



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ



ΕΛΛΗΝΙΚΟ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ

Πληθυσμιακές και γενετικές μελέτες
παρασίτων που ανήκουν στο σύμπλεγμα
Leishmania donovani με τη χρήση
μικροδορυφορικών αλληλουχιών.

Νεουποκόεβα Ελένη
ΑΜ 03/032

ΑΤΕΙ ΑΘΗΝΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
Δρ. Χ. Βογιατζάκη

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
ΤΜΗΜΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ
Υπεύθυνη Εργαστηρίου:
Δρ. Κ. Σωτηριάδου

ΑΘΗΝΑ
2008

Πληθυσμιακές και γενετικές μελέτες
παρασίτων που ανήκουν στο σύμπλεγμα
Leishmania donovani με τη χρήση
μικροδορυφορικών αλληλουχιών.

*Στους υπέροχους ανθρώπους που στάθηκαν πλάι μου,
με πίστεψαν και με στήριξαν στις δύσκολες επαγγελματικές
μα και προσωπικές στιγμές μου.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ.Χρύσα Βογιατζάκη, Καθηγήτρια Παρασιτολογίας της Σχολής Ιατρικών Εργαστηρίων, του ΑΤΕΙ Αθηνών, που με τίμησε με την εμπιστοσύνη της και μου ανέθεσε το έργο αυτό, το οποίο και επέβλεψε μέχρι την ολοκλήρωση του στηρίζοντας με, με τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Καίτη Σωτηριάδου, Διευθύντρια Ερευνών του Εργαστηρίου Μοριακής Παρασιτολογίας, του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, που με δέχτηκε στο εργαστήριό της και παρείχε κάθε δυνατό μέσο για να ολοκληρωθεί η εργασία αυτή.

Θερμά ευχαριστώ προς όλους τους συναδέλφους μου, στο Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, που με βοήθησαν να ξεπεράσω όλες τις δυσκολίες, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ιδιαιτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Χριστόφορο Χαραλάμπους για το αδιάλειπτο ενδιαφέρον του για την πορεία της ερευνητικής μου εργασίας, τις πολύτιμες συμβουλές του, τη συνεχή μετάδοση γνώσης και εμπειρίας και την αμέριστη συμπαράσταση εκ μέρους του στις δυσκολίες που συνάντησα καθ' όλη την περίοδο εκπόνησης της Εργασίας αυτής. Ο ρόλος του υπήρξε καθοριστικός για την ολοκλήρωση του έργου αυτού.

Πάνω απ'όλα όμως ευχαριστώ όλα τα μέλη της οικογένειάς μου που με την αγάπη τους, τη πολυδιάστατη υποστήριξή τους καθώς και την ατελείωτη κατανόηση που μου έδειξαν, με βοήθησαν να πετύχω αυτό που επιθυμούσα.

Νεουποκόεβα Ελένη
Αθήνα 2008

ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΣΚΟΠΟΣ.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
Παράσιτο	7
Πρωτόζωα	7
Μαστιγοφόρα	8
Διαίρεση μαστιγοφόρων	8
Μαστιγοφόρα Αίματος και Ιστών	9
Συστηματική κατάταξη.....	9
Το παράσιτο <i>Leishmania spp.</i>	9
Προμαστιγωτή μορφή	11
Αμαστιγωτή μορφή.....	12
Αναπαραγωγή.....	14
Λεισμανίαση.....	15
Κλινικές μορφές λεισμανίασης	16
Βασικές κλινικές μορφές	16
Σπλαχνική Λεισμανίαση	18
Post Kala-Azar δερματική λεισμανίαση	19
Δερματική Λεισμανίαση	19
Διάχυτη Δερματική Λεισμανίαση	20
Βλεννογονοδερματική Λεισμανίαση	21
Ασυμπτωματικός Παρασιτισμός	22
Στατιστικά στοιχεία -Γεωγραφική κατανομή	23
Ιστορική αναδρομή	24
Επιδημιολογία	25
Η Λεισμανίαση στην Ελλάδα	27
Σύμμεικτη λοίμωξη HIV/ <i>Leishmania</i>	28
Ενδιάμεσοι ξενιστές.....	30
Δεξαμενή (reservoir) του παρασίτου.....	32
Εξέλιξη παρασίτου – Βιολογικός κύκλος ζωής	33
Κύτταρα ξενιστές: Μονοκύρηνα φαγοκύτταρα	36
Θεραπεία	37
Εμβόλια.....	40
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	41
Διάγνωση	42
Παρασιτολογική εξέταση	42
Μικροσκοπική μέθοδος.....	42
Καλλιέργεια παρασίτου	44
Ορολογική διάγνωση της Λεισμανίασης	46
Ειδικές ορολογικές δοκιμασίες.....	46
Μοριακές μέθοδοι	47
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	47
Τυποποίηση του παρασίτου <i>Leishmania</i>	48
Ισοενζυμική Πολυεστιακή Ηλεκτροφόρηση	48
DNA τυποποίηση	51

