

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της διαφοροποίησης του μικροβιώματος σε σκνίπες διαφορετικών ειδών του γένους *Phlebotomus*, φορέων του παρασίτου *Leishmania spp.*»

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

Προπτυχιακός φοιτητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (Επιβλέπων): Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ (Μέλος): Διδάσκων στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Πράξη ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΗΣ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑΣ ΣΕ ΝΕΟΥΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΕΣ ΚΑΤΟΧΟΥΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΥ)

ΣΩΤΗΡΑΚΗ ΣΜΑΡΑΓΔΑ (Μέλος): Διευθύντρια Ερευνών, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών.

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

BACELOR'S THESIS

**«Study of microbiome differentiation in sand flies of
different species of the genus *Phlebotomus*, vectors of
parasite *Leishmania spp.*»**

PAPADOPOULOS CHRISTOS

Undergraduate student

LARISSA 2019

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τόσο την τριμελή επιτροπή όσο και τα μέλη των εργαστηρίων στα οποία έλαβαν μέρος τα πειράματα, για την συστηματική επιστημονική υποστήριξη.

Στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την εποπτεία της διπλωματικής σε θέματα μικροοργανισμών και αλληλούχισης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Καρά Παναγιώτη και για την βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων τον Δρ. Βασιλείαδη Σωτήριο.

Στο εργαστήριο Κτηνιατρικών Ερευνών ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητή Σαράτση Αναστάσιο για την πολύτιμη βοήθεια στην ταυτοποίηση των σκνιπών και την υποψήφιο διδάκτορα Λίγδα Παναγιώτα για την βοήθεια της στην ανίχνευση του παρασίτου.

Περιεχόμενα	4
Περίληψη	5
Abstract.....	8
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
<u>A.1 Σκνίπες του γένους <i>Phlebotomus</i>.....</u>	9.
A.1.1 Γενικά.....	10
A.1.2 Χαρακτηριστικά (μορφή – συμπεριφορά).....	10
A.1.2.1 Διατροφή και αναπαραγωγή.....	11
A.1.3 Ταξινόμηση των σκνιπών <i>Phlebotomus</i>	12
A.1.4 Γεωγραφική εξάπλωση.....	13
<u>A.2 Παράσιτα <i>Leishmania spp</i>.....</u>	14
A.2.1 Χαρακτηριστικά	15
A.2.2 Βιολογικός κύκλος <i>Leishmania Spp</i>	15
A.2.2.1 Φάση τσιμπήματος 1 ^η , μόλυνση της σκνίπας.....	16
A.2.2.2 Φάση τσιμπήματος 2 ^η μετάδοση παρασίτου από τον φορέα.....	19
A.2.3 Σχέση φορέα παρασίτου σε επίπεδο ειδών.....	20
<u>A.3 Ασθένειες.....</u>	20
A.3.1 Ασθένειες στον άνθρωπο.....	20
A.3.1.1 Σπλαχνική λείσμανίαση.....	20
A.3.1.2 Μετά Kala-zar δερματική λείσμανίωση	21
A.3.1.3 Δερματική λείσμανίωση.....	21
A.3.1.4 Θεραπεία.....	21
A.3.2 Ασθένειες στον σκύλο.....	22
A.3.2.1 Επιδημιολογία.....	22

A.3.2.2 Σπλαγχνική λείσμανίωση.....	22
A.3.2.3 Δερματική λείσμανίωση.....	22
A.3.2.4 Θεραπεία.....	22
<u>A.4 Εντερικό μικροβίωμα της σκνίπας.....</u>	23
A.4.1 Γενικά.....	23
A.4.2 Μικροβίωμα και ο ρόλος του στην ανάπτυξη.....	24
A.4.3 Σχέση παρασίτου-φορέα στο επίπεδο του συμπεριφορισμού.....	24
A.4.4 Συμβολή στην μόλυνση.....	24
<u>A.5 Καταπολέμηση και έλεγχος μετάδοσης.....</u>	25
A.5.1 Έλεγχος πληθυσμών σκνιπών.....	25
A.5.2 Έλεγχος βιολογικού κύκλου του παρασίτου.....	26
A.5.2.1 Παρατρανσγένεση paratrasgenesis.....	26
B. ΣΚΟΠΟΣ.....	27
Γ. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
<u>Γ.1 Ταυτοποίηση σκνιπών.....</u>	28
Γ.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	28
Γ.1.2 Ταυτοποίηση.....	28
Γ.1.2.1 Στοιχεία μορφολογικής ταυτοποίησης των σκνιπών του γένους Phlebotomus.....	30
<u>Γ.2 Απομόνωση DNA.....</u>	33
<u>Γ.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR).....</u>	34
<u>Γ.4 Προετοιμασία δειγμάτων για αλληλούχιση.....</u>	35
Γ.4.1 Ποσοτικοποίηση του DNA μέσω Qubit	35
Γ.4.2 Αραιώσεις.....	35
Γ.4.3. PCR ενίσχυση του 16S rRNA βακτηρίων και αρχαίων (1 ^ο βήμα).....	35
Γ.4.4 Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR, σε πηκτική αγαρόζη.....	36
Γ.4.5 PCR-εσωτερικής ένθεσης για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου βακτηρίων και αρχαίων (Βήμα 2).....	37

<u>Γ.5 Ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης</u>	39
Γ.5.1 Γενικά.....	39
Γ.5.2 Έλεγχος ποιότητας αλληλουχιών (καθαρισμός).....	40
Γ.5.3 Ορισμός των OTU μέσω MSA.....	40
<u>Γ.6 Στατιστική ανάλυση</u>	40
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
<u>Δ.1 Περιεχόμενο παγίδων, αποτελέσματα ταυτοποίησης</u>	41
<u>Δ.2 Έλεγχος για τον εντοπισμό παρασίτου Leishmania</u>	41
<u>Δ.3 Αποτελέσματα (έλεγχος) της προετοιμασίας για αλληλούχιση</u> ...	42
<u>Δ.4 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης</u>	43
<u>Δ.5 Στατιστική ανάλυση</u>	43
Δ.5.1 Βάθος αλληλούχισης.....	43
Δ.5.2 Ανάλυση α-ποικιλότητας βακτηρίων και αρχαίων.....	44
Δ.5.3 Ανάλυση β-ποικιλότητας βακτηρίων και αρχαίων.....	44
Δ.5.4 Ανάλυση της ποικιλότητας των αρχαίων στα διάφορα είδη σκνιπών.....	50
Ε.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	51
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55

Περίληψη

Τα έντομα της οικογενείας *Psychodidae* έχουν ενοχοποιηθεί κατά καιρούς λόγω της συμβολής τους στην ανάπτυξη και μετάδοση παρασίτων. Σκνίπες και κουνούπια μεταφέρουν παράσιτα τα οποία προκαλούν μια σειρά από δυσμενείς καταστάσεις στον άνθρωπο άλλα και σε πολλά άλλα θηλαστικά. Οι σκνίπες της υποοικογενείας *Phlebotomine* είναι αυτές που φαίνεται να είναι κύριες υπεύθυνες για την μετάδοση του παρασίτου *Leishmania*. Το παράσιτο *Leishmania* προσβάλλει τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά προκαλώντας την νόσο λεισμανίωση. Η λεισμανίωση μπορεί να είναι δερματική ή σπλαχνική με την τελευταία να χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό θνησιμότητας. Μια παράμετρος που τον τελευταίο καιρό αναπτύχθηκε λόγω της ανάπτυξης της πληροφορικής και της απλούστευσης των τεχνολογιών αλληλούχισης, είναι η μελέτη της μικροχλωρίδας του εντέρου. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το μικροβίωμα συσχετίζεται με μια σειρά από συνιστώσες του βιολογικού κύκλου του παρασίτου, όπως αυτές της ανάπτυξης του και της μετάδοσης στον ξενιστή. Επιπρόσθετα άνοιξε ο δρόμος για την δημιουργία νέων τεχνολογιών, όπως η παρατρανσγένεση για την καταπολέμηση των παρασίτων εντός του φορέα, μέσω συμβιωτικών βακτηρίων. Για τον λόγο αυτόν στην παρούσα μελέτη σκοπός ήταν να μελετηθεί το εντερικό μικροβίωμα σε 4 είδη σκνίπας, αρνητικά σε μόλυνση από *Leishmania*, ώστε να προκύψει μια εικόνα για το αν το κάθε είδος παρουσιάζει ένα μοτίβο διαφοροποίησης της μικροβιακής κοινότητας. Τα 4 είδη που μελετήθηκαν ήταν τα *P. papatasi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. similis* τα οποία συλλέχθηκαν από την νήσο Λέρο. Για τα 3 τελευταία είδη δεν είχε επαναληφθεί ανάλυση του μικροβιώματος, ενώ όσον αφορά το *P. papatasi*, για το οποίο υπάρχουν παρόμοιες μελέτες, ήταν εφικτό να γίνει μια σύγκριση. Στα δείγματα που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ποικιλότητας των βακτηρίων και αρχαίων με την χρήση τεχνολογίας μαζικής αλληλούχισης τους 16S rRNA γονιδίου. Βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε αρχικά ότι το *P. papatasi* εμφανίζει σημαντικά διαφορετική σύσταση βακτηριακής κοινότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα 3 είδη που μελετήθηκαν. Η διαφοροποίηση αυτή προκύπτει από την σημαντική κυριαρχία στην εντερική μικροχλωρίδα των ατόμων του είδους *P. papatasi* δύο κυρίως OTUs που ανήκουν στα γένη *Wolbachia* και *Spiroplasma* οδηγώντας σε μια φτωχή βακτηριακή ποικιλότητα. Αντίθετα τα *P. tobbi* και *P. similis* εμφανίζουν την υψηλότερη βακτηριακή ποικιλότητα, ενώ το *P. neglectus* παρουσίασε χαμηλή ποικιλότητα ανάλογη του *P. papatasi* με κυρίαρχο βακτήριο ένα OTU του γένους *Wolbachia*. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, καταγράφηκε μια φτωχή σε ποικιλότητα κοινότητα αρχαίων που χαρακτηρίζεται κυρίως από μέλη των *Thaumarcheota*, *Euryarcheota* και *Nanoarchaeota*. Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια καταγραφή τους μικροβιώματος σε διάφορα είδη του γένους *Phlebotomus* που εμφανίζονται στον Ελλαδικό χώρο και αποτελεί μια από τις πρώτες αναφορές παρουσίας αρχαίων στην εντερική χλωρίδα των σκνιπών. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ *Leishmania* και του μικροβιώματος σκνιπών του γένους *Phlebotomus* που αποτελούν και φορείς του συγκεκριμένου παθογόνου παράγοντα.

Λέξεις κλειδιά: σκνίπες, μικροβίωμα, λεισμανίωση, *Phlebotomus*, αλληλούχιση, εντερικό μικροβίωμα, αρχαία, βακτήρια, *Leishmania*, έντομα, παράσιτο, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus similis*, *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus tobbi*.

ABSTRACT

Insects of the family *Psychodidae* have been accused for their contribution in the development and transmission of parasites. Sand flies and mosquitos carry parasites which could cause a series of undesirable diseases to humans and other mammals. Sandflies of the subfamily *Phlebotomine* appear to be responsible for the transmission of the parasite *Leishmania*. This parasite infects humans and mammals causing a type of disease called leishmaniasis. They could dermal or enteric type with the latter being characterized by high mortality rates. One parameter which has developed rapidly during the last few years is the study of the gut microbiota. The study of the microbiome correlates with a series of factors associated with the biological cycle of the parasite like the development and transmission of the parasite to the host. In addition, the study of microbiota open allays for the development of new technologies for the control of parasites inside the host like paratransgenesis. In this frame this study had as main scope to study the enteric microbiome in four species of sandflies, all being negative to the presence of *Leishmania*, in order to identify if the species selects for different microbiota in the gut of sandflies. The four species studies belonged to the genus *Phlebotomus* and they were *P. papatasi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. similis* all collected from traps from the island of Leros. For the latter three species there are no previous studies reporting on their gut microbiome while for *P. papatasi* there are previous studies on the composition of its gut microbiome allowing for potential comparisons. The samples collected where subjected to analysis of the bacterial and archaeal community through shotgun amplicon sequencing analysis of the 16S rRNA gene. Bioinformatic and statistical analysis of the results showed initially that *P. papatasi* supports a largely different gut bacterial community compared to the other three studied species which clustered closely together. This divergence stems from the dominance of two major OTUs in the gut of *P. papatasi* which belong to the genera of *Wolbachia* and *Spiroplasma*. In contrast *P. tobbi* and *P. similis* showed markedly higher bacterial diversity, while *P. neglectus* showed a similar low bacterial diversity (equivalent to *P. papatasi*) with a dominant OTU belonging to the genus *Wolbachia*. We also detected a poor diversity of archaea in the sandflies studies with the most dominant OTUs belong to *Thaumarcheota*, *Euryarcheota* and *Nanoarchaeota*. This study constitutes the first attempt to record the microbiome in different species of sandflies of the genus *Phlebotomus* which are commonly found in Greece and constitute one of the first reports for the presence of archaea in the gut of sandflies. Further studies will look into possible interactions between *Leishmania* and the microbiome of different species of the genus *Phlebotomus* which constitute vectors of this parasite.

Key words: gut microbiota, microbiome, sand fly, bacteria, archaea, *Phlebotomus*, *leishmania*, leishmaniasis, sequencing, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus similis*, *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus tobbi*, parasite.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Σκνίπες του γένους *Phlebotomus*

A1.1 Γενικά

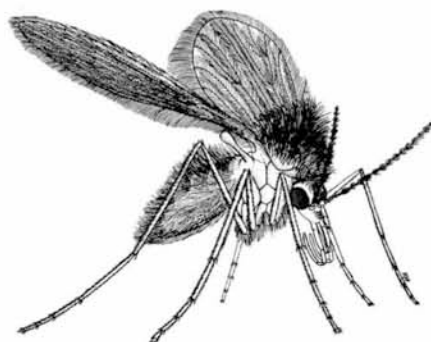
Τα αρθρόποδα εμπλέκονται σε μια σειρά από δυσμενείς διεργασίες καθώς σε αυτά οφείλεται η μετάδοση λοιμογόνων μικροοργανισμών. Στο παραπάνω βασίλειο ανήκει η τάξη των δίπτερων (Diptera κατά Linnaeus). Οι σκνίπες ανήκουν στην οικογένεια *Psychodidae* στην οποία ανήκουν επίσης κουνούπια, μύγες¹ και η υποοικογένεια *Phlebotomine*², είναι φορείς παθογόνων (πρωτόζωα, βακτήρια και ιοί) για τα ζώα και τους ανθρώπους.

Οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* είναι έντομα με ιατρική αξία. Είναι διαπιστωμένο πως είναι φορείς του παρασίτου *Leishmania spp.* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), το οποίο αποτελεί τον μολυσματικό παράγοντα των λείσμανιάσεων³. Τα είδη του γένους *Phlebotomus* είναι φορείς φλεβοϊών (ιός του πυρετού της Νάπολης, ιός του πυρετού της Σικελίας (SFSV) και του ιού της Τοσκάνης (ToSv)⁴) και προκαλούν ασθένεια από το τσίμπημα της σκνίπας. Επιπλέον οι φλεβοϊοί φαίνεται ότι μπορεί να ευθύνονται για περιστατικά μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας και αιμορραγικού πυρετού στον άνθρωπο^{1,4}. Οι φλεβοϊοί (phlebovirus) είναι μία κατηγορία παθογόνων, που παρότι προκαλούν πάνω από 250 εκατομμύρια μολύνσεις τον χρόνο, παραμένει ασαφής η δράση και ύπαρξη τους⁴. Επιπλέον μπορούν να είναι φορείς παθογόνων βακτηρίων όπως το *Bartonella baciformis* κύριος φορέας του οποίου είναι η σκνίπα του γένους *Lutzomyia* (μεταφέρεται και από το *Phlebotomus*^{5,6}). Το *Bartonella baciformis* είναι το υπεύθυνο βακτήριο για τη νόσο του Carrion, η οποία προσβάλλει τα ερυθροκύτταρα προκαλώντας αναιμία *peruana venpuga*. Το πιο σημαντικό είναι το παράσιτο της *Leishmania*. Οι σκνίπες είναι οι κύριοι φορείς και συμβάλλουν στο βιολογικό κύκλο του. Τα θηλυκά άτομα απομυζούν αίμα. Το παράσιτο *Leishmania* προκαλεί λείσμανίωση και κοστίζει την ζωή χιλιάδων ανθρώπων και σκύλων κάθε χρόνο. Η ασθένεια είναι ενδημική σε περισσότερες από 90 χώρες¹.

A.1.2 Χαρακτηριστικά (μορφή – συμπεριφορά)

Οι σκνίπες της υποοικογένειας *Phlebotomine* όπως του γένους *Phlebotomus* και *Lutzomyia*, είναι μικρά έντομα με μήκος που σπάνια υπερβαίνει τα 3mm. Το χρώμα τους κυμαίνεται από λευκό ως σχεδόν μαύρο. Είναι αθόρυβα έντομα κατά την πτήση τους, σε αντίθεση με τα κουνούπια. Υπάρχουν 3 στοιχεία τα οποία τα χαρακτηρίζουν (Εικόνα 1):

1. Φτερά σε σχήμα V όπου βρίσκονται σε γωνία πάνω από την κοιλιά.
2. Διαθέτουν τρίχες στο σώμα τους.
3. Κατά την φάση του τσιμπήματος, κάνει επί τόπου άλματα πριν τσιμπήσει.

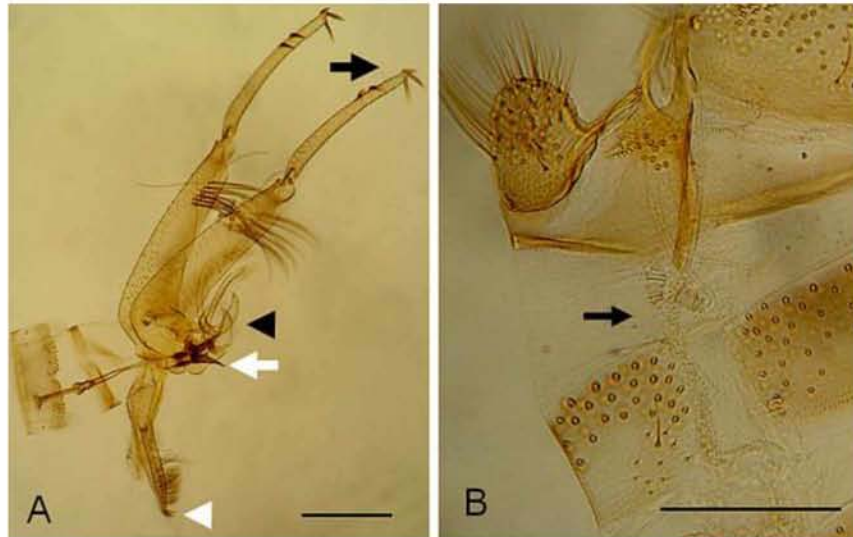


Εικόνα 1 : Σκνίπα της υποοικογένειας *Phlebotomine*.

Η αποστάσεις που διανύουν με το πέταγμα τους κατά την διάρκεια της ζωής τους, δεν ξεπερνούν το ένα χιλιόμετρο από τον βióτοπο γέννησης. Η ταχύτητα πτήσης τους δεν ξεπερνά το 1m/sec. Οι δραστηριότητά τους λαμβάνει χώρα τόσο τις απογευματινές ώρες όσο και κατά την διάρκεια της νύχτας, ενώ κάποια είδη τσιμπούν την ημέρα. Προτιμούν να πετούν σε συνθήκες άπνοιας ή με χαμηλές εντάσεις αέρα. Λόγω των μικρών αποστάσεων που διανύουν παρατηρείτε ενδημική εξάπλωση του παρασίτου⁷. Κατά την διάρκεια ανάπαυσης προτιμούν δροσερά-σκιερά σημεία και υγρούς τόπους. Ζεστά, σκοτεινά και υγρά εδάφη πλούσια σε οργανική ύλη, πεσμένα φύλλα και προϊόντα ξυλείας, κομπόστ, κοπριά, τρύπες στο έδαφος, ρίζες δέντρων, ρωγμές σε τοίχους, κελάρια, πυκνή βλάστηση, ζωικά απόβλητα⁸. Τσιμπούν τα θηλυκά, τα οποία είναι κατά κύριο λόγο εξωφαγικά (τσιμπούν σε εξωτερικούς χώρους) και εξωφυλικά (ανάπαυση και ωρίμανση αυγών σε εξωτερικούς χώρους)².

Η ταυτοποίηση ανάμεσα σε είδη, αλλά και ανάμεσα σε γένη είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω του μικρού μεγέθους τους και της "χαμηλών τόνων" συμπεριφορά τους. Δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο διαφοροποίησης των ειδών, όπως η αναπαραγωγική απομόνωση ή κάποια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η διαφοροποίηση βασίζεται κυρίως σε λεπτά μορφολογικά χαρακτηριστικά⁹. Το γένος *Phlebotomus* εμφανίζει χαρακτηριστική φλέβωση σε όλο το μήκος της πτέρυγας. Οι κεραίες της σκνίπας αποτελούν και αυτές χαρακτηριστικό τους καθώς είναι αρκετά μεγάλες για το μέγεθος του σώματος της. Τα κύρια στοιχεία για τον χαρακτηρισμό τους είναι το αναπαραγωγικό σύστημα και τα όργανα που βρίσκονται στην κεφαλή, όπως ο φάρυγγας και τα μάτια.

Τα αρσενικά ξεχωρίζονται εύκολα με την βοήθεια στερεοσκοπίου από την χαρακτηριστική εξωσωματική δομή των αναπαραγωγικών τους οργάνων, σε σχέση με τα θηλυκά όπου τα αναπαραγωγικά τους όργανα είναι εσωτερικά¹⁰. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2 : Αναπαραγωγικά όργανα της σκνίπας *P. papatasi*. Αριστερά των αρσενικών ατόμων και δεξιά των θηλυκών.

