαιρας της Τιθύος δυτικά και ανύψωσης κατά 1 χιλιόμετρο περίπου του τμήματος της Αφρικής και της Ιβηρικής χερσονήσου (Hsü 1978; Krijgsman *et al.* 1999; Duggen *et al.* 2003). Έτσι, η Μεσόγειος απομονώθηκε από τον Ατλαντικό ωκεανό με τη στένωση του Γιβραλτάρ, εξατμίστηκε μεγάλο μέρος της και δημιουργήθηκαν μεγάλες χερσαίες εκτάσεις οι οποίες λειτούργησαν ως γέφυρες μετακίνησης πολλών ειδών χλωρίδας και πανίδας (Sonnenfeld 1985; McKenzie 1999). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκρουση της Αραβικής μικροπλάκας με την Ανατολία και μετακίνηση της τελευταίας δυτικά, με αποτέλεσμα την ανύψωση της Κρήτης και της Πελοποννήσου, την καταστροφή των χερσαίων γεφυρών με το κεντρικό Αιγαίο και τελικά το σχηματισμό των Κυκλάδων (Dermitzakis 1990; Westaway & Arger 1996).

Συνοψίζοντας, οι περιοχές της Κρήτης και των Κυκλάδων ξεκίνησαν ως δύο διακριτές περιοχές, στη συνέχεια λόγω ξήρανσης της Μεσογείου απέκτησαν γέφυρες επικοινωνίας, ανταλλαγής και αλληλεπίδρασης πληθυσμών και τελικά επαναδιαχωρίστηκαν με την παρεμβολή θάλασσας. Συνεπώς, μέσω της διαδικασίας αυτής, πληθυσμοί σκνιπών που προϋπήρχαν στις περιοχές αυτές πιθανόν να μετακινήθηκαν από τη μία στην άλλη, να αλληλεπέδρασαν και τελικά να απομονώθηκαν εκ νέου με την παρεμβολή της θάλασσας. Έτσι, οι πληθυσμοί που προϋπήρχαν στη ζώνη της Κρήτης (στην οποία περιλαμβάνεται και η Πελοπόννησος (Fassoulas 2001)) πιθανόν να διαφέρουν από τους πληθυσμούς της ζώνης των νησιών του Αιγαίου (στην οποία περιλαμβάνεται και η Στερεά Ελλάδα και η Τουρκία (Fassoulas 2001)), λόγω της απομόνωσης που επήλθε. Αυτό το γεγονός πιθανόν να δικαιολογεί και τα διαφορετικά πρότυπα μπαντών που προέκυψαν κατά το μοριακό προσδιορισμό των σκνιπών από τις περιοχές αυτές.

Από την άλλη πλευρά, πιθανή ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων ενδέχεται να είναι και μια προσπάθεια προσαρμογής των φλεβοτόμων στις ιδιαίτερες συνθήκες κάθε νησιού. Συγκεκριμένα, διαφορές στη θερμοκρασία, την υγρασία, τη μορφολογία του εδάφους, το υψόμετρο, την ένταση των ανέμων, του μικροκλίματος κάθε νησιού, την ύπαρξη ή μη των βιολογικών ενδιαιτημάτων όπου δραστηριοποιούνται οι σκνίπες, την παρουσία ή μη και σε τι ποσοστό των θηλαστικών-ξενιστών από τους οποίους τρέφοντα τα θηλυκά άτομα (Christodoulou *et al.* 2012; Ntais *et al.* 2013), μεταξύ των νησιών του Αιγαίου και της Κρήτης, είναι μερικοί από τους παράγοντες που διαφέρουν στις περιοχές μελέτης. Παρουσία ή μη και σε τι βαθμό κάποιων από τους προαναφερθέντες παράγοντες ενδέχεται να επηρεάζει τη βιολογία των σκνιπών, οι οποίες στην προσπάθειά τους για επιβίωση, προσαρμόζονται μορφολογικά και γενετικά στις εκάστοτε συνθήκες.

Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει και την παρουσία ατόμων του είδους *P. perfiliewi* στη δυτική Μήλο, ενώ από τις υπόλοιπες περιοχές του νησιού (ανατολική, κεντρική Μήλος) συλλέχθηκαν άτομα του είδους *P. neglectus*. Η διαφορά αυτή, ως προς τα είδη των ειδών που απαντώνται στο ίδιο νησί, πιθανόν να σχετίζεται με τη μορφολογία του, η οποία στη δυτική πλευρά είναι περισσότερο ορεινή.

Μία επιπρόσθετη εξήγηση της ύπαρξης διαφορετικών απλοτύπων μεταξύ ατόμων του *P. neglectus* που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές, είναι η ύπαρξη δύο διαφορετικών

ειδών. Δηλαδή τα άτομα του είδους *P. neglectus* από νησιά του Αιγαίου ενδεχομένως να είναι κάποιο άλλο είδος (π.χ. *P. syriacus*), το οποίο υπάρχει και πιθανόν να εισήχθη από γειτονική περιοχή (π.χ. Τουρκία (Simsek *et al.* 2007). Αυτό, βέβαια, σημαίνει ότι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ενδεχόμενου διαφορετικού είδους από τα νησιά προσομοιάζουν με αυτά των ατόμων *P. neglectus* της Κρήτης και άλλων περιοχών όπου αυτό έχει περιγραφεί (Lewis 1982; Lane & Crosskey 1993).

Εντούτοις, εντύπωση προκαλούν τα αποτελέσματα του μοριακού προσδιορισμού ατόμων του είδους *P. tobbi* από νησιά του Αιγαίου, την Κρήτη και την Κύπρο, καθώς εμφανίζονται με το ίδιο πρότυπο μπαντών. Μια πιθανή ερμηνεία του αποτελέσματος αυτού, ενδεχομένως να σχετίζεται με νεότερη απομόνωση των πληθυσμών αυτών στις τρεις αυτές περιοχές, με τη χρήση "μονοπατιών" (pathways), δηλαδή της Τουρκίας και της Κερκύρας για ανταλλαγή πληθυσμών μεταξύ τους. Αυτό, βέβαια προϋποθέτει την περαιτέρω διερεύνηση ατόμων του είδους *P. tobbi* και στην Κέρκυρα, ώστε να προκύψει πιθανός συσχετισμός.

Μια επιπρόσθετη εξήγηση του πανομοιότυπου μοριακού προφίλ των ατόμων του *P. tobbi* από νησιά του Αιγαίου, της Κρήτης και της Κύπρου, ενδεχομένως να σχετίζεται με αντοχή του είδους αυτού σε αλληλεπιδράσεις που πιθανόν να έγιναν κατά την περίοδο ξήρανσης της Μεσογείου. Αυτό, βέβαια, αντίκειται στην προηγούμενη περίπτωση των *P. neglectus* και *P. perfiliewi*, εντούτοις, οι βιολογικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης κάθε είδους δεν είναι πλήρως γνωστοί και ενδεχομένως να διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Στην προσπάθεια κατανόησης ύπαρξης ατόμων του ίδιου είδους αλλά με διαφορετικό μοριακό προφίλ μεταξύ νησιών του Αιγαίου, της Κρήτης και της Κύπρου, απάντηση ενδέχεται να δώσει ο μορφολογικός και μοριακός προσδιορισμός ατόμων από την Τουρκία, τη Ρόδο και την Πελοπόννησο. Αναφορικά με την Τουρκία, η κοντινή απόσταση αυτής με κάποια από τα υπό μελέτη νησιά του Αιγαίου (Λέρος, Νίσυρος), πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μετακίνηση και ανταλλαγή πληθυσμών σκνιπών μεταξύ τους. Κατ' επέκταση, η Λέρος και η Νίσυρος πιθανόν με τη σειρά τους να λειτουργούν ως "μονοπάτια" (pathways) μετακίνησης και εξάπλωσης αυτών των πληθυσμών στα υπόλοιπα νησιά των Κυκλάδων. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της Άνδρου, της Μήλου και της Σίφνου, πιθανή δεξαμενή νέων πληθυσμών να διαδραματίζουν η Στερεά Ελλάδα και η Πελοπόννησος, όμως, για τη διαλεύκανση μιας πιθανής μετακίνησης και ανταλλαγής πληθυσμών απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των προαναφερθέντων περιοχών.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, καθώς και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθίσταται εμφανές πως επιχειρείται μια προσπάθεια χαρτογράφησης των νησιών του Αιγαίου αναφορικά με τα είδη των σκνιπών σε αυτά, καθώς δεν υπήρχαν προηγούμενα δεδομένα. Ο αρχικός μορφολογικός προσδιορισμός τους, η επαλήθευσή του μέσω του μοριακού προσδιορισμού και η επιβεβαίωση, μέσω της αλληλούχισης του γενετικού τους υλικού που θα ακολουθήσει, αποδεικνύουν την ύπαρξη απειλής για τη Δημόσια Υγεία, μια και τα σημαντικότερα είδη που βρέθηκαν είναι αυτά τα οποία αποτελούν τους διαβιβαστές ξενιστές του παρασίτου *Leishmania*, στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου.