Το ζυμόδεμα MON-1	52
Μέθοδοι τυποποίησης υψηλής διακριτικής ικανότητας	52
kDNA PCR-RFLP	54
Πολυεστιακή τυποποίηση μικροδορυφορικών αλληλουχιών (MLMT).....	56
Καινούρια μοριακά δεδομένα για το ζυμόδεμα MON-1	58
Πληθυσμιακή και γενετική μελέτη στελεχών MON-1 με χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών	58
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	61
Καλλιέργεια παρασίτων	62
Συντήρηση παρασίτων.....	62
Απομόνωση γενωμικού DNA.....	63
Απομόνωση γενωμικού DNA από καλλιέργειες παρασίτων <i>Leishmania</i>	64
Απομόνωση DNA παρασίτων <i>Leishmania</i> από αίμα	66
Απομόνωση DNA παρασίτων <i>Leishmania</i> από λευκά αιμοσφαίρια	66
Απομόνωση DNA παρασίτων <i>Leishmania</i> από άλλα κλινικά δείγματα.....	67
Ενίσχυση PCR	68
Ενίσχυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών.....	69
Ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών	74
Αγαρόζη Metaphor	74
Τυποποίηση του συμπλέγματος <i>L.donovani</i> με K26-PCR	76
PCR ενίσχυση του γονιδίου K26 – Πολυμορφισμός μεγέθους των αλληλόμορφων.....	76
Πληθυσμιακή ανάλυση.....	78
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	79
Μελέτη στελεχών με τη χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών ...	80
Πληθυσμιακή δομή στελεχών	95
Το στέλεχος EP59	102
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	106
Αποτελέσματα που προκύπτουν από την πληθυσμιακή ανάλυση ..	107
Εμφάνιση του είδους <i>L.donovani</i> στην Μεσόγειο	110
Το στέλεχος EP59	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΣΚΟΠΟΣ



Η λεισμανίαση απαντάται γεωγραφικά σε όλες ηπείρους (εκτός από την Αυστραλία και την Ανταρκτική) και είναι ενδημική στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών (72 αναπτυσσόμενες και 16 αναπτυγμένες). Προσεγγιστικά 350 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν σε αυτές τις περιοχές και κινδυνεύουν από τη λεισμανίαση. Ανά την υφήλιο περίπου 14 εκατομμύρια άνθρωποι είναι μολυσμένοι και περίπου 1,5-2 εκατομμύρια νέα περιστατικά αναφέρονται κάθε χρόνο (WHO, 2006a). Η λεισμανίαση, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) τοποθετείται στη τρίτη θέση σε σχέση με άλλα παρασιτικά νοσήματα.

Η τυποποίηση/ ταυτοποίηση του παρασίτου είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διάγνωση καθώς και τις επιδημιολογικές και πληθυσμιακές μελέτες. Η ταυτοποίηση του είδους του παρασίτου καθοδηγεί τους κλινικούς στη σωστή επιλογή της θεραπευτικής αγωγής και επιτρέπει τη σωστή εποπτεία της ασθένειας.