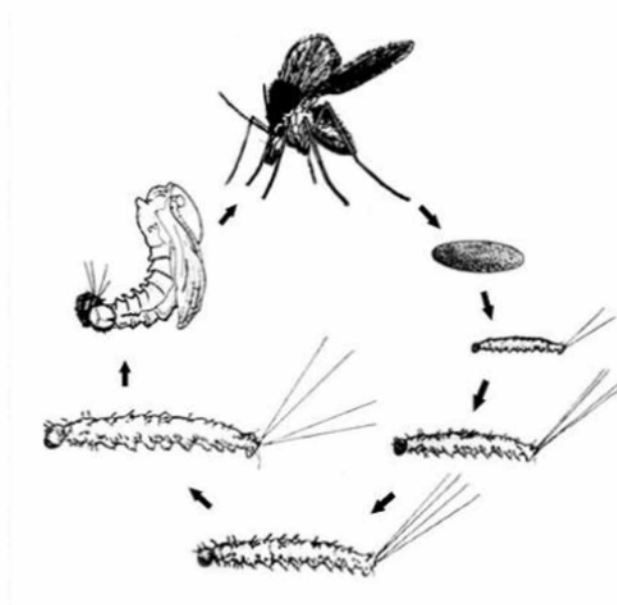
A.1.2.1 Διατροφή και αναπαραγωγή

Τόσο οι αρσενικές όσο και οι θηλυκές τρέφονται για να καλύψουν της ενεργειακές τους απαιτήσεις με πηγές σακχάρων όπως νέκταρ φυτών και μελιτώματα αρίδων. Τα θηλυκά τρέφονται λόγω ωοτοκίας με αίμα².

Γονοτροφικός κύκλος ή αναπαραγωγικός, είναι μια διαδικασία στα αρθρόποδα που περιλαμβάνει την αναζήτηση ενός ξενιστή, τη διατροφή με αίμα, την πέψη του αίματος, την ωρίμανση των αυγών και την ωοτοκία. Τα θηλυκά άτομα που έχουν ολοκληρώσει έναν ή περισσότερους γονοτροφικούς κύκλους έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να μολυνθούν από ένα παράσιτο, σε σχέση με τα θηλυκά που τσιμπούν για πρώτη φορά¹¹. Μολυσμένες σκνίπες τείνουν να τσιμπάνε περισσότερες απο μια φορές².

Όταν η σκνίπα τσιμπάει εναποθέτει στην περιοχή σάλιο, απαραίτητο για την τομή. Το σάλιο περιέχει ένα αγγειοδιασταλτικό μόριο που ονομάζεται maxadilan (ανοσοκατασταλτικό). Το σάλιο πιστεύεται ότι συμβάλει στην επίτευξη της μόλυνσης από το παράσιτο, ενώ νέες μελέτες υποδεικνύουν και την παράλληλη δράση βακτηρίων του εντέρου στη παραπάνω διαδικασία. Στα θηλυκά η σχέση ανάμεσα στο τσίμπημα και την γονιμοποίηση διαφέρει ανά είδος. Κάποια γονιμοποιούνται πριν το τσίμπημα, κάποια μετά και κάποια κατά την διάρκεια του τσιμπήματος. Αρσενικά από 2 είδη (*Lu. longipalpis* και *P. argentipes*) φτάνουν πρώτα στην θέση στον ξενιστή, όπου περιμένουν την έλευση των θηλυκών τα οποία απομυζούν αίμα, με τελικό σκοπό το ζευγάρισμα. Οι σκνίπες του είδους *Phlebotomus duboscqi* εμφανίζουν μια ασυνήθιστη συμπεριφορά. Το θηλυκό θα αναπαραχθεί μόνο αν το αρσενικό περάσει ένα χρονικό διάστημα στην πλάτη του θηλυκού. Θηλυκά του γένους *Lutzomyia* εντοπίζουν του συντρόφους τους μέσω παραγόμενων φερομονών, ενώ στο *Phlebotomus* δεν έχει παρατηρηθεί δράση φερομονών. Μετά το ζευγάρισμα, στις σπερμοθήκες του θηλυκού μαζί με τα σπερματοζωάρια, εναποτίθεται ένα υγρό το οποίο φράζει και εμποδίζει την εναπόθεση σπέρματος από άλλο αρσενικό. Ωστόσο το θηλυκό πρέπει να ξαναζευγαρώσει με άλλο αρσενικό σε κάθε γονοτροφικό κύκλο².

Ο χρόνος ανάμεσα στο τσίμπημα και την ωρίμανση των αυγών είναι και αυτός συνάρτηση του είδους, της ταχύτητας πέψης και του περιβάλλοντος. Σε εργαστηριακές συνθήκες η περίοδος κυμαίνεται από 4-8 μέρες. Οι σκνίπες δεν φωτοκοούν άναρχα στο περιβάλλον, άλλα εναποθέτουν τα αυγά τους σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα με ορισμένα χαρακτηριστικά, όπως ουσίες σε κόπρανα πτηνών και οικόσιτων ζώων. Οι προνύμφες αναπτύσσονται στο έδαφος και όχι υδρόβια. Τα αυγά συνήθως εκκολάπτονται σε περίοδο 7-10 ημερών. Η ανάπτυξη της λάρβας (κάμπια) είναι μια αργή διαδικασία και διαρκεί τουλάχιστον 3 εβδομάδες, προκύπτει η πούπα (νύμφη) η οποία μετά από το πέρας 10 ημερών μεταμορφώνεται σε ακμαίο. Παλαιαρκτικά είδη διαχειμάζουν μέσω διάπαυσης στην φάση της λάρβας 4^ο σταδίου, ενώ σε ζεστές περιοχές μέσω διάπαυσης του σταδίου του αυγού² (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 :Βιολογικός κύκλος σκνίπας *Phlebotomus*.
http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle__habitats.htm

A.1.3 Ταξινόμηση των σκνιπών *Phlebotomus*.

Οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* ανήκουν:

- κλάση: *Insecta*
- τάξη: *Diptera*
- οικογένεια: *Psychodidae*

Το γένος *Phlebotomus* υποδιαιρείται σε αρκετά υπογένη τα οποία προκύπτουν τόσο από μορφολογικά όσο και από μοριακά χαρακτηριστικά όπου στην Ελλάδα συναντώνται με βάση τον πίνακα των ειδών που συναντώνται τα εξής.

- *Larroussius (P. neglectus, P. tobbi, P. perfiliewi)* NCBI:txid59268
- *Paraphlebotomus (P. alexandri, P. sergenti, P. similis)* NCBI:txid59269
- *Phlebotomus (P. papatasi)* NCBI:txid44556
- *Transphlebotomus (P. mascittii)* NCBI:txid262964
- *Adlerius (P. balcanicus, P. simici)* NCBI:txid252618

Δεν συναντώνται στον Ελλαδικό χώρο:

- *Anaphlebotomus* NCBI:txid252618
- *Euphlebotomus* NCBI:txid94468
- *Spelaeophlebotomus* NCBI:txid94473
- *Synphlebotomus* NCBI:txid94474

Ενώ υπάρχουν και άτομα τα οποία διαφέρουν αλλά δεν ανήκουν σε κάποιο υποείδος.

A.1.4 Γεωγραφική εξάπλωση.

Η σκνίπες του γένους *Phlebotomus* συναντώνται σε όλο τον παλιό κόσμο, Ευρασία και Αφρική ενώ στον Νέο κόσμο φορέας της *Leishmania* είναι οι σκνίπες του γένους *Lutzomyia*.

Ανάλογα με την γεωγραφική κατανομή των ειδών της σκνίπας παρατηρείται και διαφορετικό υπόβαθρο επιδημιολογίας³. Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 10 είδη του γένους *Phlebotomus* και 3 του γένους *Sergatomyia*. Τα γένη αυτά περιέχουν είδη που είναι αποδεδειγμένοι ή «ύποπτοι» φορείς του παρασίτου *Leishmania spp.*

Οι σκνίπες του γένους *Sergatomyia* συναντώνται σε όλη την Ελλάδα, δεν αποτελούν όμως σύνηθες αντικείμενο μελέτης καθώς απομυζούν αίμα από τρωκτικά και έτσι δεν δημιουργούν επιδημιολογικές καταστάσεις¹².

Στην Ελλάδα μεγάλο μέρος του πληθυσμού παρατηρείται σε περιοχές των νησιών του αιγαίου. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι οι συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και ανέμων καθώς και το γεωγραφικό ανάγλυφο βοηθούν στην ανάπτυξη των σκνιπών και συνάμα των παρασίτων.

Πίνακας 1 Τα είδη που έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα^{3,13,14,15}.

Είδη σκνίπας	Περιοχές στην Ελλάδα
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Κομοτηνή, Λάρισα, Κρήτη, Ρόδος, Σάμος, Λευκάδα, Κέρκυρα, Ανάφη, Μήλος, Σαντορίνη
<i>Phlebotomus similis</i>	Κομοτηνή, Πιερία, Λάρισα, Κρήτη, Ρόδος, Σάμος, Λευκάδα, Κέρκυρα, Θεσσαλονίκη, Ανάφη, Άνδρος, Ικαρία, Κάρπαθος, Λέρος, Μήλος, Νίσυρος, Πάτμος, Σαντορίνη, Σίφνος
<i>Phlebotomus simici</i>	Άνδρος, Ικαρία, Κάρπαθος, Λέρος, Μήλος, Νίσυρος, Πάτμος, Σίφνος
<i>Phlebotomus perfilewi</i>	Δράμα, Κιλκίς, Γιαννιτσά, Λάρισα, Φάρσαλα, Μαγνησία, Αττική, Κεφαλονιά, Ρόδος, Σάμος, Λευκάδα, Θεσσαλονίκη, Φολέγανδρος, Μήλος, Πάτμος, Σίφνος
<i>Phlebotomus neglectus</i>	Δράμα, Πιερία, Αττική, Κεφαλονιά, Κρήτη, Σάμος, Ανάφη, Άνδρος, Φολέγανδρος, Ικαρία, Κάρπαθος, Λέρος, Μήλος, Νίσυρος, Πάτμος, Σαντορίνη, Σίφνος, Λευκάδα, Κέρκυρα, Θεσσαλονίκη
<i>Phlebotomus tobbi</i>	Ξάνθη, Καβάλα, Πιερία, Λάρισα, Φάρσαλα, Αττική, Κεφαλονιά, Κρήτη, Ρόδος, Σάμος, Άνδρος, Ικαρία, Λέρος, Μήλος, Νίσυρος, Πάτμος, Λευκάδα, Κέρκυρα, Θεσσαλονίκη
<i>Phlebotomus alexandri</i>	Κομοτηνή, Λάρισα, Σάμος, Μήλος
<i>Phlebotomus balcanicus</i>	Κιλκίς, Λάρισα
<i>Phlebotomus mascittii</i>	Κρήτη
<i>Phlebotomus sergenti</i>	Κέρκυρα, Αθήνα
<i>Sergetomyia minuta</i>	Κομοτηνή, Ξάνθη, Καβάλα, Κιλκίς, Πιερία, Λάρισα, Φάρσαλα, Μαγνησία, Αττική, Κεφαλονιά, Κρήτη, Σάμος, Ικαρία, Λέρος, Μήλος, Νίσυρος, Πάτμος, Κέρκυρα, Θεσσαλονίκη
<i>Sergetomyia dentata</i>	Λάρισα, Κεφαλονιά, Κρήτη, Σάμος, Ανάφη, Άνδρος, Φολέγανδρος, Ικαρία, Κάρπαθος, Λέρος, Μήλος, Νίσυρος, Πάτμος, Σαντορίνη, Σίφνος, Θεσσαλονίκη

A.2 Παράσιτα *Leishmania* spp.

A.2.1 Χαρακτηριστικά

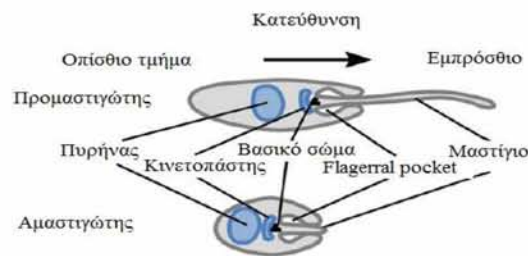
Το *Leishmania* είναι πρωτόζωο της τάξης των *kinetoplastida*, ανήκει στην οικογένεια των *Trypanosomatidae*. Κατά τον βιολογικό του κύκλο συναντάται σε 2 χαρακτηριστικές μορφές, ενδοκυτταρικά σε κύτταρα άμυνας του θηλαστικού ως αμαστιγώτης και εξωκυτταρικά στο έντερο του εντόμου φορέα ως προμαστιγώτης⁹.

Στην Ελλάδα το παράσιτο με την μεγαλύτερη κτηνιατρική άλλα και ιατρική σημασία είναι το *Leishmania infantum* (*P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*) το οποίο χρησιμοποιεί ως δεξαμενή τον σκύλο⁹.

Άλλα χαρακτηρισμένα είδη σκνίπας που είναι φορείς συγκεκριμένων ειδών *Leishmania* είναι τα *P. tobbi* (*L. donovani*), *P. similis* (*L. tropica*) και *P. rapatasi* (*L. major*)³

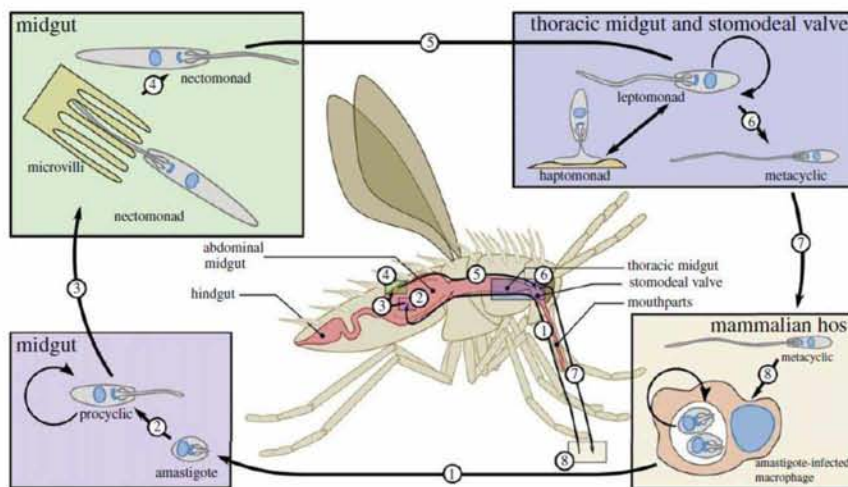
A.2.2 Βιολογικός κύκλος *Leishmania* spp.

Το παράσιτο *Leishmania* βρίσκεται σε διαφορετικές κυτταρικές διαμορφώσεις όταν βρίσκεται στον φορέα (σκνίπα) και σε άλλη διαμόρφωση στον ξενιστή (θηλαστικά). Οι δύο κύριες κυτταρικές διαμορφώσεις του παρασίτου είναι αυτή του προμαστιγώτη (promastigote) στο έντερο των φορέων και αυτή του αμαστιγώτη (amastigote) μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Οι δύο αυτές διαμορφώσεις διακατέχονται σε όλο το διάστημα του κυτταρικού κύκλου από ένα αρχιτεκτονικό μοτίβο, συσχετιζόμενο με τους μικροσωληνίσκους οι οποίοι συνδέονται εγκάρσια και σχηματίζουν ένα πρότυπο «υποσφαιρικού κορσέ»¹⁶. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4 :Κυτταρική δομή προμαστιγώτη και αμαστιγώτη *Leishmania*.

Ο κύκλος διαφοροποίησης μεταβάλλεται ανάλογα με την θέση του παρασίτου. Υπάρχουν 2 φάσεις τσιμπήματος του φορέα απέναντι στον ξενιστή του *Leishmania*. Αυτή του τσιμπήματος που οδηγεί στη μόλυνση του ίδιου του φορέα, το τσίμπημα δηλαδή ενός ξενιστή-δεξαμενή και αυτή του τσιμπήματος που μεταδίδει το παράσιτο το οποίο βρίσκεται στο μεσέντερο¹⁶ (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου του παρασίτου *Leishmania*, αποτυπώνονται τα βασικά στάδια που λαμβάνουν χώρα. 1) Μια σκνίπα απομυζεί αίμα από κάποιο μολυσμένο θηλαστικό ξενιστή λαμβάνοντας μακροφάγα με μολυσμένα με αμαστιγώτη *Leishmania*. 2)

Εντός του μεσεντέρου οι αμαστιγώτες διαφοροποιούνται σε προκυκλικούς προμαστιγώτες. 3) Οι προμαστιγώτες διαφοροποιούνται σε *nectomonad* προμαστιγώτες και διαφεύγουν από την περιτροφική μήτρα και 4) προσκολλώνται στις μικρολάχνες του μεσεντέρου. 5) Μεταναστεύουν στο θωρακικό μεσέντερο και την στοματική κοιλότητα και 6) διαφοροποιούνται σε λεπτομονάδες, οι οποίες εν συνεχεία μετατρέπονται σε *harptomonads* όπου διατηρούν την μόλυνση της σκνίπας ή σε μετακυκλικούς προμαστιγώτες όπου μολύνουν τον ξενιστή με το 7) τσίμπημα. 8) Οι μετακυκλικοί προμαστιγώτες εισέρχονται στα μακροφάγα¹⁶.

A.2.2.1 Φάση τσιμπήματος 1^η, μόλυνση της σκνίπας

Μετά το τσίμπημα, τα μολυσμένα μακροφάγα και ελεύθερα στο αίμα παράσιτα «καταπίνονται» από την σκνίπα και οι αμαστιγώτες εισέρχονται στο έντερο της. Το διάστημα που βρίσκονται στο μεσέντερο περιβάλλονται από την περιτροφική μήτρα, έχοντας χρόνο για διαφοροποίηση¹⁷. Οι αμαστιγώτες μετατρέπονται σε προμαστιγώτες. Η μετατροπή οφείλεται στην μεταβολή του ΡΗ και της θερμοκρασίας. Επιπλέον μπορεί να απαιτείται κάποιο χημικό σήμα όπως συμβαίνει στο πλασμάδιο, όπου απαιτείται ζανθενικό οξύ, μια χρωστική των ματιών των κουνουπιών.

Μετατροπή αμαστιγώτη σε προμαστιγώτη.

Η διαφοροποίηση ξεκινά επεκτείνοντας το μαστίγιο. Γίνεται κυτταρική διαίρεση και προκύπτουν 2 προμαστιγώτες με άλλο σχήμα σώματος (σωληνοειδές), με άλλη δεκτικότητα σε βιομόρια, με μεγάλο μαστίγιο και με υψηλή κινητικότητα.

Ρόλοι του κινητικού οργάνου flagellum (μαστιγίου) του *Leishmania*.

- 1) Κινητικότητα για την απόδραση από την περιτροφική μήτρα και μετακίνηση προς το πρόσθιο έντερο (foregut).
 - i) Μετά το γεύμα αίματος συμβαίνουν μια σειρά αλλαγών στην σκνίπα, συμπεριλαμβανομένης της δημιουργίας μιας περιτροφικής μήτρας η οποία αποτελείται από χιτίνη και γλυκοπρωτεΐνες, σχηματίζεται στο μεσέντερο και δημιουργεί φραγμό ανάμεσα στο αίμα και τις μικρολάχνες του εντερικού επιθηλίου. Εκκρίνεται 4 ώρες μετά από την απομόζηση αίματος. Λειτουργεί ως φραγμός πεπτικών ενζύμων που εκκρίνει το έντερο ως απάντηση στην λήψη αίματος και έμμεσα προστατεύει τα παράσιτα¹⁷. Μετά από τέσσερις μέρες το άπεπτο αίμα και η περιτροφική μήτρα αποβάλλονται. Τα παράσιτα «προμαστιγώτες» πρέπει να δραπετεύσουν από την περιτροφική μήτρα που περιβάλλει το μίγμα του εντέρου ώστε να επιβιώσουν της αποβολής, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με το μαστίγιο τους.
 - ii) Για την επιτυχή μετάδοση ο προμαστιγώτης που βρίσκεται δεσμευμένος στις μικρολάχνες του μεσεντέρου πρέπει να μεταναστεύσει στην στωματοειδή βαλβίδα, μέσω του μαστιγίου.

2) Προσκόλληση στις επιθηλιακές μικρολάχνες του μεσεντέρου και την στωματοειδή βαλβίδα.

- i) Η απώλεια της περιτροφικής μήτρας βοηθά το παράσιτο να εισέλθει στο μεσέντερο. Το μαστίγιο βοηθά στην προσκόλληση του παρασίτου ανάμεσα στις επιθηλιακές μικρολάχνες του μεσεντέρου, έτσι ώστε να αποφεύγεται η αποβολή του. Η προσκόλληση αυτή δεν περιλαμβάνει κυτταρολογικές μεταβολές του παρασίτου. Η προσκόλληση γίνεται μέσω της πρωτεΐνης λεκτίνη και μέσω μιας ειδικής γλυκοπρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη λιποφωσφογλυκάνη (LPG) δείχνει πως είναι καθοριστική για την προσκόλληση. Η LPG είναι συστατικό επιφανειακής επικάλυψης του *Leishmania*.
- ii) 2^{ος} χώρος προσκόλλησης είναι η στωματοειδής βαλβίδα. Εκεί αγκυροβολούν κύτταρα *Leishmania* harptomonads (απτομονάδες), όπου προσαρτώνται στην επένδυση της βαλβίδας. Στις περιοχές αυτές προσκολλώνται με ένα σχετικά κοντό μαστίγιο. Τέτοιου είδους προσκόλληση μέσω παρόμοιων δομών παρατηρείται σε κινετοπλαστοειδή. Η διαμόρφωση harptomonads σταματά την πλήρη μετάδοση προς τα θηλαστικά, με αποτέλεσμα η σκνίπα να διατηρείται μολυσμένη με το παράσιτο για αρκετό διάστημα.

3) Αισθητήριες διεργασίες.

- i) Αφού ξεφύγει από την περιτροφική μήτρα, το παράσιτο μεταναστεύει στο μεσέντερο. Επίτευξη του αποικισμού εξαρτάται από το αν μετά το γεύμα αίματος ακολουθήσει ένα γεύμα πλούσιο σε σάκχαρα. Το παράσιτο φαίνεται να κατευθύνεται προς την κλίση συγκέντρωσης σακχάρων στο έντερο και φτάνει ως το πρόσθιο έντερο.
- ii) Έχουν γίνει πειράματα που μεταβάλουν μοριακά στοιχεία τα οποία είναι υπεύθυνα για την κινητικότητα και την σχέση παθογένειας ανάπτυξης.

Φραγμοί και φάση επιβίωσης του παρασίτου.