Η παρουσία ειδών σκνιπών του υπογένους *Larrousius* και συγκεκριμένα τα *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, σε νησιά του Αιγαίου, επιτρέπει τη διασπορά του παρασίτου *Leishmania* spp. σε αυτά. Αυτό έχει ήδη επιβεβαιωθεί με κρούσματα της νόσου σε σκυλιά και σε ανθρώπους (Ntais *et al.* 2013). Οι κλιματικές συνθήκες των

περιοχών αυτών, ευνοούν τη δραστηριοποίηση των σκνιπών, η οποία με τη σειρά της ευνοεί την εξέλιξη του βιολογικού κύκλου του παρασίτου. Συνεπώς, απαιτείται ορολογικός έλεγχος των κύριων θηλαστικών-ξενιστών παρακαταθήκη του παρασίτου, δηλαδή των σκύλων κάθε νησιού, σε συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, προκειμένου να γίνει γνωστός ο βαθμός οροθετικότητας αυτών στο παράσιτο, γεγονός το οποίο θα δείξει και το βαθμό κινδύνου για τον άνθρωπο σε κάθε νησί (Aransay *et al.* 1999; Antoniou *et al.* 2009; Christodoulou *et al.* 2012; Ntais *et al.* 2013).

Με τον προσδιορισμό ατόμων σκνιπών από νησιά του Αιγαίου, γίνεται το πρώτο βήμα για την περαιτέρω διερεύνηση της ενδημικότητας της νόσου λειψμανίασης σε αυτά. Η παρουσία των τριών ειδών φλεβοτόμων, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, αποδεδειγμένων διαβιβαστών της Λειψμάνιας, αποτελεί ικανή προϋπόθεση για τη μετάδοση του παρασίτου, εφόσον υπάρχει στις περιοχές αυτές. Απαιτείται περαιτέρω συνεργασία των Πρωτοβάθμιων Μονάδων Υγείας με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες κάθε νησιού προκειμένου να εξετασθεί ο βαθμός επικινδυνότητας για τη Δημόσια Υγεία αλλά κυρίως για τη λήψη όλων των απαραίτητων μέτρων πρόληψης της νόσου. Σε αυτό, καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η σωστή πρόληψη από νύγματα σκνιπών των σκύλων κάθε περιοχής, καθώς αυτοί αποτελούν την κύρια αποθήκη-δεξαμενή του παρασίτου στη φύση.