Το σύμπλεγμα *L. donovani* (το οποίο μελετήθηκε στο πλαίσιο αυτής της εργασίας) αποτελείται από τα είδη *L. donovani*, *L. infantum* και *L. archibaldi* και είναι υπεύθυνο για τη σοβαρότερη μορφή λεισμανίασης, τη σπλαχνική λεισμανίαση. Η ταξινόμηση των ειδών αυτών βασίζεται στη τεχνική της πολυεστιακής ισοενζυμικής ηλεκτροφόρησης (MLEE), η οποία εκτός από χρονοβόρα έχει και άλλα μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι η αδυναμία περαιτέρω διάκρισης των στελεχών που ανήκουν στο ζυμόδεμα MON-1. Από τη στιγμή που το ζυμόδεμα αυτό είναι το κυρίαρχο στη Μεσόγειο έπρεπε να βρεθεί κάποια άλλη τεχνική διαφοροποίησης των στελεχών αυτών.

Τη λύση στο πρόβλημα της διαφοροποίησης των στελεχών έδωσαν οι Ochsenreither et al. (Ochsenreither et al., 2006) με τη δημιουργία ενός πάνελ 15 μικροδορυφορικών δεικτών.

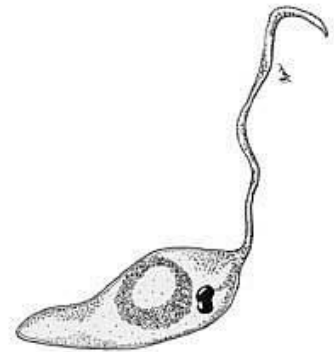
Στη παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε χρήση των δεικτών αυτών με σκοπό τη μελέτη των στελεχών που ανήκουν στο σύμπλεγμα *L. donovani* από τη Νοτιοανατολική Μεσόγειο, καθώς και τον καλύτερο καθορισμό των σχέσεων μεταξύ τους. Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να διαχωρίσει μια εκ νέου μόλυνση από μια αναζωπύρωση.

Ο καθορισμός των σχέσεων αυτών έγινε με την εφαρμογή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση του μεγέθους των προϊόντων, για κάθε δείκτη ξεχωριστά, σε πηκτή MetaPhor.

Μετά το πέρας της ανάλυσης του μεγέθους έγινε χρήση του προγράμματος MICROSAT (Minch et al., 1995) καθώς και του αλγόριθμου υπολογισμού γενετικών αποστάσεων, Neighbor-joining (NJ) του προγράμματος PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 2002).

Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν συνολικά 114 στελέχη. Τα στελέχη αυτά προέρχονται από την Ελλάδα, την Κύπρο, την Τουρκία και την Αλβανία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Παράσιτο

Είναι ο οργανισμός που ζει επί ή εντός άλλου ζώντος οργανισμού, τρέφεται από αυτόν και προκαλεί διάφορες βλάβες από τις πιο ασήμαντες μέχρι τις πιο βαριές που μπορούν να προκαλέσουν και το θάνατο του ξενιστή.

Διάκριση:

- ✓ Ζωοπαράσιτα
- ✓ Φυτοπαράσιτα

Οι συνομοταξίες των Ζωοπαρασίτων:

- ✓ Πρωτόζωα
- ✓ Μετάζωα
- ✓ Αρθρόποδα

Πρωτόζωα

Είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, πολύ διαδεδομένοι στη φύση. Μερικά πρωτόζωα εμφανίζουν γεωγραφική κατανομή, η οποία έχει άμεση σχέση με το κλίμα της περιοχής, την ύπαρξη κατάλληλων ξενιστών και τις κατάλληλες συνθήκες διαβίωσης αυτών (Mauridou-Tsoha, 2001).