- Πρωτεολυτικά ένζυμα.
 - Το πεπτικό σύστημα σε κατάσταση έλλειψης αίματος βρίσκεται σε μια ήπια λειτουργία με χαμηλή δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων. Μετά την κατανάλωση αίματος συμβαίνει μια αύξηση της πεπτικής δραστηριότητας που οφείλεται σε αύξηση έκφρασης πρωτεολυτικών ενζύμων όπως πρωτεάσες σερίνης, θρυψίνες και χυμοθρυψίνες. Τα ένζυμα αυτά είναι λειτουργικά σε αρκετά αλκαλικό PH. Τελευταία έχει βρεθεί ότι εντός του μεσεντέρου υπάρχει έκφραση και άλλων πρωτεασών όπως μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσες, μεταλλοπεπτιδάσες astacin-like, μια ανυλινοαμινοπεπτιδάση και μια νέα πρωτεάση σερίνης. Φαίνεται πως η δράση των πρωτεασών αποτελεί δυσμενές περιβάλλον για το παράσιτο. Σε πειράματα που έγινε μείωση των πρωτεασών σε *P. paratasi* αυξήθηκε αρκετά η επιβίωση του παρασίτου *L. donovani* εντός του εντέρου. Επιπλέον φαίνεται πως το

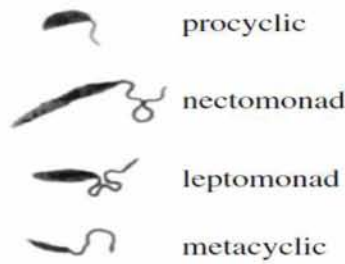
παράσιτο έχει κάποιους μηχανισμούς που επιτυγχάνουν την μείωση της δραστηριότητας κάποιων πρωτεολυτικών ενζύμων¹⁸.

- Περιτροφική μήτρα.
 - Η περιτροφική μήτρα όπως περιγράφηκε παραπάνω δημιουργείται μετά από ένα γεύμα αίματος. Όταν το αίμα είναι μολυσμένο από *Leishmania* αυτή η μήτρα περιβάλλει τα παράσιτα μαζί με το αίμα. Μετά την παραγωγή της, η μήτρα αυξάνεται σε πάχος μέχρι την δεύτερη μέρα, καθιστώντας την «στεγανή» για το παράσιτο. Ύστερα μέσω χιτινικών αποδομείται γεγονός το οποίο εκμεταλλεύεται το παράσιτο ώστε να βρεθεί στο επιθήλιο του μεσεντέρου¹⁸.
- Άμυνα ανοσοποιητικού συστήματος της σκνίπας.
 - Πρωτεΐνες και πεπτίδια εκφράζονται ως απάντηση της έμφυτης ανοσίας. Αντιμικροβιακά πεπτίδια (Defensins) φαίνεται πως παρεμβαίνουν στην διατήρηση του πολλαπλασιασμό του παρασίτου εντός του μεσεντέρου¹⁸.

Διαμορφώσεις του Promastigote *Leishmania*.

Εκτός από τις γενικές διαμορφώσεις του προμαστιγώτη εντός του φορέα (σκνίπα) και του αμαστιγώτη στον ξενιστή (κύτταρα θηλαστικών) παρατηρούνται 4 διαμορφώσεις προμαστιγώτη εντός της σκνίπας. Αυτές οι διαμορφώσεις μεταβάλλονται από την στιγμή που θα εισέλθει το παράσιτο εντός της σκνίπας μέσω του αίματος, έως ότου μολύνει τον ξενιστή. Υπάρχει και η περίπτωση να παραμείνει στην στωματοειδή βαλβίδα υπό την μορφή **haptomonad**. Οι διαμορφώσεις πλήρως διαφοροποιημένες και δεν διαφέρουν μόνο μορφολογικά. Οι κυτταρικές διαμορφώσεις αυτές κατατάσσονται βάση μήκους – πάχους κυτταρικού σώματος και το μαστίγιο (flagellum). Είναι οι εξής (Εικόνα 6):

- **Προκυκλικός προμαστιγώτης**, είναι η μορφή που το παράσιτο εισέρχεται στο πεπτικό σύστημα της σκνίπας μετά το τσίμπημα. Μήκος κυττάρου 6,5 – 11,5 μm με το μαστίγιο μικρότερο από το κυτταρικό σώμα.
- **Nectomonad (νεκτομονάδες) προμαστιγώτης**, παρατηρείται κατά την αποδόμηση της περιτροφικής μήτρας, στην φάση της διαφυγής του παρασίτου και στην κατεύθυνση προς το πρόσθιο έντερο. Μήκος κυττάρου μεγαλύτερο από 12 μm.
- **Leptomonad (λεπτομονάδες) προμαστιγώτης**, αποτελεί την μορφή που θα δώσει εν συνεχεία το μολυσματικό κυτταρικό τύπο, μετακυκλικό προμαστιγώτη ή τον μολυσματικό προς τον φορέα haptomonad στην στωματοειδή βαλβίδα. Μήκος κυτταρικού σώματος μεταξύ 6,5 – 11 μm και μαστίγιο μεγαλύτερο από το κυτταρικό σώμα.
- **Μετακυκλικός προμαστιγώτης**, Η μολυσματική μορφή εντός της σκνίπας. Ικανός να μολύνει τον ξενιστή. Κυτταρικό σώμα μικρότερο από 8μm, και πλάτος 1μm, μαστίγιο μεγαλύτερο από το κυτταρικό σώμα.



Εικόνα 6: Διαμορφώσεις του προμαστιγώτη κατά τον κύκλο του εντός του φορέα (σκνίπα).

Οι προκυκλικοί προμαστιγώτες είναι η πρώτη αναπαραγωγική κυτταρική μορφή που διαιρείται συνεχώς. Μετά από 48-72 ώρες τα παράσιτα επιβραδύνουν τον πολλαπλασιασμό τους και μετατρέπονται σε nectomonads. Οι Nectomonads μεταναστεύουν στο πρόσθιο μεσέντερο και μεταμορφώνονται σε Leptomonads, όπου εισάγεται ένας νέος πολλαπλασιαστικός κύκλος¹⁸.

Η πορεία των διαμορφώσεων αυτών δεν είναι μονόδρομη, αλλά ούτε και κατεξοχήν αμφίδρομη. Αυτό διότι η διαδικασία πολλαπλασιασμού του προμαστιγώτη διαφέρει από την συνηθισμένη κυτταρική διαίρεση. Επομένως δεν προκύπτουν 2 πανομοιότυπα κύτταρα. Έτσι από μια διαίρεση Leptomonad προκύπτει ένα νέο Leptomonad το οποίο παίρνει το μητρικό μαστίγιο και ένας προκυκλικός προμαστιγώτης που συνθέτει νέο μαστίγιο.

A.2.2.2 Φάση τσιμπήματος 2^η μετάδοση παρασίτου από τον φορέα.

Μια μολυσμένη από *Leishmania* σκνίπα, εναποθέτει μετακυκλικούς προμαστιγώτες στην περιοχή τσιμπήματος. Η ζημιά που προκαλείται από το τσίμπημα προσελκύει μακροφάγα τοπικά, τα οποία θα αποτελέσουν τα κύτταρα στα οποία θα εισέλθει το παράσιτο. Ωστόσο φαίνεται πως η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο παράσιτο και τα μακροφάγα συμβαίνει σε άλλη θέση από την θέση του τσιμπήματος.

Οι μετακυκλικοί προμαστιγώτες είναι σε θέση να μεταναστεύουν χάριν στην μήτρα κολλαγόνου που διαθέτουν και τους καθιστά ευέλικτους. Το παράσιτο αλληλεπιδρά με τα μακροφάγα πρώτα μέσω του μαστιγίου που διαθέτει, ενώ υπάρχουν και αναφορές πως η αλληλεπίδραση γίνεται πρώτα μέσω του σώματος του κυττάρου.

Εντός του ξενιστή

Μόλις εισέλθει εντός του μακροφάγου το παράσιτο, διαφοροποιείται από την ευκίνητη μορφή του προμαστιγώτη σε μια μικρότερη δομή, περισσότερο ασταθή με κοντό μαστίγιο, με μια μικρή βολβοειδή άκρη που εκτείνεται στο κυτταρικό σώμα. Αυτή η δραματική μεταβολή της κυτταρικής μεμβράνης συμβαίνει για την εξοικονόμηση χώρου, καθώς από το σημείο αυτό το παράσιτο είναι ενδοκυτταρικό. Η μορφή αυτή ονομάζεται **αμαστιγώτης**. Ο αμαστιγώτης εντός των φαγοκυττάρων πολλαπλασιάζεται και συσσωρεύεται στον σπλήνα και το ήπαρ. Μέσω αυτής της διαδικασίας δρουν είδη που προκαλούν σπλαχνική λεισμανίωση. Στην δερματική λεισμανίωση τα μακροφάγα συσσωρεύονται στο δέρμα.

Το παράσιτο έχει την δυνατότητα να μετασχηματίζει το μαστίγιο του, όπως και άλλοι οργανισμοί. Αυτό δείχνει πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο απέναντι στα μακροφάγα. Εντός του μακροφάγου σχηματίζεται μια μεμβρανική περιοχή (**κοιλότητα**) η οποία

περιβάλλει τον αμαστιγώτη και ονομάζεται **parasitophorus vacuole**. Χαρακτηριστική δομή είναι μεμβράνη του μακροφάγου, η οποία βρίσκεται σε στενή σχέση με το μαστίγιο του αμαστιγώτη.

Το μαστίγιο είναι μια δομή του παρασίτου το οποίο προεκβάλλει από ένα σημείο του κυττάρου γνωστό ως **flagellar pocket**. Είναι ο μόνος χώρος ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης του παρασίτου και ως εκ τούτου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην σχέση ανάμεσα σε αυτό και τον ξενιστή.

Ο ρυθμός ανάπτυξης των αμαστιγωτών μετρήθηκε σε σχέση με αυτόν των προμαστιγωτών και βρέθηκε πολύ μικρότερος. Αυτό συμβαίνει πιθανώς λόγω του μικρού όγκο μακρομορίων που λαμβάνει και εισέρχονται εντός του κυττάρου. Επιπλέον αντανακλά μια εξελικτική πίεση. Έτσι δεν ενεργοποιείται ραγδαία το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, οδηγώντας στην «ύπουλη» ανάπτυξη του παρασίτου με αργούς ρυθμούς.

A.2.3 Σχέση φορέα παρασίτου σε επίπεδο ειδών.

Το κάθε παράσιτο φαίνεται να «επιλέγει» τους φορείς στους οποίους αναπτύσσεται οι οποίοι καλούνται επιτρεπτοί φορείς. Κάποια είδη αντικατοπτρίζουν μια στενή σχέση εξέλιξης (συνεξέλιξης) και αναπτύσσονται μόνο σε συγκεκριμένους φορείς, όπως το *L. major* με το *P. rapatasi* και *P. dudoscqi* και το *L. tropica* με το *P. sergenti*¹⁸. Η σχέση αυτή όμως δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί και πολλές φορές ένας φορέας χαρακτηρισμένος κάποιου είδους παρασίτου, μπορεί να φέρει άλλο παράσιτο άλλου είδους από αυτό που έχει χαρακτηριστεί πιο πριν.

A.3 Ασθένειες

A.3.1 Ασθένειες στον άνθρωπο

A.3.1.1 Σπλαχνική λεισημανίωση

Η (ZVL) ζωοτονική σπλαχνική λεισημανίωση είναι μια ενδημική δυσμενής ασθένεια η οποία προσβάλλει ανθρώπους σε περισσότερες από 65 χώρες. Προσβάλλονται ετησίως 200.000 – 400.000 άνθρωποι με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Προκαλείται από τα παράσιτα *L. donovani* και *L. infantum*. Ξενιστής - δεξαμενή αποτελεί ο σκύλος. Οι φορείς που έχουν ενοχοποιηθεί (περιοχές του Ιράν) είναι τα είδη σκνιπών, *P. perfiliewi*, *P. transcausicus*, *P. kandelakii* και *P. tobbi*, *P. major* (subgenus. *Iarousious*.), (*P. neglectus*), *P. keshishiani* και *P. alexandri*.¹⁹ Αυτό που συμβαίνει κατά τη σπλαχνική λεισημανίωση είναι συσσώρευση μονοκύτταρων φαγοκυττάρων σε ζωτικά όργανα (σπλήνα, ήπαρ) με αποτέλεσμα την σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία. Επιπλέον έχουν παρατηρηθεί λεμφαδενοπάθειες κυρίως σε παιδιά (Σουδάν). Η μη έγκαιρη θεραπεία προκαλεί αιμορραγίες, μείωση επιπέδων των αιμοπεταλίων και δημιουργεί ευνοϊκό περιβάλλον για δευτερογενής λοιμώξεις που μπορεί να καταλήξουν σε θάνατο¹⁹ (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Κορίτσι 20 μηνών με σπλαχνική λείσμανίαση. Κλινικό δείγμα στην Μάλτα.

A.3.1.2 Μετά Kala-zar δερματική λείσμανίωση

Είναι μια δερματοπάθεια που περιλαμβάνει και σπλαχνική λείσμανίωση. Προκαλείται από το *L. donovani* στην Ασία και την Ανατολική Αφρική. Στο Σουδάν το kala-zar εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά, ενώ στην Ινδία σε νεαρούς ενήλικες. Το kala-zar εμφανίζεται καιρό μετά την θεραπεία της VL ως δερματικό εξάνθημα. Η ασθένεια προκαλείται από την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού στα παράσιτα τα οποία παραμένουν στο δέρμα, δρώντας ως δεξαμενή.

A.3.1.3 Δερματική λείσμανίωση

Είναι ένα χρόνια νόσημα το οποίο προκαλείται από την συσσώρευση μακροφάγων στο δέρμα. Η υγρή μορφή της προκαλείται από το *L. major* και η ξηρή μορφή της νόσου από το *L. tropica*. Σε γυμνά τμήματα του σώματος, που έχει εύκολη πρόσβαση η σκνίπα, προκαλούνται αλλοιώσεις από τα παράσιτα¹⁹.

A.3.1.4 Θεραπεία

Η θεραπεία από την λείσμανίωση είναι χρονοβόρα και επίπονη και απαιτεί νοσηλεία. Δεν υπάρχει επιβεβαιωμένη θεραπεία και αυτές που ακολουθούνται εξαρτώνται από το είδος του παρασίτου και το ιστορικό του ασθενή.

Στην δερματική λείσμανίωση παρά την επιβάρυνση του οργανισμού παρατηρείται συνήθως αυτοϊαση. Για αυτό δεν ακολουθείται συστηματική φαρμακευτική αγωγή.

Βασική θεραπεία που ακολουθείται για την λείσμανίαση είναι οι ενώσεις αλάτων πεντασθενούς αντιμονίου, όπως το στιλβογλυκονικό νάτριο (sodium antimonygluconate-Pentostam) και η αντιμονιακή μεγλουμίνη (sodium antimoniate-Glucantime). Αυτή η θεραπεία ακολουθείται πάνω από 100 έτη με συνέπεια να έχει δημιουργηθεί ανοχή, ενώ παρουσιάζει και πλήθος παρενεργειών. Ένα νέο φάρμακο που χρησιμοποιείται είναι η αμφοτερκίνη Β (AmB). Όμως με αρκετές παρενέργειες. Επιπροσθέτως ένα πρόσφατα χρησιμοποιημένο φάρμακο για την αντιλείσμανιακή θεραπεία είναι η Μιλτεφοσίνη, με δράση στην σπλαχνική λείσμανίαση.(30,31,32, virdac)

A.3.2 Ασθένειες στον σκύλο

A.3.2.1 Επιδημιολογία

Υπεύθυνο για την λεισμανίωση στον σκύλο αποτελεί το *L. infantum* (Li). Ο σκύλος αποτελεί την δεξαμενή του παρασίτου στον παλαιό κόσμο. Το παράσιτο επιπλέον χρησιμοποιεί τους σκύλους ως τρόπο διαχείμασης, όταν οι φορείς δεν είναι ενεργοί. Οι περισσότεροι σκύλοι που είναι μολυσμένοι με το παράσιτο δεν εμφανίζουν συμπτώματα ή όταν εμφανίζουν είναι ελαφρά. Οι σκύλοι όμως παραμένουν οροθετικοί. Εκτός από τον σκύλο το Li προσβάλλει και τα αιλουροειδή, όπως είναι η γάτα²⁰. Το Li προσβάλλει και άλλα ζώα συγγενή και μη του σκύλου όπως ο λύκος, η αλεπού και τα τσακάλια. Όμως λόγω του αριθμού και της απόστασης ανάμεσα στα άτομα και τον άνθρωπο ο σκύλος αποτελεί την ιδανική δεξαμενή. Li έχει βρεθεί και σε άλλα οικόσιτα και άγρια ζώα, μη συγγενικά του σκύλου τα οποία αποτελούν περιφερειακούς ξενιστές²¹.

A.3.2.2 Σπλαχνική λεισμανίωση

Στην σπλαχνική λεισμανίωση του σκύλου το παράσιτο κατανέμεται σε ολόκληρο τον οργανισμό, σπλήνα, ήπαρ, λεμφαδένες, μυελό των οστών, νεφρό, δέρμα κλπ., σε αντίθεση με ό, τι συμβαίνει στον άνθρωπο, όπου το παράσιτο περιορίζεται συνήθως σε οστά μυελό, σπλήνα και ήπαρ. Μετά το τσίμπημα από την σκνίπα, τα παράσιτα κατανέμονται γρήγορα στον λεμφαδένα και τον σπλήνα μέσω αίματος ή λέμφου και από εκεί πηγαίνουν στους νεφρούς και το συκώτι. Αργότερα, τα παράσιτα εξαπλώνονται στα αναπαραγωγικά όργανα, στο δέρμα, στην ουροδόχο κύστη, στο πεπτικό και αναπνευστικό σύστημα. Η παρουσία του παρασίτου μέσω της ανοσολογικής απόκρισης που προκαλείται δημιουργεί δυσμενείς καταστάσεις για την υγεία του σκύλου, όπως λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, ηπατίτιδα, εντερίτιδα και αλλοιώσεις τους οφθαλμούς.

A.3.2.3 Δερματική λεισμανίωση

Κατά την εκδήλωση της δερματικής λεισμανίωσης ο οργανισμός μέσω κυττάρων άμυνας προσπαθεί να καταπολεμήσει το παράσιτο με αποτέλεσμα στο δέρμα, σε σημεία "μάχης" να δημιουργούνται έλκοι, θρόμβοι, δερματίτιδα, αλωπεκία, οζίδια και άλλες παρόμοιου τύπου αλλοιώσεις.

A.3.2.4 Θεραπεία

Φαρμακευτικές αγωγές που χρησιμοποιούνται είναι ο συνδυασμός ενώσεων αλάτων πεντασθενούς αντιμονίου, meglumine antimoniate (Glycantime) και αλλοπουρινόλης σύμφωνα με θεραπευτικά πρωτόκολλα. Όμως η διάρκεια θεραπείας καθώς και οι παρενέργειες αποτελούν αρνητικό παράγοντα. Ένα νέο φάρμακο το οποίο γίνεται απο στόματος χρήση και χορηγείται απο τον ιδιοκτήτη είναι το Miltefosine²².

A.4 Εντερικό μικροβίωμα της σκνίπας.

A.4.1 Γενικά

Η μικροβιακή χλωρίδα των εντόμων αποτελεί παράγοντα που εμπλέκεται σε μια σειρά φυσιολογικών διεργασιών. Επηρεάζει την θρεπτική, ανοσοποιητική και αναπαραγωγική κατάσταση του. Ο χαρακτηρισμός του μικροβιώματος του εντέρου αποκαλύπτει μια ευρεία ποικιλότητα η οποία οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και κληροδοτούμενες μεταφορές. Στην μικροχλωρίδα πολλών εντόμων κυριαρχούν μικροοργανισμοί οι οποίοι παρέχουν στο έντομο, απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία που λείπουν από την διατροφή του, στοιχεία που παράγονται από τον μεταβολισμό των μικροβίων. Αυτή η μεταβολική συμπλήρωση βοηθά πολλά έντομα όπως αφίδες, κουρκουλιονοειδή και μύγες τσε-τσε να επιβιώσουν σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών. Άλλα βακτήρια όπως του γένους *Wolbachia* μπορεί να επηρεάσουν την αναπαραγωγική βιολογία του ξενιστή. Στα κουνούπια gram⁻ βακτήρια αναστέλλουν την σπορογονική ανάπτυξη του πλασμάδιου²³ Το μικροβίωμα του εντέρου επιπλέον μπορεί να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, αυτό κάποιες φορές έχει σαν αποτέλεσμα την προστασία από άλλα επιβλαβή παράσιτα. Υπάρχει δηλαδή αμοιβαίο όφελος γιατί έτσι τα βακτήρια εξασφαλίζουν μικρότερο ανταγωνισμό. Έχει αποδειχθεί ότι ορισμένοι ενδοσυμβιώτες προσδίδουν αντίσταση προς ξενιστές ενάντια σε παράσιτα και ιούς, π.χ. στις μαύρες μέλισσες εντερικοί συμβιώτες προστατεύουν από εντερικά παράσιτα, ενώ στην μύγα τσε-τσε βακτήρια του γένους *Wigglesworthia* παρέχει έμμεση προστασία έναντι των τρυπανοσωμάτων. Τελευταία φαίνεται πως το μικροβίωμα επηρεάζει διεργασίες ανάμεσα στο σύμπλεγμα παρασίτου-φορέα-ξενιστή στα επίπεδα, μόλυνσης, επιβίωσης και διάδοσης²⁴. Το γεύμα αίματος σε σκνίπες *Lu. longipalpis* παρατηρήθηκε ότι μειώνει την ποικιλομορφία του μικροβιώματος, ενώ δεν επηρεάζει τον αριθμό, αντιθέτως μπορεί να αυξάνονται ορισμένα βακτήρια που επιβιώνουν και έχουν πλουσιότερο περιβάλλον σε θρεπτικά⁴.

Τα αρθρόποδα δεν ομαδοποιούνται ως μια συμπαγή ομάδα που οι επιμέρους συμπεριφορές είναι αυτές που συναρτούν προς μεταβολές του μικροβιώματος. Κάθε ομάδα εντόμων μπορεί να έχει διαφορετικό βιολογικό κύκλο και οι σχέσεις ανάμεσα στα άτομα του ίδιου είδους να είναι κοινωνικές με άμεση αλληλεπίδραση (χωρική και χρονική) όπως οι μέλισσες και οι τερμίτες. Μπορεί προς να είναι κυρίως ατομική όπως στην περίπτωση των σκνιπών και των κουνουπιών, όπου η κοινωνικότητα διέπεται πιθανότατα μόνο από διαδικασίες αναπαραγωγής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα κοινωνικά έντομα να κουβαλούν ένα κάπως παρόμοιο μικροβίωμα κάτι που δεν περιμένουμε να συμβαίνει στα μη κοινωνικά έντομα²⁵.