Καθίσταται εμφανές ότι απαιτείται συνέχιση της παρούσας μελέτης για την πληρέστερη κατανόηση του τρόπου προσαρμογής ειδών φλεβοτόμων σε νησιά του Αιγαίου και της δυνατότητας να μεταδώσουν το παράσιτο Λειψμάνια. Σημαντικές απαντήσεις και διευκρινήσεις θα δοθούν από την αλληλούχιση του γενετικού υλικού αυτών των σκνιπών (DNA-sequencing) η οποία θα ακολουθήσει. Επιπλέον, απαιτείται συλλογή, μορφολογικός και μοριακός προσδιορισμός ατόμων σκνιπών από γειτονικές των νησιών αυτών περιοχές, όπως Πελοπόννησος, Τουρκία και Ρόδος, με σκοπό τη σύγκριση των ειδών και εξέταση πιθανής ανταλλαγής ή/και μετακίνησης πληθυσμών. Ακόμη, σημαντικές για τον τρόπο προσαρμογής των σκνιπών θα ήταν περαιτέρω στατιστικές μελέτες και αναλύσεις των ιδιαίτερων οικολογικών χαρακτηριστικών κάθε νησιού καθώς και των ενδιαιτημάτων των σκνιπών που αυτά διαθέτουν. Τέλος, επιτακτική ανάγκη είναι η συλλογή στοιχείων και δεδομένων από τις Πρωτοβάθμιες Μονάδες Υγείας και των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών κάθε νησιού αναφορικά με νέα κρούσματα λειψμανίασης σε ανθρώπους και κατοικίδια ζώα, με σκοπό την πληρέστερη επιδημιολογική μελέτη και κατανόηση του νοσήματος.

E) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A) ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aleman, C. (1969). "*Finestructure of cultured Leishmania brasiliensis*". **Experimental parasitology**, 24, 259–264.

Al-Gindan, Y., Kubba, R., El-Hassan, A. M., Omer, A. H. S., Kutty, M. K., Saeed M. (1989). "*Dissemination in cutaneous leishmaniasis*". **International journal of dermatology**, 28, 248–254.

Al-Jurayyan, N. A., Al-Nasser, M. N., Al-Fawaz, I. M., Al Ayed, I. H., Al Herbish, A. S., M-Mazrou, A. M., Al Sohaibani, M. O. (1995). "*The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood*". **Journal of tropical pediatrics**, 41, 143–148.

Alten, B., Maia, C., Afonso, M. O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A. L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbek, Y., Arserim, S. K., Erisoz Kasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsvadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L. (2016). "*Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by Leishmania infantum*". Ed. P. A. Bates, **PLOS Neglected Tropical Diseases** 10, e0004458.

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den, the WHO Leishmaniasis Control Team (2012). "*Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence*". Ed. M. Kirk **PLoS ONE**, 7, e35671.

"*Animalia life*" (2017) <http://animalia-life.club/>.

Antoniou, M., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Ascoksilaki, I., Kanavakis, N., Sutton, A. J., Carson, C., Courtenay, O. (2009). "*Increasing incidence of zoonotic visceral leishmaniasis on Crete, Greece*". **Emerging infectious diseases**, 15, 932.

Aransay, A. M., Scoulica, E., Chaniotis, B., Tselentis, Y. (1999). "*Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene*". **Insect molecular biology**, 8, 179–184.

Ashford, R. W. (2000). "*The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses*". **International journal for parasitology**, 30, 1269–1281.