Τα οργανίδια μετακίνησης των πρωτόζωων, τα οποία είναι τα μαστίγια, τα ψευδοπόδια και οι βλεφαρίδες, χρησιμοποιούνται συνήθως ως κύριο κριτήριο για την ταξινόμησή τους στα παρακάτω φύλα:

- Μαστιγοφόρα (διαθέτουν, σε μία τουλάχιστον φάση του κύκλου της ζωής τους, ένα κινητήριο σύστημα, το οποίο αποτελείται από μαστίγια)
 - ΡΙζόποδα (μετακινούνται με τη βοήθεια ψευδοποδίων)
 - Ακτινόποδα (διαθέτουν λεπτά ψευδοπόδια με ακτινωτή διάταξη)
 - Βλεφαριδοφόρα (διαθέτουν βλεφαρίδες με παλμική κίνηση)
 - Σπορόζωα (στερούνται κινητήριων οργάνων, με εξαίρεση τους γαμέτες που είναι μαστιγοφόροι)
 - Κνιδοσπορίδια (είναι παράσιτα, δεν έχουν μαστιγοφόρα στάδια και σχηματίζουν σπόρια και πλασμώδια).
- (http://kpekastor.kas.sch.gr/ergastiriakos_odigos/microkosmos.htm/protozoa.htm)

Μαστιγοφόρα

Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί με βασικό χαρακτηριστικό την έντονη κίνηση, με ένα ή περισσότερα ειδικά όργανα κίνησης, που λέγονται μαστίγια, εικόνα 1 (Haralampidis, 2001).

Διαίρεση μαστιγοφόρων :

- ✓ Ανοιχτών κοιλοτήτων (δηλ. εντέρου, κόλπου, στόματος κ.λ.π.)
- ✓ Αίματος και Ιστών
Ανήκουν στην οικογένεια των τρυπανοσωμίδων
Μας ενδιαφέρουν τα γένη :
 - Λεπτομονάδες
 - Λεισμάνιες
 - Κριθίδια
 - Τρυπανοσώματα

Τα μαστιγοφόρα του αίματος και των ιστών χαρακτηρίζονται από μονοκύτταρο σώμα με:

- ✓ ένα μεγάλο πυρήνα
- ✓ ένα μαστίγιο
- ✓ ένα ή πολλά παραβασικά σωμάτια
- ✓ ένα βλεφαριδοπλάστη (ο οποίος είναι πάντα ένας και τοποθετείται εμπρός ή πίσω από τον πυρήνα) απ' όπου εκφύεται το μαστίγιο (Haralampidis, 2001).



Εικόνα 1: Η προμαστιγωτή μορφή του μαστιγοφόρου παρασίτου *Leishmania*. Το μαστίγιο σημειώνεται με βέλος.
(<http://www.bvt.fr/francais/speedleish.htm>)

Μαστιγοφόρα Αίματος και Ιστών

Συστηματική κατάταξη

Βασίλειο	: Πρώτιστα
Υπο-βασίλειο	: Πρωτόζωα
Φύλο	: Σαρκομαστιγοφόρα
Κλάση	: Ζωομαστιγοφόρα
Τάξη	: Κινητοπλαστοειδή
Οικογένεια	: Τρυπανοσωμίδες
Γένος	: <i>Leishmania</i> spp.
Είδος	: <i>L.donovani</i> , <i>L.mexicana</i> , <i>L.aethiopica</i> κα. (Levine et al., 1980) (σχήμα 1)

Το παράσιτο *Leishmania* spp.

Έχει δυο μορφολογικά στάδια :

- ✓ εξωκυττάρια προμαστιγωτή μορφή (με αυτή τη μορφή αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται στο έντερο του ασπόνδυλου, ενδιάμεσου ξενιστή και στις καλλιέργειες του παρασίτου).
- ✓ και την ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή (με αυτή τη μορφή απαντάται στα μονοπύρρηνα / μακροφάγα του τελικού ξενιστή)
Η αμαστιγωτή μορφή είναι ωοειδής ή στρογγυλή, ή και απιοειδής. Φέρει βλεφαριδοπλάστη μπροστά από τον πυρήνα και αξόνημα (είναι το τμήμα του μαστιγίου το οποίο βρίσκεται μέσα στο κύτταρο).