Τα βακτήρια μπορεί να αποκτηθούν στα αρθρόποδα από το περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένου του εδάφους, του νερού, μέσω τροφής, των ζώων και των φυτών. Εντός του σώματος τα βακτήρια μπορεί να εισέλθουν από ανοίγματα όπως το στόμα, τα σπειράματα (τραχείες) και μέσω του πρωκτικού πόρου. Η συνουσία μπορεί προς να θεωρηθεί ως μία οδός εισόδου (αφροδίσια οδός). Τα αρθρόποδα τα οποία απομυζούν αίμα αποκτούν βακτήρια του δέρματος του ξενιστή και βακτήρια που υπάρχουν στο αίμα. Μια επιπλέον παράμετρος που διαφοροποιεί τον τρόπο εισόδου και τις συνθήκες εισόδου στα απομυζητικά έντομα είναι η διαδικασία τσιμπήματος. Τα κουνούπια χρησιμοποιούν την προβοσίδα τοποθετώντας την εντός των αγγείων. Σε αντίθεση με αυτό οι σκνίπες κάνουν μια τομή και το αίμα εξέρχεται, με αποτέλεσμα το αίμα να έρχεται σε επαφή με περισσότερα βακτήρια από την περιοχή που (λιμνάζει).³⁵

A.4.2 Μικροβίωμα και ο ρόλος του στην ανάπτυξη.

Σε σκνίπες *Lutzomyia intermedia* που αναπτύσσονται εργαστηριακά, υπήρξε μεταβολή στην ανάπτυξη στο στάδιο της προνύμφης, όταν η τροφή είχε διαφορετική σύσταση σε βακτήρια. Σε 3 είδη κουνουπιών (*Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Georgescraigius atrorpalpus*) κατά την φάση της ανάπτυξης των αρσενικών προνυμφών, έλλειμμα της βακτηριακής κοινότητας δεν επιτρέπει ανάπτυξη. Αντίθετα η προσθήκη μονάχα ενός βακτηριακού είδους, επαναφέρει την ανάπτυξη του *A. aegypti*⁴. Οι σκνίπες όπως έχει αναφερθεί τρέφονται κατά κύριο λόγο με κόπρανα από τρωκτικά λαγόμορφα, ερπετά και πτηνά. Προνύμφες αναπτύχθηκαν εργαστηριακά σε κόπρανα κουνελιού που ήταν αποστειρωμένα και αυτό καθυστέρησε την εκκόλαση ενώ μείωσε την επιβίωση. Επιπλέον έγινε έλεγχος αν επηρεάζει η σύσταση των βακτηρίων του υποστρώματος και στην αποστειρωμένη κοπριά έγιναν μολύνσεις με διαφορετικά βακτήρια με αποτέλεσμα να υπάρχει διαφορά στον χρόνο εκκόλασης και την ανάπτυξη⁴. Ενώ στο *P. papatasi* φαίνεται πως προσελκύεται για ωτοκόκκους από βακτήρια του εδάφους (*staphylococcus*).²

A.4.3. Σχέση παρασίτου-φορέα στο επίπεδο του συμπεριφορισμού.

Το παράσιτο *Leishmania* εντός του εντέρου της σκνίπας δεν παραμένει σε μια απλή διαδική σχέση παραγωγού-καταναλωτή, όπως συνηθίζεται σε τέτοιου είδους σχέσεις. Το παράσιτο είναι ικανό να χειραγωγήσει τον φορέα (σκνίπα) μεταβάλλοντας την διατροφική συμπεριφορά. Η σκνίπα χειραγωγούμενη από το *Leishmania* ωθείται να απομυζήσει αίμα περισσότερες φορές από ότι μια "υγιής" σκνίπα. Κατά την φάση αυτή υπάρχει μεγάλη συσσώρευση μολυσματικής μετακυκλικής μορφής του προμαστιγώτη και αύξηση εκκρινόμενης (Fppg) πρωτεοφωσφογλυκάνης. Ο ΗfPPG είναι ο καθοριστικός μολυσματικός παράγοντας κυρίως στην φάση προς μόλυνσης στον ξενιστή (θηλαστικό). Η αύξηση της συχνότητας τσιμπήματος από την σκνίπα αυξάνει την επαφή με ξενιστές και επομένως την μόλυνση. Για αυτήν την μεταβολή της συμπεριφοράς που παρουσιάζει η σκνίπα, υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει κάποια συνιστώσα του μικροβιώματος.²⁶

A.4.4. Συμβολή στην μόλυνση

Το μικροβίωμα συμμετέχει στην διαδικασία της μόλυνσης του ξενιστή από τον φορέα με το παράσιτο *Leishmania*. Κατά την φάση του τσιμπήματος, τοπικά μεταναστεύουν αρκετά ουδετερόφιλα και μακροφάγα δημιουργώντας φλεγμονή. Το *Leishmania* χρησιμοποιεί, όπως ειπώθηκε παραπάνω, τα μακροφάγα ως 'δούρειο ίππο' για να εισέλθει και να πολλαπλασιαστεί στην μορφή του αμαστιγώτη. Η φλεγμονώδης αυτή αντίδραση που προσελκύει τα κύτταρα της άμυνας στο σημείο τσιμπήματος αποδείχθηκε ότι απαιτεί φυσικό τσίμπημα σκνίπας. Επάγονται σε υψηλά επίπεδα κυττοκίνες IL1β, καθώς και TNFα, NOS₂, IFNγ, IL2β. Επιπλέον στη θέση του τσιμπήματος είναι σε υψηλά επίπεδα ο NLRP3, μόρια προ-κασπάσης και αποσπασμένης κασπάσης, κάτι το οποίο δείχνει ότι το τσίμπημα οδηγεί σε δημιουργία σημαντικής φλεγμονής. Βρέθηκε ότι αυτό που προκαλεί την φλεγμονή και την προσέλκυση των μακροφάγων είναι το σάλιο προς σκνίπας και μικρόβια του μεσεντέρου ή ο λιποπολυσακχαρίτης LPS²⁴.

Πειράματα συσχέτισης μικροβιώματος και παρασίτου στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του παρασίτου στην μολυσματική μετακυκλική μορφή, στην σκνίπα *P. duboscqi* έδειξαν ότι οι βακτηριακές κοινότητες δεν είναι αυτές που αντιδρούν άμεσα με το παράσιτο, ούτε

προσφέρουν θρεπτικά στοιχεία που είναι απαραίτητα στο παράσιτο. Αυτό που φαίνεται να κάνει η εντερική χλωρίδα σε σχέση με το παράσιτο είναι η δημιουργία βαθμίδωσης θρεπτικών (σακχάρων). Αυτή η βαθμίδωση δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες οσμωτικότητας που φαίνεται να είναι απαραίτητες για την διαφοροποίηση του παρασίτου, καθώς όπως φαίνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων η οσμωτικότητα προκαλεί λύση των πρόμαστιγωτών²³.

A.5 Καταπολέμηση και έλεγχος μετάδοσης.

A.5.1 Έλεγχος πληθυσμών σκνιπών

Η μεγαλύτερη μείωση των ποσοστών των λείσμανιώσεων συνέβη κατά την μαζική αντιελονοσιακή εκστρατεία με υψηλό βαθμό ψεκασμού με DDT. Μετά από αυτό είναι αναγκαία η παρακολούθηση προς ανθεκτικότητας των σκνιπών στα εντομοκτόνα⁷.

- Σε **επίπεδο πηγής** αύξησης των σκνιπών δηλαδή μέσω παρέμβασης στα ενδαιτήματα που εναποθέτουν τα αυγά προς και αναπτύσσονται οι προνύμφες. Αυτό είναι αρκετά δύσκολο γιατί δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι συνθήκες. Παρά ταύτα υπάρχουν κάποιες αναφορές όπου με ορισμένες παρεμβάσεις στο περιβάλλον όπως, ο αερισμός του εδάφους ή η καλλιέργεια κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, προκαλούν μείωση των πληθυσμών⁷.
- Σε επίπεδο **παροχής της τροφής** των ενήλικων σκνιπών. Οι σκνίπες τρέφονται με σάκχαρα από το νέκταρ των φυτών μελιτώματα και σακχαρομύκητες. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αντιμετώπισης των πληθυσμών χρησιμοποιώντας σακχαρομύκητες οι οποίοι έχουν εργαστηριακά καταστεί τοξικοί για κάποιες σκνίπες. Οι πληθυσμοί αυτοί μπορούν να ψεκαστούν στους φλοιούς των δέντρων και να ενεργοποιηθούν μόνο μετά την κατάποση. Η δράση σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι ειδοειδική⁷.
- Επιπλέον γίνεται σε **παρέμβαση στα ζώα από τα οποία η σκνίπα απομυζεί αίμα**, έτσι είτε απωθείται είτε θανατώνεται. Αμβερμεκτίνες σε χαμηλές ποσότητες έχουν αποδειχτεί θανατηφόρες για προς σκνίπες. Κάποια εντομοκτόνα εντοπίζονται και έχουν δράση σε περιτώματα τρωκτικών στα οποία αναπτύσσονται προνύμφες σκνιπών. Σε σκύλους δίδονται περιλαίμια εμβαπτισμένα με εντομοκτόνα όπως η δελταμεθρίνη με αποτέλεσμα οι σκνίπες να πεθαίνουν ή να απωθούνται. Έτσι λόγω των λιγότερων τσιμπημάτων γίνεται παρέμβαση στον βιολογικό κύκλο του *Leishmania*⁷.
- Παρέμβαση **βάση συμπεριφοράς** της σκνίπας. Η σκνίπα έχει ένα ιδιόμορφο τρόπο πετάγματος, επηρεαζόμενο από την θερμοκρασία, το διοξείδιο του άνθρακα και κάποια φυσικά εμπόδια. Η σκνίπα πετάει σε μικρή απόσταση από το έδαφος σε ευθεία πτήση, αν συναντήσει εμπόδιο τότε πετάει προς τα πάνω. Έτσι έχουν αναπτυχθεί τεχνολογίες αντιμετώπισης μέσω φραγμάτων, αυτά εμποτίζονται με εντομοκτόνο κατά μήκος και η σκνίπα έρχεται άμεσα σε επαφή. Τα φράγματα αυτά τοποθετούνται γύρω από οικισμούς ή κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις⁷.

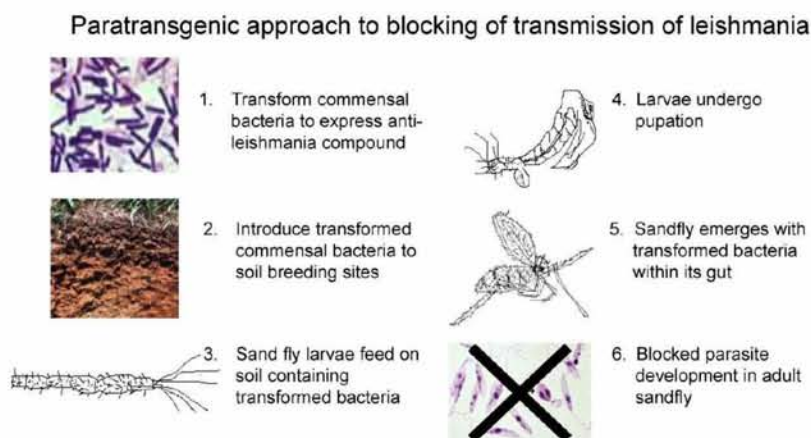
A.5.2 Έλεγχος βιολογικού κύκλου του παρασίτου

A.5.2.1 Παρατρανσγένεση (paratrasgenesis)

Η παρατρανσγένεση είναι μια τεχνολογία αντιμετώπισης των παρασίτων μέσω μιας προσέγγισης 'Δούρειου Ίππου'. Στην τεχνολογία αυτή η βακτηριακή χλωρίδα των φορέων απομονώνεται και τροποποιείται γενετικά *in vitro* για να εκκρίνουν μόρια που παρεμποδίζουν την μετάδοση των παθογόνων. Τα γενετικώς τροποποιημένα συμβιωτικά βακτήρια στην συνέχεια επανεισάγονται στους φορείς, όπου εκφράζοντας αυτά τα μόρια μεταβάλλεται η ικανότητα των παθογόνων να αναπτυχθούν ή να προσβάλλουν μέσω των φορέων άλλους ξενιστές. Αυτή η προσέγγιση έχει σαν στόχο την επίτευξη της παρέμβασης του βιολογικού κύκλου του παρασίτου, χωρίς να επηρεάζεται ο φορέας. Η δεξαμενή των γονιδίων προέρχεται από βακτηριακή χλωρίδα του ξενιστή (φορέα). Για να αναπτυχθεί αυτή η προσέγγιση, πρέπει να πληρούνται αρκετές προϋποθέσεις, όπως (Εικόνα 8):

- Ο πληθυσμός των βακτηρίων να βρίσκεται εντός του φορέα.
- Τα συμβιωτικά αυτά βακτήρια πρέπει να είναι συγκεκριμένα (ειδοειδικά) στον φορέα.
- Πρέπει να υπάρχει επιβίωση όπως πριν από την γενετική τροποποίηση.
- Τα εκκρινόμενα διαγονίδια πρέπει να εντάσσονται σε βιοχημικά μονοπάτια του στόχου.
- Πρέπει να υπάρχει φραγμός στην διασπορά του γενετικά τροποποιημένου γενετικού υλικού, προς άλλα βακτήρια και οργανισμούς.

Επιπλέον για την ανάπτυξη αυτής της τεχνολογίας απαραίτητη είναι η αποσαφήνιση της εντερικής μικροχλωρίδας της σκνίπας (μικροβίωμα) ανά είδος.



Εικόνα 8 : Στρατηγική χρήσης δράσης παρατρανσγένεσης στις σκνίπες. 1) Μετασηματισμός βακτηρίων ώστε να εκφράζουν επιθυμητά αντι-λείσμανιασιακα μόρια. 2) Εναπόθεση των μετασηματισμένων βακτηρίων στα ενδιαιτήματα ανάπτυξης της σκνίπας. 3) Πρόσληψη μέσω διατροφής από την προνύμφες. 4) Έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια παραμένουν και μετά την φάση της μεταμόρφωσης. 5) Η ενήλικη σκνίπα είναι πλέον ανθεκτική στην μόλυνση από *Leishmania*. 6) Δεν αναπτύσσονται ή θανατώνονται τα παράσιτα, άρα δεν υπάρχει μετάδοση⁴¹

B. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανάγκη εξεύρεσης λύσης σχετικά με την ραγδαία εξάπλωση της λείσμανίωσης σε ανθρώπους άλλα και σε κατοικίδια-οικόσιτα, έχει οδηγήσει όλο και περισσότερους επιστήμονες να ασχολούνται ανά τον κόσμο. Τα επίπεδα παρεμβάσεις μπορούν να συσχετιστούν με κάθε βιολογικό χαρακτηριστικό του κάθε οργανισμού (παρασίτου, φορέα, ξενιστή). Σήμερα οι θεραπείες που προτάσσονται πέρα από το ότι είναι ατελείς, ακολουθούνται από υψηλό κόστος. Οι έκφραση των ασθενειών στον άνθρωπο κορυφώνεται σε περιοχές ιδιαίτερα χαμηλού βιοτικού επιπέδου. Αυτό θέτει ως προτεραιότητα να βρεθεί άμεση λύση για την θεραπεία, όλο και περισσότερων ανθρώπων. Λύση στην θεραπεία και ακόμη περισσότερο για την πρόληψη των επιδημιών μέσω παρέμβασης στην βιολογία του παρασίτου, του φορέα ή μέσω της κατασκευής εμβολίου προσιτού προς όλους. Ένα από τα πεδία τα οποία δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς και τελευταία φαίνεται πως συμβάλει σε αρκετές διεργασίες στην βιολογία του συμπλέγματος παρασίτου-φορέα-ξενιστή, είναι το μικροβίωμα. Όλες οι μελέτες έχουν στο στόχαστρο αυτό το σύμπλοκο, μελετώντας το διαλεκτικά (ως ολότητα) και φαίνεται ότι συμβάλει στην μόλυνση, επηρεάζει την ανάπτυξη εντός του εντέρου και άλλα αδιευκρίνιστα ακόμα μονοπάτια. Το μικροβίωμα διαμορφώνεται από το περιβαλλοντικό γίνεσθαι του εντόμου. Δεν γνωρίζουμε όμως αν εντός του είδους διατηρείται κάποιο μοτίβο του εντερικού μικροβιώματος.

Κύριο ερώτημα που θέλαμε να απαντήσουμε στην παρούσα μελέτη ήταν εάν το μικροβίωμα σκνιπών του γένους *Phlebotomus* διαφοροποιείται μεταξύ τεσσάρων διαφορετικών ειδών, *P. rapatasi*, *P. neglectus*, *P. similis*, *P. tobbi*, τα οποία είναι και πιθανοί μολυσματικοί φορείς *Leishmania*. Σκνίπες από τα παραπάνω είδη συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή στην Ελλάδα κατά την διάρκεια ενός χρονικού διαστήματος 3-4 μηνών. Οι σκνίπες ελέγχθηκαν για παρουσία *Leishmania* και ήταν όλες αρνητικές. Η σύσταση του μικροβιώματος στα τέσσερα διαφορετικά είδη *Phlebotomus* μελετήθηκε με την χρήση μεθόδων μαζικής αλληλούχισης στοχεύοντας στα βακτήρια και τα αρχαία που αποτελούν το προκαρυωτικό μικροβίωμα των σκνιπών.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.1 Ταυτοποίηση σκνιπών.

Γ.1.2. Προετοιμασία δειγμάτων.

Με την βοήθεια στερεοσκοπίου έγινε ο διαχωρισμός των σκνιπών από άλλα έντομα και υπολείμματα εντός της παγίδας. Όλες οι σκνίπες ανά παγίδα τοποθετήθηκαν σε erpendorf που περιείχε αιθανόλη 80%. Από κάθε σκνίπα κόπηκαν με την βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας το κεφάλι και το πίσω μέρος, στο οποίο εμπεριέχονται τα γεννητικά όργανα. Στην φάση αυτήν γίνεται ο καθορισμός του φύλλου της σκνίπας. Το μεσαίο μέρος που περιέχει την κοιλιά και το έντερο από τις θηλυκές σκνίπες που κοβόταν, τοποθετούταν σε erpendorf με αρίθμηση και τοποθετούνται σε κατάψυξη στους -80°C .

Το κεφάλι και το πίσω μέρος τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα με overnight επώαση σε διάλυμα lactophenol, μετά την επώαση προστίθεται διάλυμα Hoyer's, ώστε να επιτευχθεί διάλυση και τα δείγματα ήταν έτοιμα για μελέτη στο μικροσκόπιο.

Lactophenol (διάλυμα διαύγασης)

Υλικά

- 10 ml lactic acid
- 10 ml glycerol
- 10 ml solid Phenol τήξη σε υδατόλουτρο υψηλής θερμοκρασίας
- 10 ml dH₂O

Hoyer's solution (διάλυμα μονιμοποίησης)

Υλικά

- 7,5 gum Arabic
- 12,5 H₂O
- 50 g chloral hydrate
- 5 g glycerol

Γ.1.2 Ταυτοποίηση

Κατά την φάση της ταυτοποίησης παρατηρούνται τα γεννητικά όργανα και ο φάρυγγας. Η ταυτοποίηση βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά αυτών των δομών, που χαρακτηρίζουν τα είδη και τα γένη, σε αρσενικά και θηλυκά.



1.

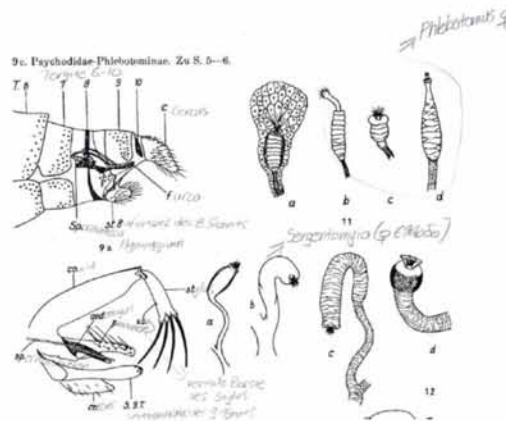
Σπερμαθήκες

Phlebotomus

Sergatomyia

1) Διαφορετικές διαμορφώσεις των σπερμαθικών παρατηρούνται στα 2 γένη (βασισόμενη στην μορφολογία κατά Theodor book figures 11b,c,d για το *Phlebotomus* και 12b για τα *Sergatomyia*).

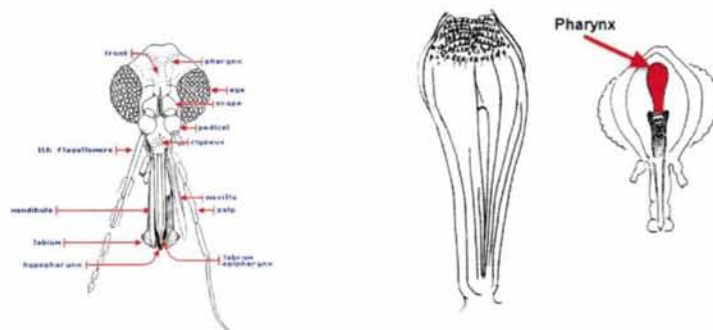
2) Για τον χαρακτηρισμό των ειδών παρατηρείται η μορφή των σπερμοθηκών, ο αριθμός των δακτυλιδιών, η μορφή των προσβαλλόμενων σωληναρίων και η μορφή των σωληναρίων της βάσης μέσω του **Theodor's book**.⁴³ και άλλων πρωτοκόλλων.⁴²



2

Φάρυγγας

Για τα χαρακτηριστικά των δομών του φάρυγγα που παρατηρούνται ανά είδος έγινε χρήση του βιβλίου του **Theodor**.¹





1.

Έλεγχος της δομής
κατανομή τριώδων.

2.