- Baneth, G.** (2005). Leishmaniasis. In C. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd edition. Saunders company, Philadelphia: Greece. pp685–695
- Baneth, G., Shaw, S. E.** (2002). "Chemotherapy of canine leishmaniosis". *Veterinary parasitology*, 106, 315–324.
- Bañuls, A. L., Hide, M., Prugnolle, F.** (2007). Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. In J. Baker, R. Muller & D. Rollinson, *Advances in Parasitology* (vol 64) Elsevier. pp1–458.
- Berman, J. D.** (1997). "Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years". *Clinical infectious diseases*, 24, 684–703.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S.** (1996). "Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting". *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 55, 273–277.
- Bogdan, C., Schönian, G., Banuls, A. L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Röllinghoff, M., Mertens, R.** (2001). "Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature". *Clinical Infectious Diseases*, 32, 302–306.
- Bray, R., Alexander, J.** (1987). "Leishmania and the macrophage". *The leishmaniasis in biology and medicine. Biology and epidemiology*, 1, 211–33.
- Brown, W. M., George, M., Wilson, A. C.** (1979). "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 1967–1971.
- Burns, J. M., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., Badaro, R., Reed, S. G.** (1993). "Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 775–779.
- Centers for Disease Control and Prevention** (2018), <https://www.cdc.gov/>.
- Christodoulou, V., Antoniou, M., Ntais, P., Messaritakis, I., Iovic, V., Dedet, J. P., Pratlong, F., Dvorak, V., Tselentis, Y.** (2012). "Re-Emergence of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis in the Greek Island of Crete". *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12, 214–222.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Sayers, E. W.** (2016). "GenBank". *Nucleic Acids Research*, 44, D67–D72.
- Depaquit, J., Bounamous, A., Akhoundi, M., Augot, D., Sauvage, F., Dvorak, V., Chaibullinova, A., Pesson, B., Volf, P., Léger, N.** (2013). "A taxonomic study of *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi s. l.*". *Infection, Genetics and Evolution*, 20, 500–508.

Depaquit, J., Léger, N., Ferté, H., Rioux, J. A., Gantier, J. C., Michaelides, A., Economides, P. (2001). "*Les phlebotomes de l'île de Chypre III-Inventaire faunistique*". **Parasite**, Paris, 8, 11–20.

Dereure, J., Pratlong, F., Dedet, J. (1999). "*Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin*". In **Canine Leishmaniasis: an update. Barcelona: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**, pp18–25.

Dermitzakis, D. M. (1990). "*Paleogeography, geodynamic processes and event stratigraphy during the Late Cenozoic of the Aegean area*". **Atti Convegna Lincei**, 85, 263–288.

Desjeux, P. (1996). "*Leishmaniasis: public health aspects and control*". **Clinics in dermatology**, 14, 417–423.

Desjeux, P. (2001). "*The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide*". **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 95, 239–243.

Dillon, R. (2008). "*Introduction to Sand flies, Life Cycle*",
http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle__habitats.htm

Dokianakis, E., Tsirigotakis, N., Christodoulou, V., Poulakakis, N., Antoniou, M. (2016). "*DNA sequencing confirms PCR-RFLP identification of wild caught *Larroussius* sand flies from Crete and Cyprus*". **Acta Tropica**, 164, 314–320.

Duggen, S., Hoernle, K., van den Bogaard, P., Rupke, L., Morgan, J. P. (2003). "*Single-crystal gallium nitride nanotubes*". **Nature**, 422, 599–602.

eNetMD (2018). "*Leishmaniasis*", <http://www.enetmd.com/>.

Fassoulas, C. (2001). "*The tectonic development of a Neogene basin at the leading edge of the active European margin: the Heraklion basin, Crete, Greece*". **Journal of Geodynamics**, 31, 49–70.

Feidas, H., Lalas, D. (2001). "*Climatic changes in Mediterranean and Greece: A critical review*". In **Proc. 7th International Conference on Environmental Science and Technology**, pp208–218.

Foglia Manzillo, V., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli, M., Gradoni, L. (2006). "*Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs*". **Veterinary Parasitology**, 142, 142–145.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). "*DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*". **Molecular marine biology and biotechnology**, 3, 294–299.

Gradoni, L. (2002). "*The diagnosis of canine leishmaniasis*". In **Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilla, Spain, pp7–14.