Προμαστιγωτή μορφή

Είναι η μορφή του παρασίτου που φέρει ένα μαστίγιο στο πρόσθιο τμήμα του σώματός του (που επιτρέπει την κίνηση του παρασίτου). Είναι μεγαλύτερη από την αμαστιγώτη μορφή (εικόνα 2, σχήμα 2).

Συγκεκριμένα: είναι επιμήκης με μέγεθος 9-12μm X 2-3μm, φέρει μαστίγιο που εκφύεται από το πρόσθιο τμήμα του σώματος και έχει ίσο ή μεγαλύτερο μήκος από αυτό του σώματος του παρασίτου. Η προμαστιγωτή μορφή κινείται με τη βοήθεια του μαστιγίου με κατεύθυνση προς αυτό (Killick-Kendrick et al., 1974). Στο κέντρο υπάρχει ένας μεγάλος σφαιρικός πυρήνας με σαφή πυρηνίσκο και περιφερική χρωματίνη. Στο κυτταρόπλασμα απαντώνται πολυάριθμα ριβοσώματα, συσκευή *Golgi*, κυστίδια λίπους, κοκκώδες και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και λυσοσώματα. Κοντά στη βάση του μαστιγίου υπάρχει ένας τροποποιημένος τύπος μιτοχονδρίου που περιέχει έναν δισκοειδή κινητοπλάστη, μια χαρακτηριστική δομή των παρασίτων που ανήκουν στην τάξη των κινητοπλαστοειδών. Ο κινητοπλάστης περιέχει δύο τύπους κυκλικών μορίων DNA, που είναι γνωστά και ως kDNA, τους μικρόκυκλους και τους μακρόκυκλους.

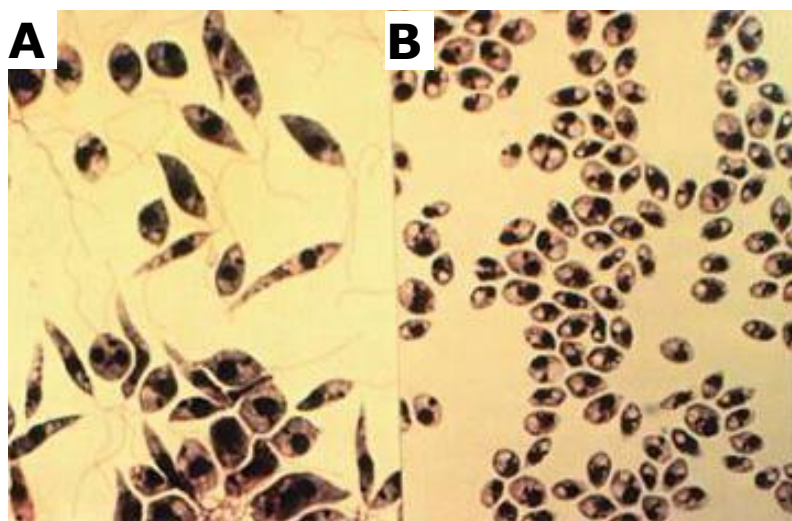
Τα προμαστιγωτά που βρίσκονται στο έντερο του ενδιάμεσου ξενιστή (σκνίπα), αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και μεταφέρονται στο πρόσθιο μέρος του εντέρου, όπου μετατρέπονται σε μετακυκλικά. Τα παράσιτα σε αυτό το στάδιο είναι μικρότερα σε μέγεθος, έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και είναι περισσότερο μολυσματικά. Η μορφή αυτή εμφανίζεται στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του παρασίτου (Mallinson et al., 1989).

Αμαστιγωτή μορφή

Το παράσιτο σε αυτή τη φάση έχει χάσει το μαστίγιο του και είναι μικρό με σχήμα ωοειδές (ή κυκλικό ή απιοειδές), με πυρήνα στο κέντρο αυτού, με βλεφαριδοπλάστη μπροστά από τον πυρήνα και αξόνημα.