Μορφή aedagus

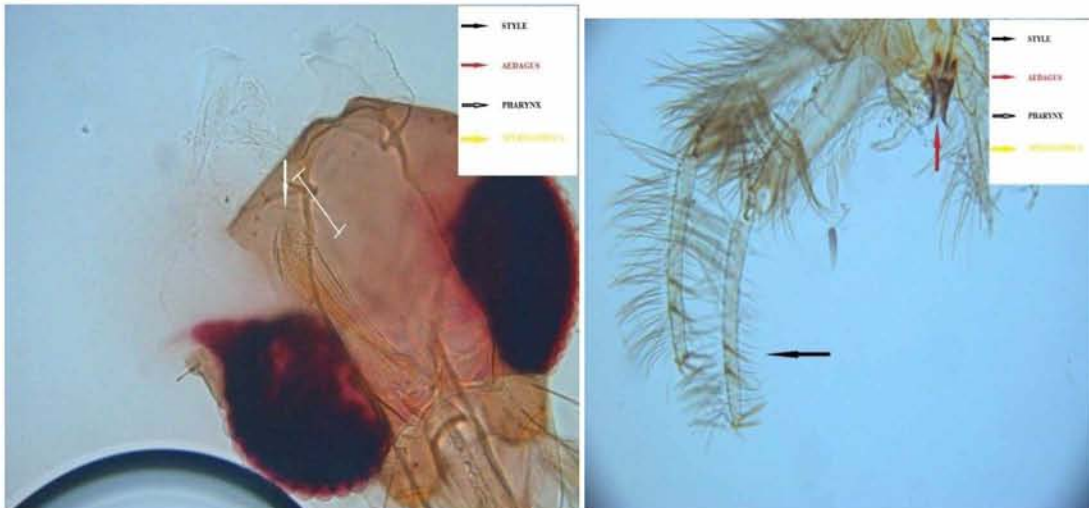
3.

Μορφή του φάρυγγα

- 1) Στο *Sergatomyia* παρατηρούνται 4 τριχίδια (μορφή νυχιών) στην κορυφή του οργάνου, ενώ στα *Phlebotomus* τα τριχίδια βρίσκονται σε όλο το μήκος.
- 2) Η μορφή του aedagus διαφέρει ανά είδος και γίνεται σύγκριση με το βιβλίο του Theodor.
- 3) Ο χαρακτηρισμός του φάρυγγα είναι παρόμοιος με των θηλυκών.

Γ.1.2.1 Στοιχεία μορφολογικής ταυτοποίησης των σκνιπών του γένους *Phlebotomus*.

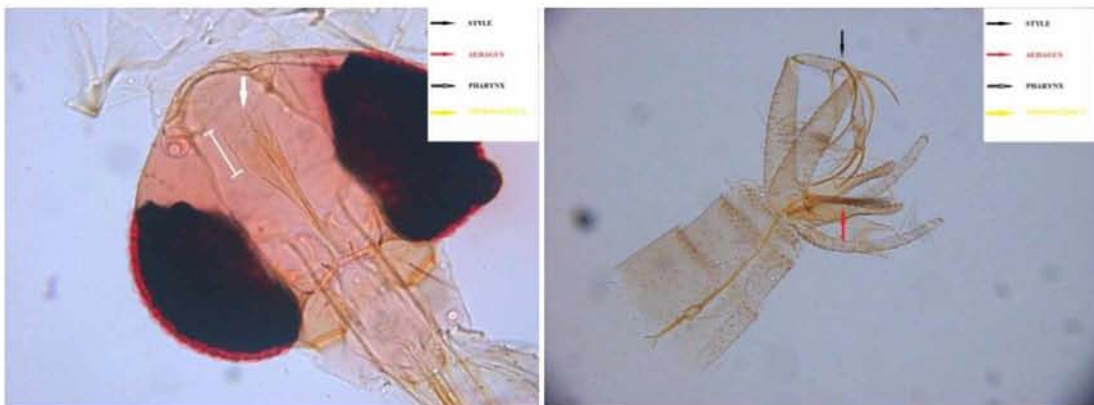
P. papatasi ♂



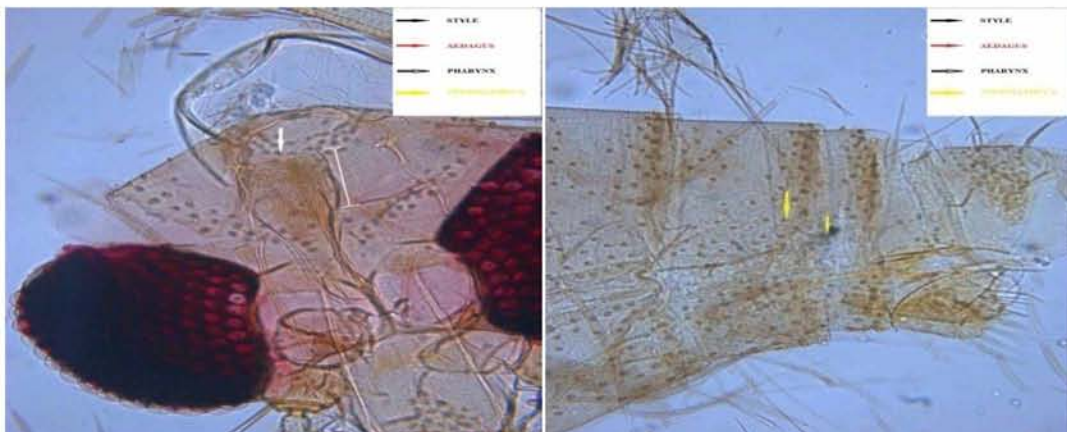
P. papatasi ♀



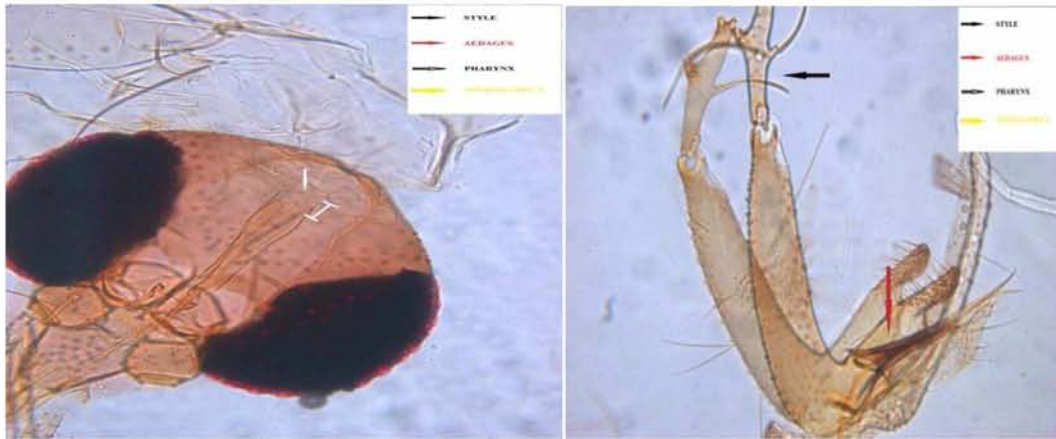
P. neglectus ♂



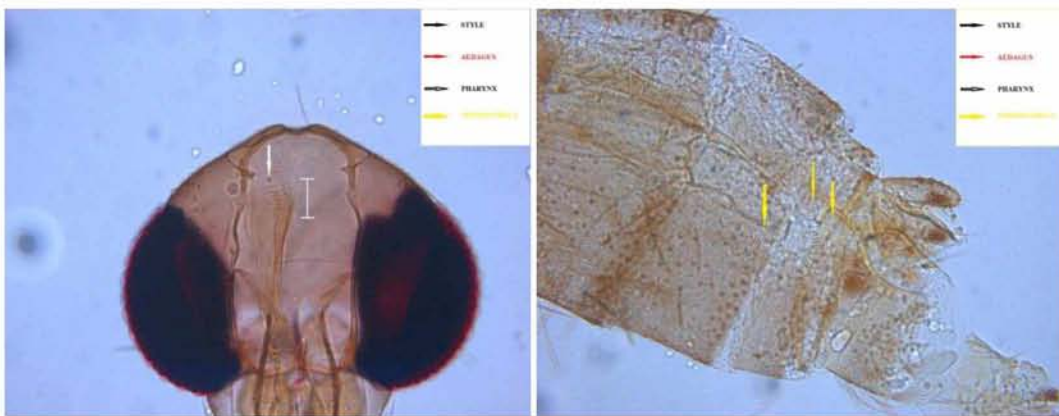
P. neglectus ♀



P. tobbi ♂



P. tobbi ♀



P. similis ♀



Η λήψη των φωτογραφιών οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την ταυτοποίηση (στοιχεία μορφολογικής ταυτοποίησης), καθώς και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν από τον ερευνητή Δρ. Σαράτση Αναστάσιο, ινστιτούτο κτηνιατρικών ερευνών ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ.

Στις παραπάνω εικόνες παρατίθενται τα στοιχεία κλειδιά της ταυτοποίησης που γίνεται για να χαρακτηριστούν τα είδη *P. papatasi*, *P. neglectus*, *P. tobbi*, *P. similis*.

Τα βέλη με διαφορετικά χρώματα χαρακτηρίζουν διαφορετικά σημεία που ελέγχονται (**μαύρο** -> **style**, αποτελεί μέρος του αναπαραγωγικού συστήματος του αρσενικού (βοηθά την διαδικασία της συνουσίας ενώ σε περιπτώσεις που το θηλυκό έχει είδη έρθει σε επαφή με κάποιο άλλο αρσενικό, αφαιρεί το σπέρμα του προηγούμενου, αυτό δεν συμβαίνει σε όλα τα είδη)* , γίνεται έλεγχος στο σχήμα και στον αριθμό των τριχών), (**κόκκινο** -> **aedagus**, αποτελεί το όργανο το οποίο εισχωρεί στο θηλυκό και εναποθέτει το σπερματικό υγρό, μελετάτε η δομή και το μέγεθος), (**λευκό** -> **Pharynx**, φάρυγγας, αυτό που υπάρχει σαν διάκριση, είναι οι σχηματισμοί των ζωνόσεων εντός του φάρυγγα, όπως π.χ. στο *P. tobbi* η ζώνη που είναι σχηματισμένη είναι μικρότερου μήκους σε σύγκριση με του *P. neglectus* αυτό αποτελεί το βασικό στοιχείο διάκρισης ανάμεσα στα θηλυκά άτομα αυτών των δύο ειδών.), (**κίτρινο** -> **spermatheca**, είναι η περιοχή όπου γίνεται η εναπόθεση του σπέρματος στα θηλυκά άτομα, οι σπερματοθήκες είναι δομές που μοιάζουν με σπιράλ, αποτελούνται από τα σωληνάρια (ducts) και τις περιοχές με την μορφή δακτυλιδιών, η διαφοροποίηση στις δομές αυτές είναι οι εξής:

- Λεία ή αδρά σωληνάρια
- Σωληνάρια που διακλαδίζονται ή ελεύθερα
- Σπερμαθήκες με μια μορφή που μοιάζει με κρόσσια και προεκβάλλει στην καταβολή των δακτυλιδιών (όπως παρατηρείτε στα είδη *P. tobbi* και *P. neglectus*) ή χωρίς αυτήν την προεκβολή,
- Διακύμανση στον αριθμό των δακτυλιδιών

Γ.2 Απομόνωση DNA

Μετά τον χαρακτηρισμό του είδους κάθε σκνίπας, τα θηλυκά που είχαν τοποθετηθεί στα erppendorf, ομογενοποιούνταν ανά 5 για κάθε είδος και παγίδα. Έτσι κάθε νέο erppendorf περιείχε 1-5 σκνίπες, ενός είδους και μίας παγίδας. Τα ομογενοποιημένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή DNA που πραγματοποιήθηκε με το DNA extraction kit (Qiagen blood and tissue DNA extraction kit) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Υλικά

- 180μl ATL Buffer
- 20μl proteinase K
- 200μl AL Buffer
- 200μl αιθανόλη (96-100%)
- 500μl AW1 Buffer
- 500μl AW2 Buffer
- 80μl AE Buffer

1. Σε eppendorf προστίθενται οι σκνίπες και με ένα έμβολο συνθλίβονται, έτσι δημιουργούμε ένα μίγμα ιστών.
2. Προσθήκη 180 μl ATL Buffer.
3. Προσθήκη 20μl proteinase K. Επώαση overnight στους 56°C.
4. Vortex για 15s. Προσθήκη 200 μl Buffer AL, ακολουθεί vortex. Προσθήκη 200 μl αιθανόλης.
5. Το δείγμα του βήματος 4 εναποτίθεται στην στήλη απομόνωσης DNeasy Mini spin και γίνεται φυγοκέντρηση >6000 xg (8000 rpm) για 1 λεπτό. Απορρίπτεται το υπερκείμενο καθώς και το μέρος συλλογής της στήλης tube 2ml.
6. Η στήλη προστίθεται σε νέο tube 2ml, προστίθενται 500μl AW1 Buffer και γίνεται φυγοκέντρηση >6000 xg(8000 rpm) για 1 λεπτό. Απορρίπτεται το υπερκείμενο καθώς και το μέρος συλλογής της στήλης tube 2ml.
7. Η στήλη προστίθεται σε νέο tube 2ml, προστίθενται 500μl AW2 Buffer και γίνεται φυγοκέντρηση >20000 xg(14000 rpm) για 3 λεπτά.
8. Η στήλη προστίθεται αυτή την φορά σε eppendorf 1,5ml, προστίθενται 80 μl AE buffer και μετά από 1 λεπτό γίνεται φυγοκέντρηση >6000 xg(8000 rpm) για 1 λεπτό.

Γ.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR).

Για να ελεγχθούν τα δείγματα αν είναι αρνητικά σε μόλυνση από το παράσιτο *Leishmania*, πραγματοποιήθηκε qPCR. Έγινε έλεγχος για το *L. infantum*, σαν στόχος το DNA του κινετοπλάστη με εκκινητές των LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') και LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-30). Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε 18S rRNA για να εντοπιστεί αν υπάρχει ευκαρυωτικό DNA, για να γίνει ποσοτικοποίηση και προσδιορισμός της ύπαρξης ή όχι του παρασίτου έγινε βαθμονόμηση με το γνωστές συγκεντρώσεις του DNA του *Leishmania*. Η πρότυπη καμπύλη σχεδιάστηκε με συγκεντρώσεις 0,005, 0,05, 0,5, 5, 50, 500 αντίγραφα του γονιδίου-στόχου ανά μl.

Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 25μl και χρησιμοποιούνται 5 μl δείγματος DNA.

- 12.5 μl, TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- 2.25 μl, primer forward leish-1 10 μM
- 2.25 μl, primer reverse leish-2 10 μM
- 0.125 μl, probe TaqMan μM
- 1.25 μl, 20xControl
- 1.625 μl ddH₂O
- 5 μl δείγματος

Συνθήκες

- Αρχικά 50.8°C για 2min, για 10min
- Εν συνεχεία 40 κύκλοι, 95.8°C για 15 sec, 60.8°C για 1 min

Γ.4 Προετοιμασία δειγμάτων για αλληλούχιση.

Γ.4.1 Ποσοτικοποίηση του DNA μέσω Qubit

Μέσω του πρωτοκόλλου του Qubit Invitrogen έγινε ο προσδιορισμός της ποσότητας του DNA.

Υλικά

- Χρωστική (φωτοευαίσθητη) 1μl
- Qubit buffer 199μl
- Standard (για την πρότυπη καμπύλη)
- Μέτρηση για 5μl δείγματος

Γ.4.2 Αραιώσεις

Για να υπάρχει ίδια συγκέντρωση DNA στα δείγματα στις επόμενες διαδικασίες, τα δείγματα υπέστησαν αραιώσεις με ddH₂O, ώστε να πάρουμε συγκέντρωση 0.1 ng/μl.

Γ.4.3 PCR ενίσχυση του 16S rRNA βακτηρίων και αρχαίων (1ο Βήμα)

Με την πρώτη αντίδραση PCR γίνεται στόχευση του 16S rRNA γονιδίου βακτηρίων και αρχαίων. Οι όγκοι και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στο Πίνακα 1. Στο Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη PCR.

Πίνακας 1. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη PCR για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA βακτηρίων και αρχαίων

Αντιδραστήριά με την αρχική συγκέντρωση	Όγκοι αντιδραστηρίων (μl) για αντίδραση 20 μl	Τελική Συγκέντρωση
Total vol	20μl	
H ₂ O	5,84μl	
PCR mix x2	10μl	x1
f primer (10 μM)	1μl	0.5 μM
r primer (10 μM)	1μl	0.5 μM
BSA (50 mg/ml)	0,16μl	0.4 μg/μl
template	2μl	0,1 ng/μl

Πίνακας 2. Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου βακτηρίων και αρχαίων (Βήμα 1)

Forward primer (515f)	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
Reverse primer (806r)	GGACTACNVGGGTWTCTAAT

Οι συνθήκες της πρώτης PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του 16S rRNA των βακτηρίων παρατίθενται παρακάτω:

- 1) Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 min
- 2) Αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec
- 3) Υβριδοποίηση στους 55°C για 30 sec
- 4) Επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec
- 5) Επανάληψη των βημάτων(2-4) για 28 κύκλους
- 6) Τελική επιμήκυνση 72°C για 10 min

Γ.4.4. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτική αγαρόζη.

Τα προϊόντα PCR που παραλήφθηκαν ελέγχθηκαν για την ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%.

Υλικά

- Ζυγός
- Κωνική φιάλη
- Συσκευή θέρμανσης
- Συσκευή (καλούπι) ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Συσκευή παροχής UV
- Συσκευή φωτογράφισης

Αντιδραστήρια

- TAE buffer 1%
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο BrEt
- Load buffer
- Lader

Γ.4.5 PCR-εσωτερικής ένθεσης για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου βακτηρίων και αρχαίων (Βήμα 2)

Ακολούθησε PCR εσωτερικής ένθεση όπου ως DNA εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το PCR προϊόν του αρχικού PCR (Βήμα 1). Ειδικότερα στην δεύτερη PCR χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος πρόσθιος εκκινητής ενώ ο οπίσθιος εκκινητής αποτελούνταν από την αλληλουχία του οπίσθιου εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε και στην πρώτη PCR καθώς και μια επιπρόσθετη αλληλουχία index που διευκολύνει την ανάμιξη των δειγμάτων προς αλληλούχιση διευκολύνοντας την βιοπληροφορική ανάλυση (Εικόνα 9). Η δεύτερη PCR πραγματοποιήθηκε με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες όπως και η πρώτη με τη διαφορά ότι αυτή την φορά χρησιμοποιήθηκαν 7 κύκλοι αντί για 28 όπως στο Βήμα 1. Στον Πίνακα 3 παρατίθενται ενδεικτικά οι αλληλουχίες 10 ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τέλος στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην δεύτερη PCR

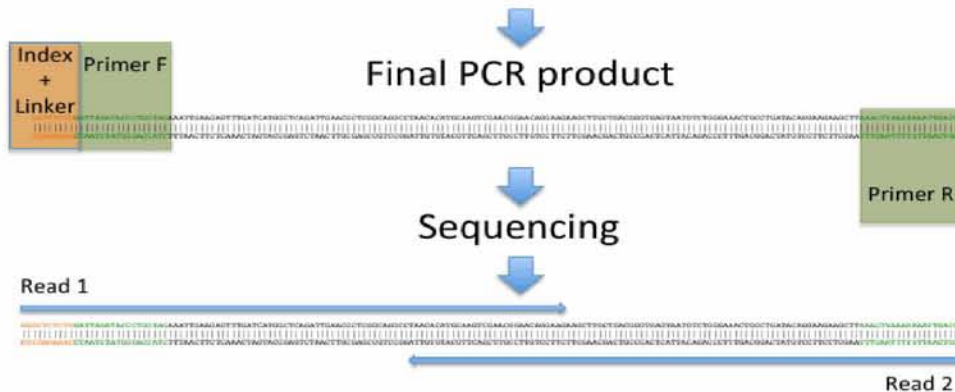
Πίνακας 3. Ενδεικτικές αλληλουχίες 10 ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR εσωτερικής ένθεσης

Sample index	linker	Πρόσθιος Εκκινητής (5' - 3')	Οπίσθιος εκκινητής (5' - 3')
<u>TTCTTCTTC</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTTCTTCGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTTCAAG</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTTCAAGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTTGTCA</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTTGTTCAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTTGAGT</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTTGAGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTTGGAC</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTTGGACGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTATAGG</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTATAGGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTATCTC</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTATCTTCGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTATGCA</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTATGCAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTAACAG</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTAACAGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
<u>TTCTAGTTG</u>	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	TTCTAGTTGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA

PCR on DNA extracts



PCR with indexed primers



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της χρήσης των σημασμένων εκκινήτων απο την 2η αντίδραση PCR έως την αλληλούχιση. Vasileiadis S. Protocol

Πίνακας 4. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην δεύτερη PCR για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA βακτηρίων και αρχαίων.

Αντιδραστήριά με την αρχική συγκέντρωση	Όγκοι αντιδραστηρίων (μl) για αντίδραση 20 μl	Τελική Συγκέντρωση
H2O	6μl	
PCR mix X2	10μl	X1
r primer (10 μM)	1μl	0.5 μM
f primer (10 μM)	1μl	0.5 μM
template	2μl	

Με την ολοκλήρωση της PCR αξιολογήθηκε αρχικά με ηλεκτροφόρηση αгарόζης η ενίσχυση του επιθυμητού PCR προϊόντος και ακολούθως προσδιορίστηκε η συγκέντρωση DNA σε κάθε PCR προϊόν μέσω Qubit. Ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων και ανάμιξη τους σε ισομοριακά μίγματα των 100 και ακολούθως στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Macrogen σε πλατφόρμα αλληλούχισης Illumina Hiseq Rapid Mode 2x250 bp paired-end.

Γ.5 Ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης.

Γ.5.1 Γενικά

Αφού έγινε η αλληλούχιση του DNA, τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε μια σειρά αναλύσεις ώστε να καθαριστούν από ανεπιθύμητες αλληλουχίες, να ταξινομηθούν και τέλος να γίνει στατιστική ανάλυση για να εξαχθούν τα αποτελέσματα. Η βιοπληροφορική – στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την πολύτιμη βοήθεια του Δρ. Βασιλειάδη Σωτηρίου.

Γ.5.2 Έλεγχος ποιότητας αλληλουχιών (καθαρισμός)

Ο καθαρισμός (ταυτοποίηση) έγινε βάσει των index primers, διατηρήθηκαν αλληλουχίες μόνο που αλληλεπικαλύπτονται, λόγω της εκατέρωθεν ανάγνωσης των συμπληρωματικών κλώνων όπως φαίνεται στην εικόνα(9) . Ορίζεται ένα κατώφλι αλληλοεπικάλυψης, η ταυτοποίηση γίνεται μέσω του PandaSeq.