- Grevelink, S., Lerner, A.** (2001). "*Leishmaniasis as an emerging infection*". **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, 6, 175–182.
- Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., Bryceson, A. D.** (2002). "*Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda*". **The Lancet infectious diseases**, 2, 494–501.
- Hagstrum, D. W., Dowdy, A. K., Lippert, G. E.** (1994). "*Early detection of insects in stored wheat using sticky traps in bin headspace and prediction of infestation level*". **Environmental Entomology**, 23, 1241–1244.
- Handman, E., Greenblatt, C. L., Goding, J. W.** (1984). "*An amphipathic sulphated glycoconjugate of Leishmania: characterization with monoclonal antibodies*". **The EMBO journal**, 3, 2301.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., de Waard, J. R.** (2003). "*Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species*". **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 270, S96–S99.
- Hepburn, N. C.** (2000). "*Cutaneous leishmaniasis*". **Clinical and experimental dermatology**, 25, 363–370.
- Hsü, K. J.** (1978). "*The Messinian salinity crisis*". **Naturwissenschaften**, 65, 151–151.
- Ivović, V., Patakakis, M., Tselentis, Y., Chaniotis, B.** (2007). "*Faunistic study of sandflies in Greece*". **Medical and veterinary entomology**, 21, 121–124.
- de Jong, Y., Verbeek, M., Michelsen, V., Bjørn, P. de P., Los, W., Steeman, F., Bailly, N., Basire, C., Chylarecki, P., Stloukal, E., Hagedorn, G., Wetzel, F., Glöckler, F., Kroupa, A., Korb, G., Hoffmann, A., Häuser, C., Kohlbecker, A., Müller, A., Güntsch, A., Stoev, P., Penev, L.** (2014). "*Fauna Europaea – all European animal species on the web*". **Biodiversity Data Journal**, 2, e4034.
- Juttner, C., Rodriguez Sinchez, M., Rollin Landeras, E., Fragio Arnold, C., Slappendel, R. J.** (2001). "*Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis*". **Veterinary Record**, 149, 176–179.
- Kilgour, V., Gardener, P. J., Godfrey, D. G., Peters, W.** (1974). "*Demonstration of electrophoretic variation of two aminotransferases in Leishmania*". **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, 68, 245–246.
- Killick-Kendrick, R.** (1990). "*The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host*". **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, 65, 37–42.
- Killick-Kendrick, R.** (1999). "*The biology and control of phlebotomine sand flies*". **Clinics in dermatology**, 17, 279–289.
- Killick-Kendrick, R.** (2002). "*The life-cycles of Leishmania in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite*". **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**, 57.

- Killick-Kendrick, R., Rioux, J. A.** (2002). "Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*". *Parassitologia*, 44, 67–71.
- Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Saridomichelakis, M. N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K. G.** (1999). "Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)". *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35, 376–383.
- Krijgsman, W., Hilgen, F. J., Raffi, I., Sierro, F. J., Wilson, D. S.** (1999). "Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis". *Nature*, 400, 652–655.
- Lainson, R., Shaw, J., Silveira, F., Braga, R.** (1987). "American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 517.
- Lamothe, J.** (2002). "La leishmaniose canine: limites diagnostiques de la sérologie à partir de deux cas cliniques". *Pratique médicale & chirurgicale de l'animal de compagnie*, 37, 55–59.
- Lane, R. P., Crosskey, R. W.** (1993). *Medical Insects and Arachnids*. Springer Netherlands: Dordrecht.
- Léger, N.** (1993). "Les phlébotomes de Crète". *Biologia Gallo-hellenica*, 20, 135–143.
- Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., Abonnenc, E.** (1983). "Sur la différenciation des femelles du sous-genre *larrousius nitzulescu*, 1931-(Diptera-Phlebotomidae) de la région méditerranéenne". *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 58, 611–623.
- Lewis, D. J.** (1982). "A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae)". *Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology)*, 45, 121–209.
- Lister, G. S., Banga, G., Feenstra, A.** (1984). "Metamorphic core complexes of Cordilleran type in the Cyclades, Aegean Sea, Greece". *Geology*, 12, 221–225.
- Lumsden, W.** (1974). "Biochemical taxonomy of *Leishmania*". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 74–75.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L.** (2013). "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern". *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 123–147.
- Maroli, M., Mizzoni, V., Siragusa, C., D'Orazi, A., Gradoni, L.** (2001). "Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy". *Medical and veterinary entomology*, 15, 358–363.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglia, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L.** (2008). "The northward spread of

leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors: Spread of leishmaniasis in Italy". **Tropical Medicine & International Health**, 13, 256–264.