Μετά την συναρμολόγηση. Μέσω της Phred, εντοπίζεται αν υπάρχει κάποια περιοχή με άγνωστη βάση . Αν ξεπερνά το κατώφλι που ορίζεται από μια προεπιλεγμένη τιμή, διατηρείται, διαφορετικά απορρίπτεται. Οι αλληλουχίες που προκύπτουν συγκρίνονται για διαφορές μικρότερες του ενός νουκλεοτιδίου ανά 100 βάσεις. Ο ορισμός αυτός καλείται χίμαιρα αναζήτησης και χρησιμοποιείται από το Vsearch του mothur.

Αφαίρεση χιμαιρών. Πραγματοποιείται βάσει της αφθονίας των αλληλουχιών στο δείγμα., σπάνιες αλληλουχίες αφαιρούνται. Αυτή η γενίκευση όμως μπορεί να οδηγήσει στην απόρριψη αλληλουχιών που είναι σπάνιες αλλά δεν είναι χίμαιρες. Για να αποφευχθεί η εσφαλμένη αυτή απομάκρυνση γίνεται έλεγχος των χιμαίρων που προκύπτουν ξεχωριστά και συγκρίνονται με βάσεις δεδομένων RDP.

Γ.5.3 Ορισμός των OTU μέσω MSA

Αφού γίνει ο καθαρισμός και προκύψουν οι αλληλουχίες που στοχεύσαμε (16SrRNA), στοιχίζονται με μια βάση δεδομένων, εν προκειμένου με την SILVA. Η διαδικασία είναι η εξής, ανά ζεύγη γίνεται υπολογισμός των αποστάσεων μεταξύ τους. Οι αποστάσεις που προκύπτουν υποβάλλονται σε έναν αλγόριθμο (orticlust), οι αλληλουχίες που διαχωρίζονται έχουν 0,03 απόσταση ανάμεσα τους, αυτή η απόσταση προσεγγίζει την έννοια του είδους, σε βακτηριακές κοινότητες. Αυτή η μεθοδολογία στοιχίσης και σύγκρισης προτιμάται όταν υπάρχει πλήθος αλληλουχιών (μικροβίωμα λ.χ). Έπειτα από τον υπολογισμό των αποστάσεων οι αλληλουχίες κατανέμονται βάσει τις αποστάσεις σε OTU (operational taxonomic unit, λειτουργική ταξινομική μονάδα).

Κοινοί μάρτυρες γονιδίων

Σε αλληλουχίσεις μελέτης κοινοτήτων (βακτηρίων, μυκήτων) γίνεται χρήση μιας «λίγκουα φράγκα» εντός της ομάδας που μελετάτε. Στα προκαρυωτικά όπως προαναφέρθηκε γίνεται χρήση του 16SrRNA, οι αλληλουχίες που προκύπτουν συγκρίνονται με βάσεις δεδομένων μέσω (BLAST, Naire, Bayesian, Silva, Greengenes) Εμείς κάναμε χρήση της SILVA και RDP.

Γ.6 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω γλώσσας προγραμματισμού R. Με βάση το matrix των OTUs που συναρμολογήθηκαν και πέρασαν τα τεστ ποιότητας εκτιμήθηκε το βάθος ανάλυσης μέσω υπολογισμού της παραμέτρου Good's²⁷. Ακολούθως προσδιορίστηκε η αποικιότητα των βακτηρίων και αρχαίων στα διάφορα δείγματα μέσω του υπολογισμού των τιμών των παρακάτω συντελεστών ποικιλότητας^{28,29,30}

- **Shannon**, ελέγχει τα είδη με τα λιγότερο κυρίαρχα OTUs, ανιχνεύει την σπανιότητα στα είδη.
- **Inverse Simpson**, η παράμετρος Simpson αποτελεί δείκτη των πιο κυρίαρχων OTUs ανάμεσα στα είδη, το αντίστροφο του μας δείχνει ποικιλότητα, το τελικό αποτέλεσμα μοιάζει θεωρητικά με αυτό του δείκτη Shannon, με τον δείκτη Shannon οι μετρήσεις γίνονται κάπως αφηρημένα ενώ το inverse **Simpson** παρουσιάζει βιολογική αξία .
- **Fisher a** , αποτελεί δείκτη της ποικιλίας εντός των ειδών σε κυρίαρχα OTUs.
- **Observed S, Chao 1, ACE** είναι δείκτες σχετικής αφθονίας OTUs (παρατηρούμενα OTUs/εκτιμώμενου αριθμού OTUs, ή ποικιλία μηδενικής τάξης. Οι δείκτες Chao1 και ACE μετρούν αφθονία με διαφορετικό τρόπο η εφαρμογή τους είναι συμπληρωματική μιας και προέκυψαν από την ίδια βάση(παρατηρούμενα OTUs/OTUs που δεν έχουν εντοπιστεί), το Chao1 βασίζεται στα OTUs που έχουν μικρότερη αφθονία και με αυτό τον τρόπο μελετάει τα πιθανά OTUs που δεν έχουν εντοπιστεί . Η ACE ορίζεται ως το άθροισμα των πιθανοτήτων εμφάνισης των παρατηρούμενων OTUs, η ACE χωρίζει τα με μια τιμή και πάνω τα άφθονα και με αυτή την τιμή και κάτω τα σπάνια OTUs. και εδώ είναι απαραίτητα τα OTUs μικρής αφθονίας για να προκύψουν αυτά που είναι άγνωστα.

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης πολυμεταβλητότητας όπως Principal Component Analysis και Canonical Correspondence Analysis καθώς και ανάλογα μη παραμετρικά τεστ όπως Non-metric multidimensional Scaling (NMDS) ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή διαφοροποίηση των τεσσάρων ειδών *Phlebotomus* που μελετήθηκαν ως προς την σύσταση της συμβιωτικής κοινότητας των βακτηρίων και αρχαίων.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ.1 Περιεχόμενο παγίδων, αποτελέσματα ταυτοποίησης.

Στην περιοχή της Λέρου τοποθετήθηκαν συνολικά 15 παγίδες στις οποίες παγιδεύτηκαν συνολικά 620 σκνίπες οι οποίες κατανεμήθηκαν σε γένη και είδη όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Η κατανομή του συνόλου των σκνιπών που παγιδεύτηκαν στις 15 παγίδες. Ταυτοποιήθηκαν σκνίπες που ανήκουν σε 2 γένη, αυτά των *Phlebotomus* και *Sergatomyia*. Εντοπίστηκαν σκνίπες που έχουν αναφερθεί στην Ελλάδα, όπως τα είδη *P. papatasi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. similis*, *P. simici*, *P. perfiliewi*, *Sergatomyia minuta*, *S. dentata* και επιπλέον κάποιες σκνίπες δεν ήταν εφικτό να ταυτοποιηθούν λόγω κακής ποιότητας δειγμάτων.

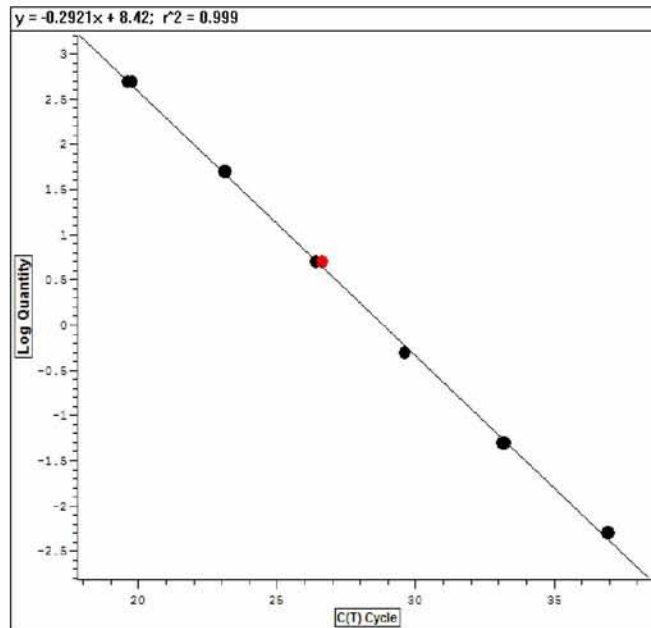
<i>P. papatasi</i>	<i>P. tobbi</i>	<i>P. neglectus</i>	<i>P. similis</i>	<i>P. simici</i>	<i>P. perfiliewi</i>	<i>S. minuta</i>	<i>S. dentata</i>	Αδύνατη η ταυτοποίηση
371	78	109	20	3	12	21	15	24

Από τις σκνίπες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τις περαιτέρω αναλύσεις τα θηλυκά άτομα τεσσάρων ειδών, *P. papatasi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, και *P. similis*. Απο τα είδη αυτά προέκυψαν και έγινε εξαγωγή DNA στα εξής δείγματα:

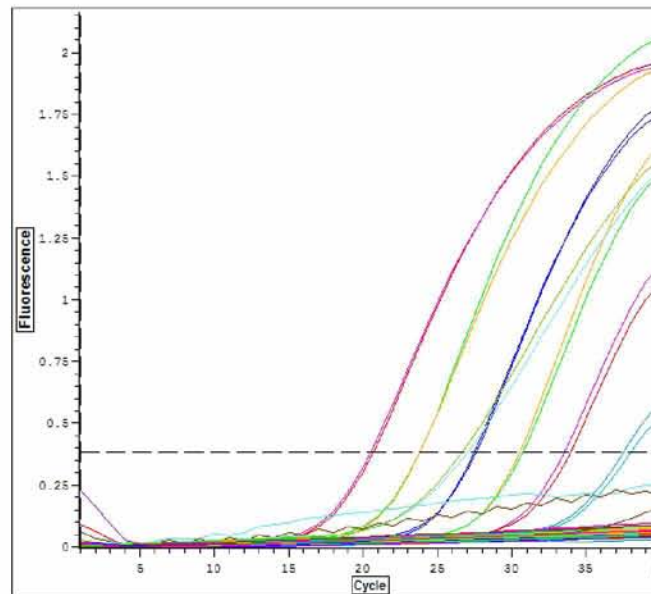
- *P. papatasi* 40
- *P. similis* 11
- *P. neglectus* 11
- *P. tobbi* 16

Δ.2 Έλεγχος για τον εντοπισμό παρασίτου *Leishmania*

Τα δείγματα πριν χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση του μικροβιώματος ελέγχθηκαν μέσω q-PCR για την παρουσία *Leishmania*. Η πρότυπη καμπύλη έγινε με γνωστές συγκεντρώσεις πλασμιδίων που περιείχαν ως ένθεμα το γονίδιο-στόχο του *L. infantum* (Διάγραμμα 1). Όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά για παρουσία *Leishmania*, αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι στο διάστημα των 40 κύκλων έδωσαν μηδενικό σήμα et κανένα δείγμα δεν ξεπέρασε το κατώφλι. Όλες οι αντιδράσεις έδωσαν σήμα του θετικού μάρτυρα, των standards, τα αρνητικά control ήταν όλα με μηδενικό σήμα. Λόγω της μη ύπαρξης σήματος δεν υπάρχει δυνατότητα αποτύπωσης των αποτελεσμάτων σε διάγραμμα ποσοτικοποίησης. Παρακάτω παρατίθεται η δομή των διαγραμμάτων που αποτυπώνει τα δείγματα που περνούν το κατώφλι (θετικός μάρτυρας, πρότυπη καμπύλη) (Διάγραμμα 2).



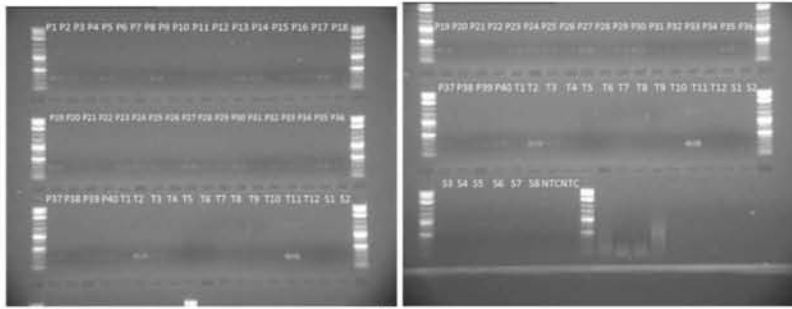
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη της qPCR.



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα που δείχνει το πώς διαμορφώνονται ο θετικός μάρτυρας και τα πρότυπα δείγματα, FAM.

Δ.3 Αποτελέσματα (έλεγχος) της προετοιμασίας για αλληλούχιση.

Αμέσως μετά το πέρας της πρώτης αντίδρασης PCR τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1%. Μετά απο ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προέκυψε ότι όλα τα δείγματα ενισχύθηκαν καθώς δίνουν ζώνη του επιθυμητού μεγέθους (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της 1^{ης} αντίδρασης PCR.

Ακολούθησε PCR εσωτερικής ένθεσης για 7 κύκλους και ακολούθως τα δείγματα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπου διαπιστώθηκε ότι ενισχύθηκε το επιθυμητού μεγέθους προϊόν (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της 2ης αντίδρασης PCR (ένθεσης).

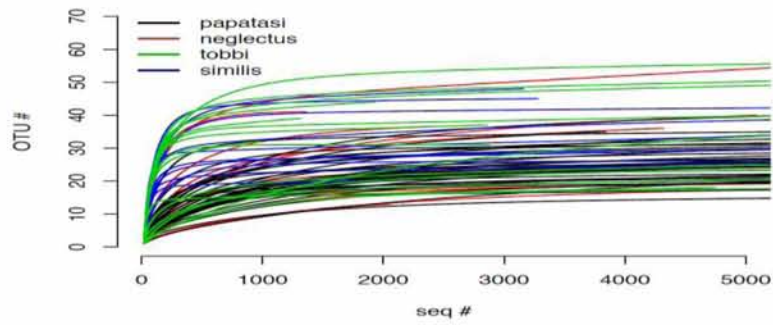
Δ.4. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης.

Πρώτο βήμα ήταν ο καθαρισμός, ακολούθησε η στοιχισή των αλληλουχιών και ο προσδιορισμός των OTUsτα οποία προέκυψαν από την βάση δεδομένων SILVA. Τα OTUsπου προέκυψαν δεν μπορούν να αποτελέσουν διακριτά δεδομένα για τον λόγο αυτό ήταν αναγκαία η περαιτέρω στατιστική ανάλυση. Για την ανάλυση διατηρήθηκαν τα OTUsτα οποία παρουσιάζουν συχνότητα πάνω από 0,001%, προέκυψαν 204 OTUs καθώς και OTUs τα οποία έχουν μια μεγαλύτερη σπανιότητα και είναι δύσκολος ο χαρακτηρισμός τους.

Δ.5 Στατιστική ανάλυση

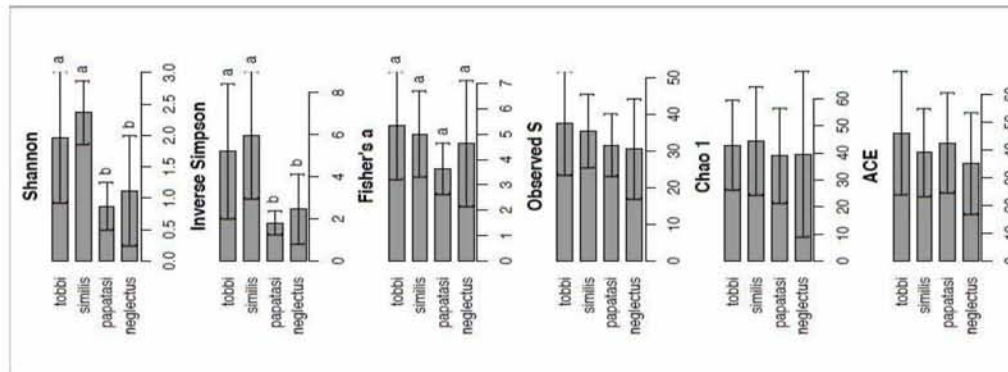
Δ.5.1 Βάθος αλληλούχισης

Για την εξακρίβωση εάν το βάθος αλληλούχισης που επιλέχθηκε για τα διάφορα δείγματα προσέφερε επαρκή κάλυψη της ποικιλότητας των βακτηρίων και αρχαίων κατασκευάστηκαν rarefaction curves (Διάγραμμα 3). Σε όλες τις περιπτώσεις οι συγκεκριμένες καμπύλες έφτασαν σε ασύμπτωτο, πράγμα που καταδεικνύει ότι το βάθος αλληλούχισης ανά δείγμα κάλυψε επαρκώς την ποικιλότητα βακτηρίων και αρχαίων.



Διάγραμμα 3: Rarefaction curves για όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν

Δ.5.2 Ανάλυση α- ποικιλότητας βακτηρίων και αρχαίων



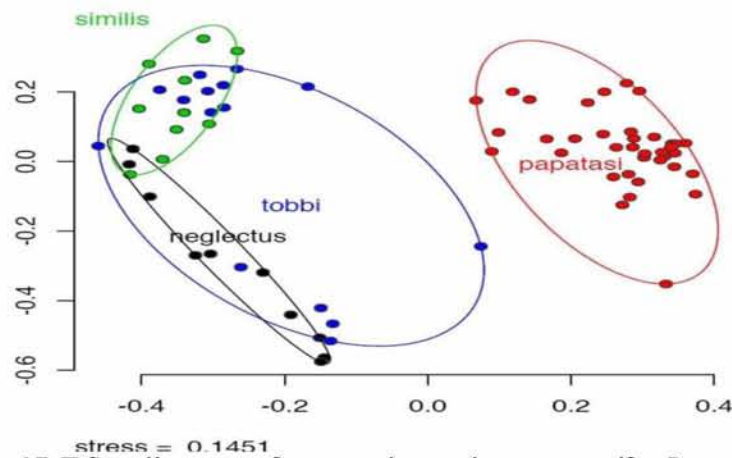
Διάγραμμα 4. Οι τιμές των διαφόρων συντελεστών α-ποικιλότητας των βακτηρίων Shannon, Inverse Simpson, Fisher's α , Observed S, Chao 1, ACE, στα τέσσερα είδη *Phlebotomus* που μελετήθηκαν.

Από την παράμετρο **Shannon** παρατηρούμε ότι τα είδη *P. similis* και *P. tobbi* εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ποικιλότητα σε σπάνια μέλη της βακτηριακής κοινότητας σε σχέση με τα άλλα δύο είδη (Διάγραμμα 4). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για το δείκτη **inverse Simpson** όπου τα είδη *P. similis* και *P. tobbi* εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ποικιλότητα σε μη κυρίαρχα OTUs σε σχέση με τα άλλα δύο είδη. Αντίθετα σύμφωνα με το δείκτη **Fisher alpha** τα διάφορα είδη δεν διαφέρουν σημαντικά ως προς την ποικιλότητα των κυριάρχων OTUs. Τέλος από τους δείκτες **Observed S**, **Chao1**, **ACE** δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την αφθονία των ειδών.

Δ.5.3 Ανάλυση β-ποικιλότητας βακτηρίων και αρχαίων

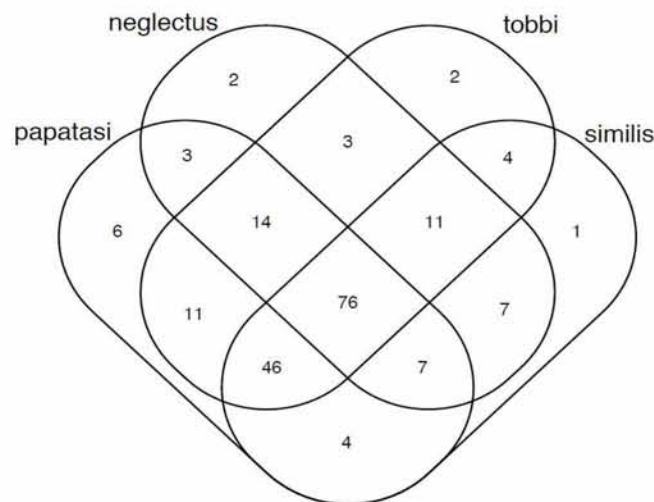
Περαιτέρω αναλύσεις εστίασαν στην διαφοροποίηση της σύστασης της βακτηριακής κοινότητας στα διάφορα είδη. Εφαρμόζοντας ανάλυση NMDS διαπιστώσαμε ότι το σύνολο των δειγμάτων του είδους των *P. papatasi* ομαδοποιείται ξεχωριστά από τα άλλα 3 είδη (Διάγραμμα 5). Από την άλλη μεριά τα δείγματα του *P. tobbi* εμφανίζουν μεγαλύτερη

διασπορά και ομαδοποιούνται με τα δείγματα από τα είδη *P. neglectus*, *P. similis*. Τέλος τα δύο τελευταία είδη φαίνονται δημιουργούν συμπαγείς ομάδες που διαχωρίζονται μεταξύ τους.



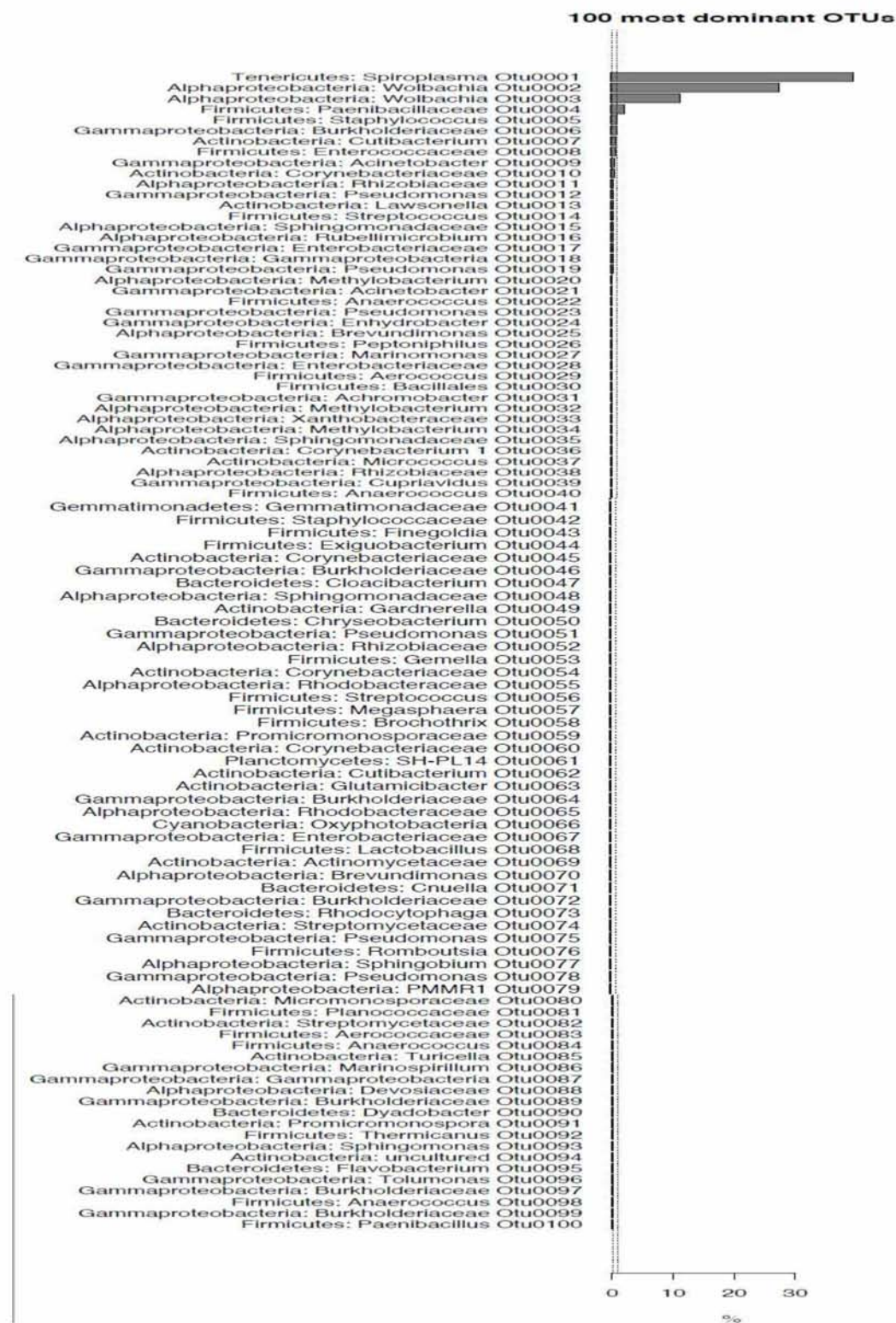
Διάγραμμα 5. NMSD ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας στα είδη *P. papatasi*, *P. tobbi*, *P. neglectus* και *P. similis*. Οι ελλείψεις περιλαμβάνουν το σύνολο των δειγμάτων ανά είδος.

Περαιτέρω αναλύσεις εστίασαν στον εντοπισμό του αριθμού των βακτηριακών OTUs που μοιράζονται όλα τα είδη *Phlebotomus* και ίσως να αποτελούν το core microbiome. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε Διάγραμμα Venn (Διάγραμμα 6) όπου καταγράφηκε ότι τα κοινά OTUs που βρίσκονται σε όλα τα είδη είναι 76. Αντίθετα τα μοναδικά OTUs για κάθε είδος είναι 6 για το *P. papatasi*, 1 για το *P. similis*, 2 για το *P. tobbi*, 2 για το *P. neglectus*.



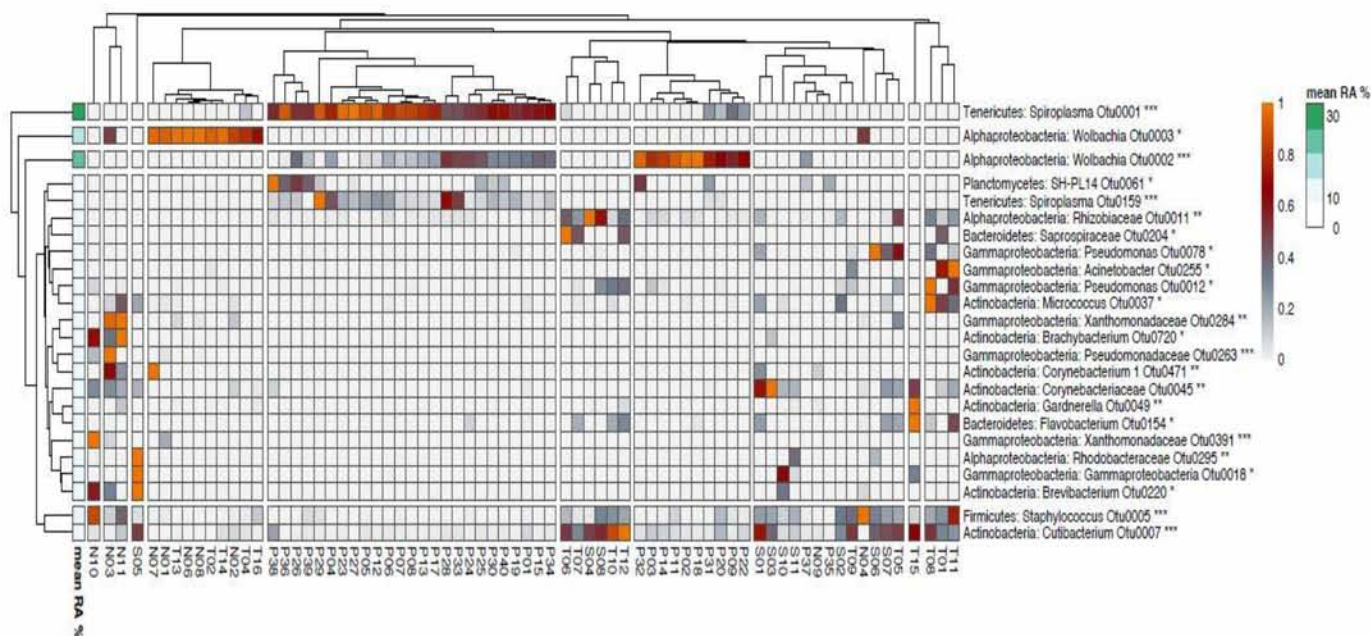
Διάγραμμα 6. Διάγραμμα Venn για την κατανομή του συνόλου των βακτηριακών OTUs που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα μεταξύ των τεσσάρων ειδών *Phlebotomus*.

Στο (Διάγραμμα 7) παρουσιάζονται με σειρά φθίνουσας συχνότητας τα πιο συχνά απαντούμενα OTUs στην ανάλυση μας. Όπως προκύπτει από την ανάλυση τα OTUs 1, 2, 3 και 4 αποτελούν τα ποιά συχνά απαντούμενα OTUs και ανήκουν στα γένη *Spiroplasma*, *Wolbachia* (2 και 3) και στην οικογένεια *Paenibacillaceae* αντίστοιχα.



Διάγραμμα 7. Τα 100 πιο κυρίαρχα βακτηριακά OTUs που βρέθηκαν στα δείγματα σκνιπών.

Με βάση ανάλυση παραλλακτικότητας επιλέχθηκαν βακτηριακά OTUs των οποίων η αφθονία φαίνεται να παραλλάσει σημαντικά μεταξύ ειδών και μπορούν να χαρακτηριστούν ως αντιπροσωπευτικά συγκεκριμένων ειδών *Phlebotomus* (Διάγραμμα 8). Ως τέτοια αναγνωρίστηκαν τα OTUs 1, 2, 3, 5, 7, 11, 12, 18, 37, 45, 49, 61, 78, 154, 159, 204, 220, 255, 263, 284, 295, 391, 471 και 720.



Διάγραμμα 8. Heatmap ανάλυση όπου εντοπίζονται τα OTUs που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με συγκεκριμένα είδη *Phlebotomus* (το επίπεδο σημαντικότητας της συσχέτισης καταδεικνύεται με αστερίσκους ως εξής * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

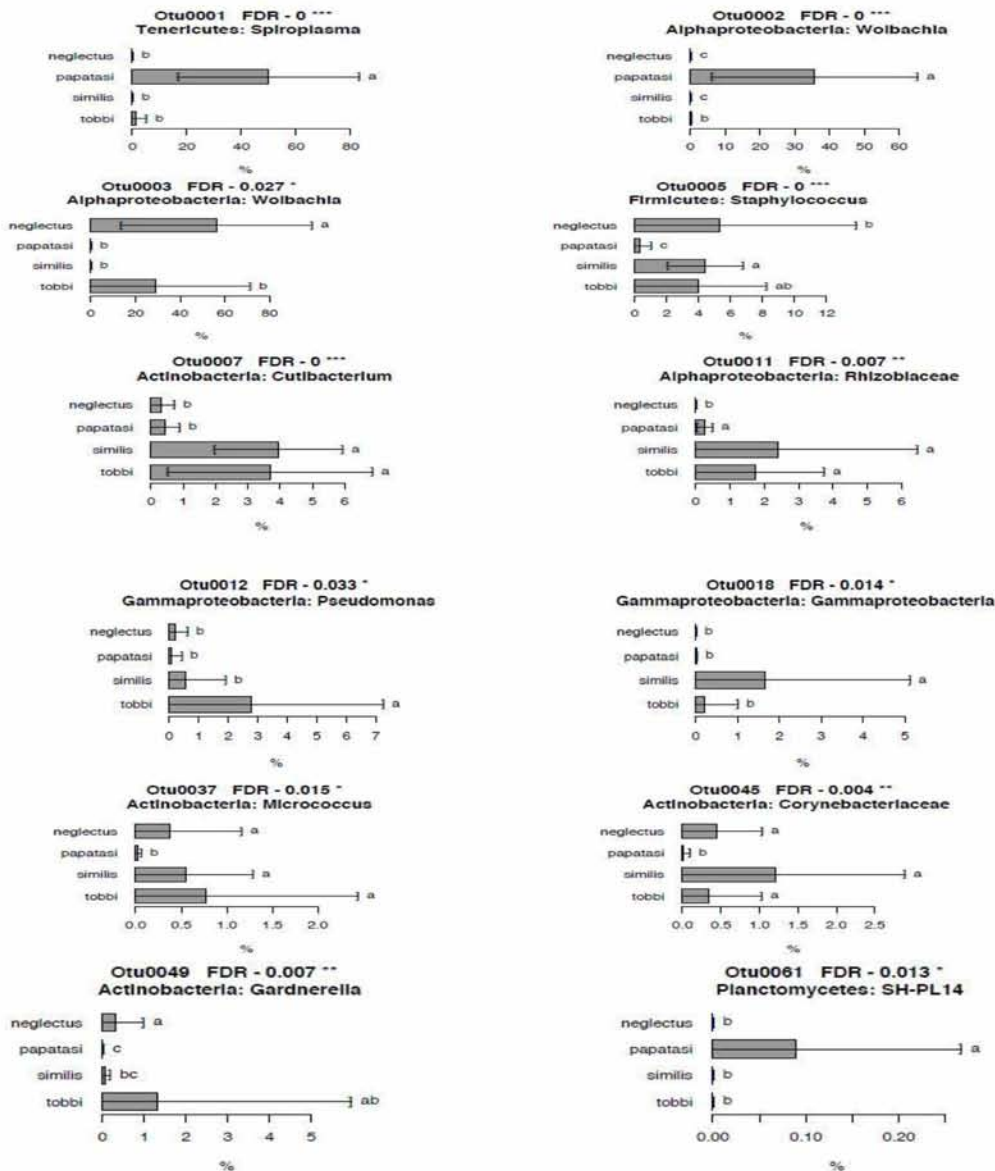
Με βάση τα παραπάνω αναλύσαμε περαιτέρω την σχετική αφθονία των διαφόρων OTUs στα 4 είδη σκνιπών που μελετήθηκαν. Έτσι τα OTUs 1, 2, 61 και 159 που ανήκουν στα γένη *Spiroplasma*, *Wolbachia*, στην τάξη *Planctomycetes* και στο γένος *Spiroplasma* αντίστοιχα εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη σχετική αφθονία στο είδος *P. paratasi* (Διάγραμμα 9).

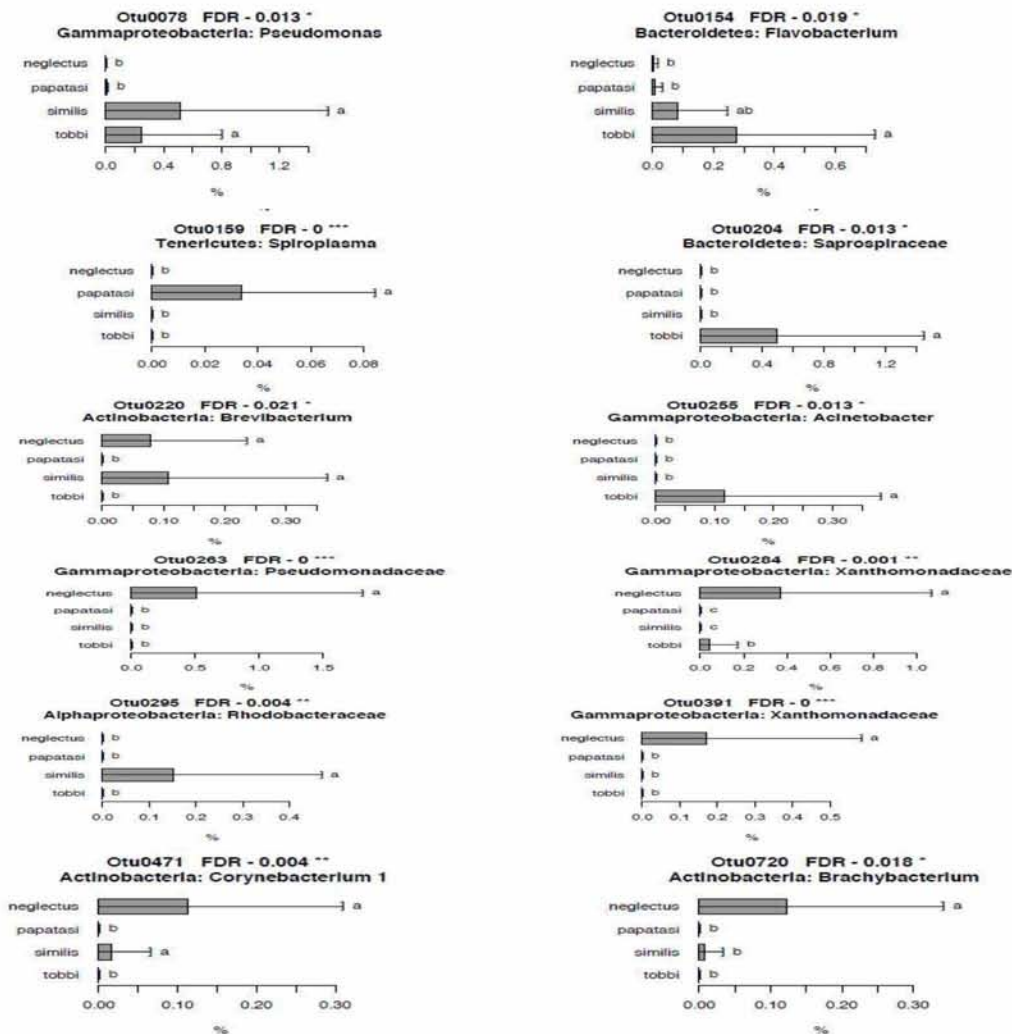
Τα OTUs 3, 263, 264, 391 και 720 που ανήκουν στα γένη *Wolbachia*, στις οικογένειες *Pseudomonadaceae* και *Xanthomonadaceae* (284 και 391) και στο γένος *Brachybacterium* αντίστοιχα εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη σχετική αφθονία στο είδος *P. neglectus* σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη.

Τα OTUs 18 και 295 που ανήκουν στα γ-*proteobacteria* και στην οικογένεια *Rhodobacteriaceae* αντίστοιχα εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη σχετική αφθονία στο είδος *P. similis* σε σχέση με τα υπόλοιπα τέσσερα είδη.

Τα OTUs 12, 154, 204 και 255 που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Flavobacterium* οικογένεια *Saprospiraceae* και γένος *Acinetobacter* αντίστοιχα εμφανίζουν σημαντική υψηλότερη σχετική αφθονία στο είδος *P. tobbi* σε σχέση με τα υπόλοιπα τέσσερα είδη.

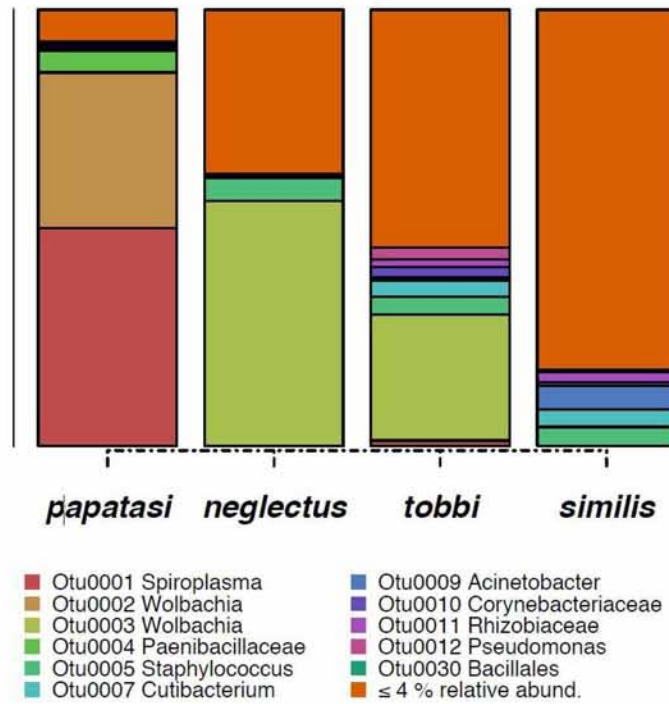
Πέραν των παραπάνω εντοπίστηκαν και OTUs εμφανίζουν υψηλή σχετική αφθονία σε 2 ή 3 συγκεκριμένα είδη ή ιδιαίτερα χαμηλή αφθονία σε ένα συγκεκριμένο είδος. Για παράδειγμα τα OTU 5, 37 και 45 που ανήκουν στα γένη *Staphylococcus*, *Micrococcus* και στην οικογένεια *Corynebacteriaceae* εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη αφθονία στο είδος *P. papatasi* σε σχέση με τα υπόλοιπα 3 είδη που μελετήθηκαν. Τα OTUs 7, 11 και 78 που ανήκουν στα γένη *Cutlbacterium*, στην οικογένεια *Rhizobiaceae* και στο γένος *Pseudomonas* εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη σχετική αφθονία στα είδη *P. similis* και *P. neglectus* σε σχέση με τα άλλα δύο είδη. Τέλος τα OTUs 220 και 471 που ανήκουν στα *Actinobacteria* και ειδικότερα στα γένη *Brevibacterium* και *Corynebacterium* αντίστοιχα, εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη αφθονία στα είδη *P. neglectus* και *P. similis* σε σχέση με τα δύο άλλα είδη.





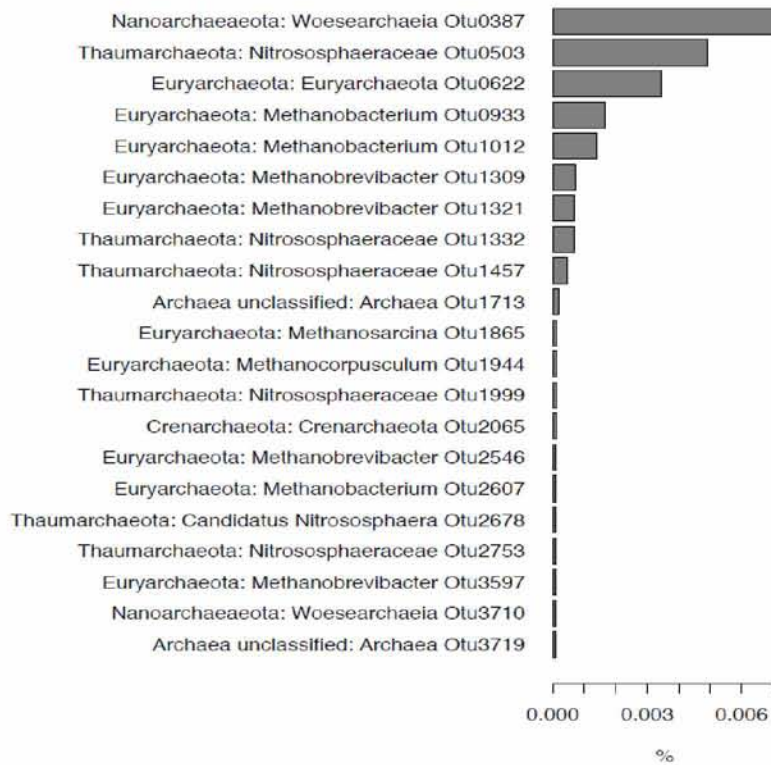
Διάγραμμα 9. Κατανομή της σχετικής αφθονίας αντιπροσωπευτικών OTUs στα διάφορα είδη *Phlebotomus* που μελετήθηκαν.

Τέλος στο Διάγραμμα 10 παρουσιάζεται με την μορφή stacked bar chart η σχετική αφθονία των κυριότερων βακτηριακών OTUs (σχετική αφθονία >4%). Όπως φαίνεται στη βακτηριακή κοινότητα στο *P. papatasi* κυριαρχούν τα OTUs 1 (50-55%), 2 (30-35%) και 4 (5%) που ανήκουν στα γένη *Spiroplasma*, *Wolbachia* και στην οικογένεια *Paenibacillaceae* αντίστοιχα. Η βακτηριακή κοινότητα του είδους *P. neglectus* κυριαρχείται από το OTU 0003 *Wolbachia* σε ποσοστό 55-60% και το OTU 0005 *Staphylococcus* σε ποσοστό εμφάνισης 5-7%. Η βακτηριακή κοινότητα του είδους *P. tobbi* παρουσίασε μεγαλύτερη ποικιλότητα με μόνο το OTU 0003 *Wolbachia* να εμφανίζει σχετική αφθονία >20%. Τέλος στο *P. similis* παρατηρήθηκε, σύμφωνα και με την ανάλυση της αποικιλότητας, ένας μεγάλος αριθμός OTUs με αφθονία <4% με εξαιρέσεις τα OTU0005 *Staphylococcus* (5%), OTU0007 (*Citibacterium*) και OTU 0009 (*Acenitobacter*) με παρόμοια ποσοστά.



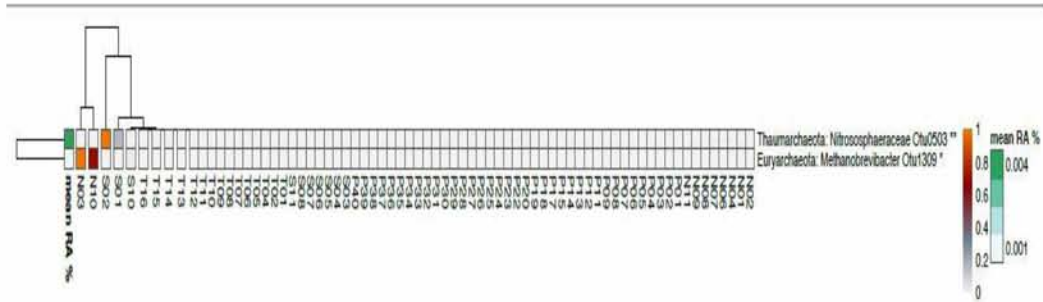
Διάγραμμα 10. Βαρplot ποσοστών κατανομής OTUs ανα είδος σκνίπας.