Martin-Sanchez, J., Lopez-Lopez, M. C., Acedo-Sanchez, C., Castro-Fajardo, J. J., Pineda, J. A., Morillas-Marquez, F. (2001). "*Diagnosis of infections with Leishmania infantum using PCR–ELISA*". **Parasitology**, 122,06.

Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Ivovic, V., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M. (2010). "*Leishmaniasis and the Cyprus Paradox*". **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 82, 441–448.

McKenzie, J. A. (1999). "*From desert to deluge in the Mediterranean*". **Nature**, 400, 613–614.

Molyneux, D., Killick-Kendrick, R. (1987). "*Morphology, ultrastructure and life cycles*". **The leishmaniasis in biology and medicine**, 1, 121–176.

Moritz, C. T. E. D., Dowling, T. E., Brown, W. M. (1987). "*Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics*". **Annual review of ecology and systematics**, 18, 269–292.

Murray, H.W , Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. (2005). "*Advances in leishmaniasis*". **The Lancet** 366, 1561–1577.

Neuber, H. (2008). "*Leishmaniasis*". **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, 6, 754–765.

Nilüfer, A., Yusuf, Ö., Gökhan, Ö., Serdar, P., Ebru, T., Seray, T., Kerem, U., Hüseyin, V., Ebru, Y., Zeki, Y. (2017). *Kanin Leishmaniasis Ulusal Tanı, Tedavi ve Korunma Rehberi*, Turkey.

Ntais, P., Sifaki-Pistola, D., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Pratlong, F., Poupalos, G., Antoniou, M. (2013). "*Leishmaniasis in Greece*". **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 89, 906–915.

Önder, M., Cosar, B., Öztas, M., Candansayar, S. (2000). "*Stress and skin diseases in musicians: evaluation of the beck depression scale, general psychologic profile (the brief symptom inventory [BSI]), beck anxiety scale and stressful life events in musicians*". **Biomedicine & pharmacotherapy**, 54, 258–262.

Pappas, M. G., Hajkowski, R., Hockmeyer, W. T. (1983). "*Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis*". **Journal of immunological methods**, 64, 205–214.

Pinelli, E., Gonzalo, R. M., Boog, C. J., Rutten, V. P., Gebhard, D., Del Real, G., Ruitenber, E. J. (1995). "*Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner*". **European journal of immunology**, 25, 1594–1600.

- Prasad, R., Muthusami, S., Pandey, N., Tilak, V., Shukla, J., Mishra, O. P.** (2009). "Unusual presentations of Visceral leishmaniasis". *Indian journal of pediatrics*, 76, 843–845.
- Pratt, D. M., David, J. R.** (1981). "Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*". *Nature*, 291, 581–583.
- Rashid, J., Chunge, C., Oster, C., Wasunna, K., Muigai, R., Gachihi, G.** (1986). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis occurring long after cure of visceral leishmaniasis in Kenya". *East African medical journal*, 63, 365–371.
- Rees, P. H., Kager, P. A.** (1987). Visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. In: W. Peters, R. Killick-Kendrick (Eds.), *The leishmaniasis in biology and medicine* Vol II. London: Academic Press, 1987:583-615.
- Rioux, J., Leger, N., Haddad, N., Gramiccia, M., Jalouk, L., Dereure, J., Al-Khiami, A., Desjeux, P.** (1998). "Infestation naturelle de *Phlebotomus tobbi* (Diptera, Psychodidae) par *Leishmania donovani* s. st. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), en Syrie". *Parassitologia*, 40.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J.** (1990). "Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification". *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65, 111–125.
- Roberts, L. J., Handman, E., Foote, S. J.** (2000). "Science, medicine, and the future: *Leishmaniasis*". *Bmj*, 321, 801–804.
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D.** (2015). "REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes". *Nucleic Acids Research*, 43, D298–D299.
- Roura, X., Sanchez, A., Ferrer, L.** (1999). "Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique". *Veterinary Record*, 144, 262–264.
- Rudzinska, M. A., D'Alesandro, P. A., Trager, W.** (1964). "The Fine Structure of *Leishmania donovani* and the Role of the Kinetoplast in the *Leishmania-Leptomonad* Transformation". *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 11, 166–191.
- Sacks, D. L., Perkins, P. V.** (1984). "Identification of an infective stage of *Leishmania promastigotes*". *Science*, 223, 1417–1419.
- Saridomichelakis, M. N., Mylonakis, M. E., Leontides, L. S., Koutinas, A. F., Billinis, C., Kontos, V. I.** (2005). "Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs". *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73, 82–86.
- Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E., Karagouni, E.** (1999). "Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece". *European journal of epidemiology*, 15, 271–276.

- da Silva, L. A., de Sousa, C. dos S., da Graça, G. C., Porrozz, R., Cupolillo, E.** (2010). "Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil". **Infection, Genetics and Evolution**, 10, 77–83.
- Simsek, F. M., Alten, B., Caglar, S. S., Ozbel, Y., Aytekin, A. M., Kaynas, S., Belen, A., Kasap, O. E., Yaman, M., Rastgeldi, S.** (2007). "Distribution and altitudinal structuring of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southern Anatolia, Turkey: their relation to human cutaneous leishmaniasis". **Journal of Vector Ecology**, 32, 269–279.
- Singh, S.** (2006). "New developments in diagnosis of leishmaniasis". **Indian Journal of Medical Research**, 123, 311.
- Sinha, R., Arora, S. K., Datta, U., Sehgal, S.** (1992). "Detection of *Leishmania* antigen in Kala Azar patients using monoclonal antibodies". **Microbiology and immunology**, 36, 391–400.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L.** (2001). "Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology". **Journal of Clinical Microbiology**, 39, 560–563.
- Sonnenfeld, P.** (1985). Models of upper Miocene evaporite genesis in the Mediterranean region. In D. J. Stanley & F. C. Wezel (Eds.), *Geological Evolution of the Mediterranean Basin*, pp323–346. Springer.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., Berman, J.** (2002). "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis". **N Engl J Med**, 2002, 1739–1746.
- Sunter, J., Gull, K.** (2017). "Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding". **Open Biology**, 7, 170165.
- Tsirigotakis, N., Pavlou, C., Christodoulou, V., Dokianakis, E., Kourouniotis, C., Alten, B., Antoniou, M.** (2017). "Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Aegean islands: ecological approaches". **in press**, Parasites & Vectors.
- Vawter, L., Brown, W. M.** (1986). "Nuclear and Mitochondrial DNA Comparisons Reveal". **Ann Arbor**, 1001, 48109.
- Vinuelas, J., Garcia-Alonso, M., Ferrando, L., Navarrete, I., Molano, I., Mirón, C., Carcelen, J., Alonso, C., Nieto, C. G.** (2001). "Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs". **Veterinary parasitology**, 101, 23–27.
- Virbac** (2017), <https://gr.virbac.com/>.
- Westaway, R. O. B., Arger, J. A. N.** (1996). "The Gölbaşı basin, southeastern Turkey: a complex discontinuity in a major strike-slip fault zone". **Journal of the Geological Society**, 153, 729–744.

Wheeler, R. J., Sunter, J. D., Gull, K. (2016). "*Flagellar pocket restructuring through the Leishmania life cycle involves a discrete flagellum attachment zone*". **Journal of Cell Science**, 129, 854–867.

WHO (2018). "*Leishmaniasis*", <http://www.who.int/en/>.

B) ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία (Ε.Μ.Υ.) (2017), <http://www.hnms.gr/emv/el/>.

Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛΣΤΑΤ) (2011). "*Απογραφή Πληθυσμού 2011*", <http://www.statistics.gr/>.

Χαραλαμπίδης, Θ. Σ. (2001). *Κτηνιατρική Παρασιτολογία, Πρωτόζωα, έλμινθες, αρθρόποδα*. University Studio Press.