Δ.5.4. Ανάλυση της ποικιλότητας των αρχαίων στα διάφορα είδη σκνιπών most dominant archaeal OTUs

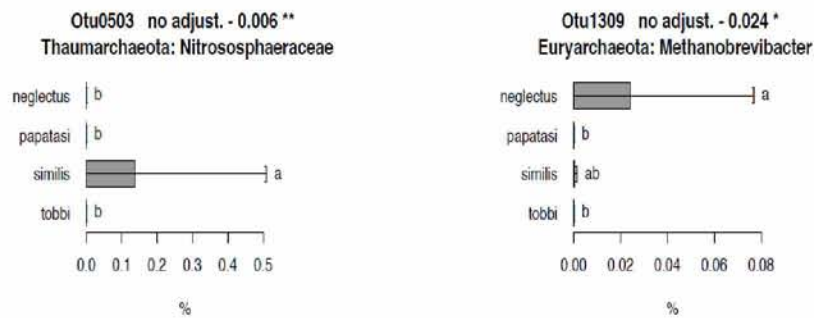


Διάγραμμα 11. Τα κυρίαρχα OTUs που ανήκουν σε αρχαία στο σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκαν

Συνολικά καταγράφηκε μια πολύ φτωχή ποικιλότητα αρχαίων στα τέσσερα είδη σκνιπών που μελετήθηκαν με τα λίγα κυρίαρχα να ανήκουν στα *Nanoarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*. (Διάγραμμα 11). Τα δύο μοναδικά OTUs που φαίνεται να εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με συγκεκριμένα είδη *Phlebotomus* ήταν τα OTUs 503 και 1309 που ανήκουν στα *Thaumarchaeota* (*Nitrososphaeraceae*) και *Euryarchaeota* (*Methanobrevibacter*) αντίστοιχα που εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη αφθονία στα *P. similis* και *P. neglectus* αντίστοιχα σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη (Διάγραμμα 12 και 13).



Διάγραμμα 12. Heatmap ανάλυση που αναδεικνύει OTUs που σχετίζονται σημαντικά με συγκεκριμένα είδη *Phlebotomus*.



Διάγραμμα 13. Κατανομή της σχετικής αφθονίας των OTUs 503 και 1309 στα διάφορα είδη *Phlebotomus*

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η λείσμανίωση είναι ενδημική ασθένεια με επιβαρυνμένες επιπτώσεις και υψηλό βαθμό θνησιμότητας. Τα τελευταία χρόνια λόγω των πολεμικών συρράξεων στην μέση ανατολή εξαιτίας των οποίων κατέρρευσε το σύστημα υγείας και αυξήθηκαν τα κρούσματα λείσμανίωσης, το παράσιτο τείνει να παρουσιάζει διασπορά κυρίως κατά μήκος των μεταναστευτικών ροών³¹. Η Ελλάδα αποτελεί κομβικό σημείο διέλευσης λόγω της γεωγραφικής της θέσης, έτσι εκατομμύρια πρόσφυγες πολέμου περνούν από τα ελληνικά νησιά και την ηπειρωτική χώρα. Έτσι φαίνεται ότι σήμερα υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την μελέτη των μηχανισμών μετάδοσης και ανάπτυξης της λείσμανίωσης, έτσι ώστε να είμαστε σε θέση να αντιμετωπίσουμε εξάρσεις που παίρνουν χαρακτήρα πανδημίας. Οι φορείς των παρασίτων είναι οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* στον παλαιό κόσμο. Στην Ελλάδα το παράσιτο που έχει μεγαλύτερη ιατρική (κυρίως κτηνιατρική) σημασία είναι το *L. infantum*. Πλήθος προσεγγίσεων καλύπτουν σήμερα την μελέτη της σχέσης συμβίωσης και μετάδοσης του παρασίτου. Στο επίπεδο της ανάπτυξης και διάδοσης οι μελέτες έχουν κύρια συνιστώσα την μελέτη του χώρου ανάπτυξης. Ο χώρος ανάπτυξης του παρασίτου είναι το πεπτικό σύστημα του φορέα και τα ουδετερόφιλα των θηλαστικών. Η μελέτη της ανάπτυξης στον φορέα έχει σαν αντικείμενο τις σχέσεις που αναπτύσσονται στο επίπεδο επαφής παρασίτου-φορέα. Το πεπτικό σύστημα περιλαμβάνει βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Αβιοτικοί είναι οι εκκρινόμενες ουσίες, το ΡΗ, η συγκέντρωση των θρεπτικών και οι βιοτικοί περιλαμβάνουν τα κύτταρα που απαρτίζουν το πεπτικό σύστημα, τις πρωτεΐνες των κυττάρων του φορέα και επιπλέον την συνιστώσα του μικροβιώματος του φορέα. Το μικροβίωμα είναι το σύνολο των μικροοργανισμών (βακτήρια, αρχαία, μύκητες) που καταλαμβάνουν κοινό ενδιαίτημα, συγκεκριμένα το ενδιαίτημα που καταλαμβάνουν είναι το πεπτικό σύστημα της σκνίπας. Οι σχέσεις μεταξύ μικροβιώματος φορέα και μικροβιώματος παρασίτου ή ακόμη καλύτερα μικροβιώματος-φορέα-παρασίτου είναι σχεδόν άγνωστες, λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας και του μεγάλου όγκου πληροφοριών. Τροχοπέδη της μελέτης του μικροβιώματος τις προηγούμενες δεκαετίες αποτέλεσε η αδυναμία καλλιέργειας πολλών μικροοργανισμών σε συμβατικά (γνωστά) θρεπτικά υλικά. Τα τελευταία χρόνια χάριν της προόδου των τεχνολογιών αλληλούχισης και της βιοπληροφορικής, υπάρχει δυνατότητα μελέτης αρκετά μεγάλου ποσοστού των μικροοργανισμών, έτσι είναι πιο εύκολο και παράλληλα αναγκαίο να αποσαφηνίζονται όσων το δυνατόν οι συνιστώσες του μικροβιώματος.

Στο πλαίσιο της μελέτης του μικροβιώματος των σκνιπών, οι μέχρι τώρα εργασίες στοχεύουν στην διερεύνηση της σχέσεις που έχουν τα παράσιτα με την μικροβιακή συνιστώσα. Εμείς χρησιμοποιήσαμε σκνίπες που διαπιστωμένα είναι αρνητικές στην ύπαρξη παρασίτου, ώστε να δημιουργηθούν δεδομένα για το μικροβιακό υπόβαθρο της εντερικής μικροχλωρίδας. Στο *P. papatasi* το οποίο έχει μελετηθεί εκτεταμένα το μικροβίωμα του και άλλα 3 είδη που παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα στον Ελλαδικό χώρο και δεν υπάρχουν δεδομένα για το μικροβίωμα τους από προηγούμενες μελέτες.

Γενικότερα σε όλα τα είδη καταγράφηκε μια πιο πλούσια βακτηριακή κοινότητα σε σχέση με την κοινότητα των Αρχαίων που ήταν φτωχή σε ποικιλότητα. Για τον λόγο αυτό εστίασαμε περαιτέρω στη μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας. Μια πρώτη ανάλυση της σύνθεσης της βακτηριακής κοινότητας έδειξε ξεκάθαρο διαχωρισμό της βακτηριακής μικροχλωρίδας του είδους *P. papatasi* σε σχέση με τα υπόλοιπα 3 είδη εκ των οποίων τα *P. neglectus* και *P. similis* επίσης διαχωρίζονται μεταξύ τους ενώ το *P. tobbi* εμφανίζει την μεγαλύτερη διασπορά

και φαίνεται ότι η βακτηριακή κοινότητα του εντέρου αυτού του είδους εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά τόσο με το είδος *P. neglectus* όσο και με το είδος *P. similis*.

Σχετικά με την ποικιλότητα της βακτηριακής χλωρίδας τα είδη *P. tobbi* και *P. similis* φαίνεται να παρουσιάζουν υψηλότερη ποικιλότητα σε OTUs σε σχέση με τα άλλα 2 είδη, με την ποικιλότητα αυτή να προέρχεται από μη κυρίαρχα OTUs. Ειδικότερα στο *P. similis* το οποίο παρουσιάζει ενδημικό χαρακτήρα για την λεκάνη της μεσογείου, και αποτελεί φορέα του *L. tropica*, το μεγαλύτερο μέρος των OTUs, κοντά στο 80%, αποτελείται από OTUs που δεν ξεπερνούν το 4% σε σχετική αφθονία. Το *P. similis* είναι ένα είδος σκνίπας το οποίο στον Ελλαδικό χώρο έχει ιατρικό ενδιαφέρον. Μερικά από τα κυρίαρχα βακτηριακά OTUs αντιστοιχούν σε γένη βακτηρίων που περιλαμβάνουν στελέχη με παθογόνο δράση στον άνθρωπο. Τέτοια είναι το *Staphylococcus* OTU 0005 τα οποία έχουν βρεθεί και στο *P. papatasi* και άλλα είδη σκνίπας^{4,32} και είναι γνωστό ότι επάγουν την ωτοκία στο *P. papatasi*³³, το OTU 0010 *Corynebacteriaceae* και το OTU 0007 *Cutibacterium* τα οποία είναι εντερικά βακτήρια. Επιπλέον εμφανίζονται μεταξύ των κυρίαρχων τα OTUs 9 και 11 που ανήκουν στο γένος *Acinetobacter* και στην οικογένεια *Rhizobiaceae* αντίστοιχα. Βακτήρια του γένους *Acinetobacter* περιλαμβάνουν είδη που έχουν χαρακτηριστεί ως δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα, και είναι βακτήρια εδάφους³⁴ όπως και βακτήρια της οικογένειας *Rhizobiaceae*, τα οποία είναι βακτήρια που εμφανίζονται στην ριζόσφαιρα των φυτών. Τέλος στην εντερική μικροχλωρίδα του *P. similis* εμφανίζονται σε μικρή αφθονία OTUs αρχαίων της οικογένειας *Nitrosphaeraceae*, που περιλαμβάνει στελέχη που είναι γνωστά για την ικανότητα τους να οξειδώνουν την αμμωνία ως νιτροδοποιητές.

Δεύτερες σε βαθμό ποικιλότητας εμφανίζονται οι σκνίπες του είδους *P. tobbi*, του οποίου η μικροχλωρίδα σε ποσοστό περίπου 40% αποτελείται από OTUs με χαμηλή σχετική αφθονία, ενώ μόνο ένα OTU που ανήκει στο γένος *Wolbachia* εμφανίζεται ως κυρίαρχο. Όμοια με το *P. similis* εμφανίζονται ως σημαντικά για την μικροχλωρίδα του συγκεκριμένου είδους OTUs που ανήκουν σε βακτήρια *Staphylococcus*, *Cutibacterium*, *Corynebacteriaceae* και *Rhizobiaceae*. Στο *P. tobbi* επιπλέον εμφανίζεται το OTU 0012 *Pseudomonas*, βακτήρια του συγκεκριμένου γένους εμφανίζονται και σε άλλα είδη όπως τα *P. papatasi*, *P. chinensis* και *P. duboscqi*^{35,36}. Βακτήρια του γένους *Wolbachia* αποτελούν σημαντικά μέλη της εντερικής χλωρίδας διαφόρων εντόμων και σκνιπών και έχουν σημαντική βιολογική και βιοτεχνολογική αξία. Τα βακτήρια αυτά χρησιμοποιούνται σε τεχνολογίες ελέγχου πληθυσμών των εντόμων, χάριν της ιδιότητας τους να ρυθμίζουν την αναπαραγωγική φύση των εντόμων^{24,37}. Το *Wolbachia* χρησιμοποιείται για τον έλεγχο πληθυσμού των κουνουπιών, ώστε να επιτευχθεί μείωση της εξάπλωσης του παθογόνου που προκαλεί δάγκειο πυρετό.¹⁸ Το *Wolbachia* είναι ενδοκυτταρικό βακτήριο και μεταδίδεται ανάμεσα στις γενεές με κάθετο τρόπο³⁷. Σε ανάλυση μικροβιώματος σκνιπών στην Κίνα, εντοπίστηκε *Wolbachia* αποκλειστικά σε περιοχές που παρουσιάστηκαν περιστατικά σπλαχνικής λεισημανίωσης¹⁸.

Το *P. neglectus* εμφανίζει την πιο χαμηλή βακτηριακή ποικιλότητα από όλα τα είδη που μελετήσαμε, που περιλαμβάνει δύο κυρίαρχα OTUs (άθροισμα σχετικής αφθονίας 70%) που ανήκουν στα γένη *Wolbachia* και *Staphylococcus*. Επιπλέον στο *P. neglectus* εντοπίστηκε εξειδικευμένα το αρχαίο OTU 1309 *Methanobrevibacterium*, που έχει χαρακτηριστεί ότι έχει δράση παραγωγής μεθανίου, συναντάται σε περιοχές που συμβαίνει πέψη, συναντάται και στον άνθρωπο³⁸.

Το *P. papatasi* είναι ίσως το πιο καλά μελετημένο είδος του γένους *Phlebotomus*, είναι φορέας του παρασίτου *L. major* που προκαλεί δερματική λεισμανίωση σε περιοχές της Μέσης Ανατολής, στην Ελλάδα δεν έχουν παρατηρηθεί ακόμη κρούσματα που να οφείλονται σε μόλυνση που προκαλούν οι σκνίπες αυτού του είδους. Πέρα από τις κλασικές παρασιτολογικές μελέτες, έχουν γίνει και πολλές μελέτες του μικροβιώματος του *P. papatasi*. Η σύσταση του μικροβιώματος του, από την μελέτη που διεξήγαμε έδειξε ότι είχε την μικρότερη ποικιλότητα επί του συνόλου των OTUs, σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη, παρουσίασε μια κυριαρχία OTU των γενών *Spiroplasma* και *Wolbachia*, και της οικογένειας *Paenibacillaceae* σε ποσοστό μικρότερο από αυτό των δύο κυρίαρχων. Το *Wolbachia* όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι συχνά εντοπισμένος μικροοργανισμός στο έντερο της σκνίπας, σε πολλά είδη και σε μεγάλη συχνότητα στο *P. papatasi*. Το *Spiroplasma* εμφανίζεται σε μελέτες μικροβιώματος όμως δεν έχει χαρακτηριστεί για το *P. papatasi*^{34,39}. Ενώ σε έρευνα που διεξήχθη για μελέτη μικροβιώματος σε επίπεδο γένους (*Phlebotomus*) ήταν παρόν³⁷. Το *Spiroplasma* είναι χαρακτηρισμένος μικροοργανισμός του εντέρου των εντόμων, ενώ στον άνθρωπο ορισμένα είδη φαίνεται πως προκαλούν ασθένειες όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια⁴⁰. Το *Paenibacillaceae* δεν φαίνεται να έχει καταγραφεί σε προηγούμενες μελέτες στο μικροβίωμα του εντερικού σωλήνα σκνιπών.

Συμπερασματικά από την παρούσα μελέτη προκύπτει μια πρώτη εικόνα για τα είδη *P. neglectus*, *P. similis*, *P. tobbi* σε επίπεδο μικροβιώματος, καθώς δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία παρόμοια ανάλυση. Για το είδος *P. papatasi* που όπως προαναφέρθηκε, έχει γίνει ανάλυση του μικροβιώματος, αρκετές φορές διαπιστώθηκε ότι η μικροβιακή του χλωρίδα εμφανίζει την χαμηλότερη ποικιλότητα και διαφέρει σημαντικά σε επίπεδο σύστασης από την μικροχλωρίδα των άλλων τριών ειδών που μελετήθηκαν. Γενικότερα όμως θα πρέπει να τονιστεί ότι τα κυρίαρχα βακτήρια στην μικροχλωρίδα των ειδών του γένους *Phlebotomus* που μελετήθηκαν εμφανίζονται να αποτελούν τυπικά μέλη της βακτηριακής κοινότητας σε άλλα έντομα (πχ. *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Staphylococcus*). Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην μελέτη της αλληλεπίδρασης του μικροβιώματος σε σκνίπες του γένους *Phlebotomus* με το πρωτόζωο *Leishmania*.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dantas-Torres, F., Tarallo, V. D. & Otranto, D. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasites and Vectors*7, (2014).
2. R. KILLICK-KENDRICK, PhD, DSc, Fib. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* (1999).
3. Tsirigotakis, N. *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Greek Aegean Islands: Ecological approaches. *Parasites and Vectors*11, 1–14 (2018).
4. Maria Traub-Csekö, Y., Loza Telleria, E., Martins-da-Silva, A. & Jorge Tempone, A. Parasitology cambridge.org/par Special Issue Review Leishmania, microbiota and sand fly immunity. (2018). doi:10.1017/S0031182018001014
5. Marayati, B. F. *et al.* Attraction and oviposition preferences of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), vector of Old-World cutaneous leishmaniasis, to larval rearing media. *Parasites and Vectors*8, 1–9 (2015).
6. Gomes, C. & Ruiz, J. Carrion's disease: The sound of silence. *Clinical Microbiology Reviews*31, (2018).
7. Warburg, A. & Faiman, R. Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. *J. Vector Ecol.*36, 10–16 (2011).
8. Gálvez, R., Montoya, A., Fontal, F., Martínez De Murguía, L. & Miró, G. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. *Research in Veterinary Science*121, 94–103 (2018).
9. Ready, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.*58, 227–250 (2013).
10. Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S. & Otranto, D. Occurrence and genetic variability of *Phlebotomus papatasi* in an urban area of southern Italy. *Parasites and Vectors*3, (2010).
11. Ambrose, D. P. & Ganesh Kumar, A. Chapter 7 – Reduviid Predators. *Ecofriendly Pest Management for Food Security* 217–257 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-803265-7.00007-5
12. Dokianakis, E., Tsirigotakis, N., Christodoulou, V., Poulakakis, N. & Antoniou, M. Identification of wild-caught phlebotomine sand flies from Crete and Cyprus using DNA barcoding. *Parasites and Vectors*11, (2018).
13. Xanthopoulou, K. *et al.* Distribution of sandflies (Diptera, Psychodidae) in two Ionian Islands and Northern Greece. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*11, 1591–1594 (2011).
14. Y, P. B. & T. SANDFLIES ON THE ISLAND OF CORFU.

15. PAPADOPOULOS B. and TSELENTIS Y. Sand flies in the Greater Athens Region , Greece.
16. Sunter, J. & Gull, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*7, (2017).
17. BLUM, J. J. Introductory Remarks: Symposium on Differentiation of Trypanosomatids. *Journal of Eukaryotic Microbiology*40, 196–196 (1993).
18. Dostálová, A. & Volf, P. Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*5, 1–12 (2012).
19. Pace, D. Leishmaniasis. (2014).
20. Pennisi, M. G. & Persichetti, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Vet. Parasitol.*251, 131–137 (2018).
21. Alvar, J. Canine Leishmaniasis Jorge.
22. Baneth, G. & Shaw, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*106, 315–324 (2002).
23. Louradour, I. *et al.* The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. *Cell. Microbiol.*19, (2017).
24. Aksoy, S. Insect Gut Microbiota: Accessories to the Bite. *Cell Host and Microbe*23, 8–9 (2018).
25. Engel, P. & Moran, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*37, 699–735 (2013).
26. Rogers, M. E. & Bates, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens*3, 0818–0825 (2007).
27. J, G. I. The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. *Biometrika*40, 237–264 (1953).
28. Jost, L. Entropy and diversity. *Opinion*2, 363–375 (2006).
29. Anne Chao. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scand. J. Stat.*11, 265–270 (1984).
30. Chao, A. Estimating the Population Size for Capture-Recapture Data with Unequal Catchability Author (s): Anne Chao Published by □ : International Biometric Society Stable URL □ : <http://www.jstor.org/stable/2531532> REFERENCES Linked references are available on JSTOR. *Biometrics*43, 783–791 (1987).
31. Çizmeçi, Z., Karakuş, M., Karabela, Ş. N., Erdoğan, B. & Güleç, N. Leishmaniasis in Istanbul; A new epidemiological data about refugee leishmaniasis. *Acta Trop.*195, 23–27 (2019).
32. Karimian, F. *et al.* Aerobic midgut microbiota of sand fly vectors of zoonotic visceral leishmaniasis from northern Iran, a step toward finding potential

- paratransgenic candidates 06 Biological Sciences 0605 Microbiology.
*Parasites and Vectors***12**, 1–12 (2019).
33. Mukhopadhyay, J., Braig, H. R., Rowton, E. D. & Ghosh, K. Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, vector of *Leishmania major* in the old world. *PLoS One***7**, (2012).
 34. Almasaudi, S. B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J. Biol. Sci.***25**, 586–596 (2018).
 35. Dey, R. *et al.* Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . *Cell Host Microbe***23**, 134-143.e6 (2018).
 36. Louradour, I. *et al.* The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. *Cell. Microbiol.***19**, (2017).
 37. Karatepe, B., Aksoy, S. & Karatepe, M. Investigation of *Wolbachia* spp. and *Spiroplasma* spp. in *Phlebotomus* species by molecular methods. *Sci. Rep.***8**, 2–6 (2018).
 38. Seo, M. *et al.* *Methanobrevibacter* attenuation via probiotic intervention reduces flatulence in adult human: A non-randomised paired-design clinical trial of efficacy. *PLoS One***12**, 1–20 (2017).
 39. Karakuş, M. *et al.* Midgut Bacterial Diversity of Wild Populations of *Phlebotomus (P.) papatasi*, the Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) in Turkey. *Sci. Rep.***7**, 1–7 (2017).
 40. Bastian, F. O. The case for involvement of *spiroplasma* in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.***73**, 104–114 (2014).
 41. Hurwitz, I. *et al.* Paratransgenic control of vector borne diseases. *Int. J. Biol. Sci.***7**, 1334–1344 (2011).
 42. The identification of female sandflies of the subgenus *Larroussius* by the morphology of the spermathecal ducts. Killick-Kendrick R, Tang Y, Killick-Kendrick M, Sang DK, Sirdar MK, Ke L, Ashford RW, Schorscher J, Johnson RH. *Parassitologia*. 1991 Dec;33 Suppl:335-47.
 43. Theodor, O. (1958) *Psychodidae-Phlebotominae*. pp. 1–55. in Lindner, E. (ed) *Die Fliegen der Palaerktischen Region* Stuttgart, Germany, E. Schweizerbart'sche.