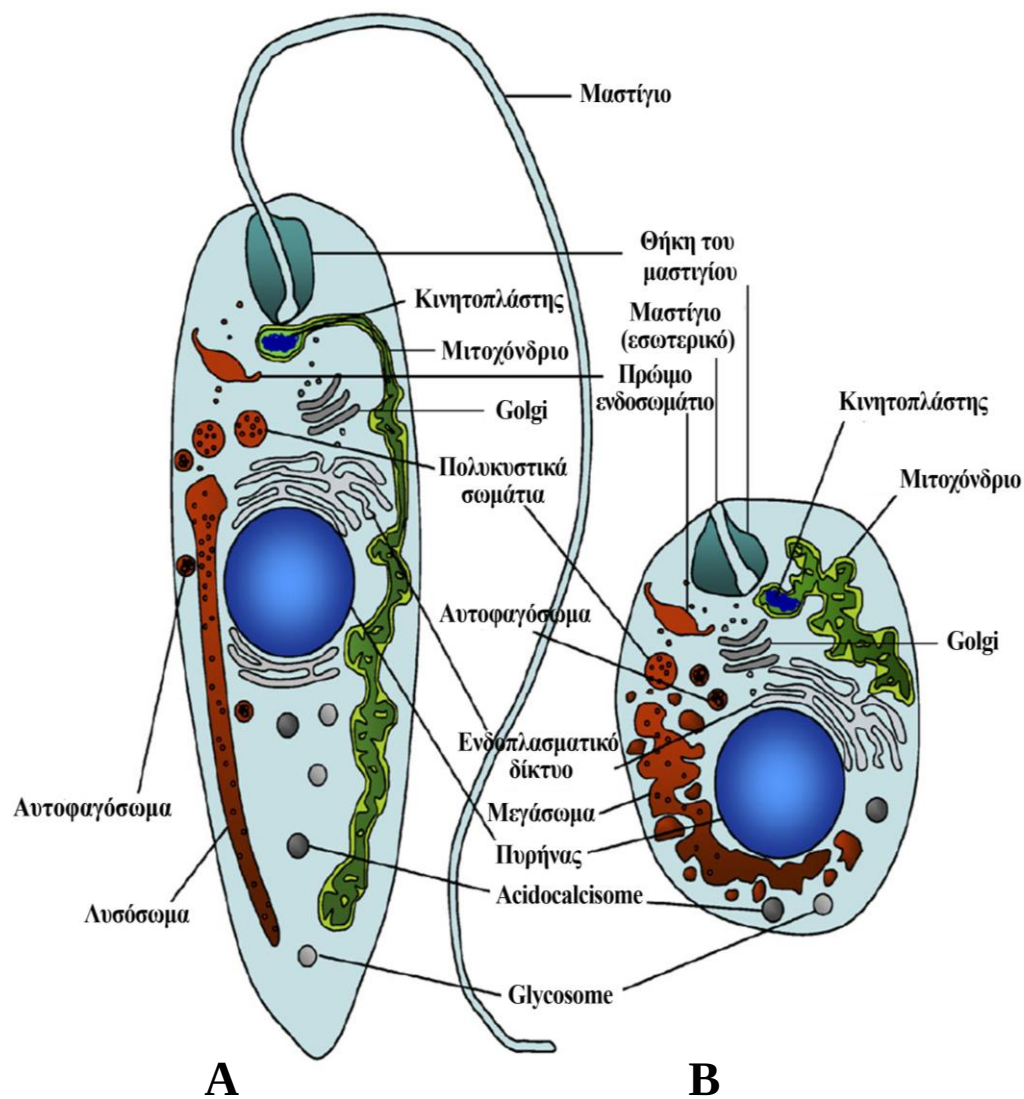
Η μορφή αυτή βρίσκεται στα μακροφάγα κύτταρα του Δ.Ε.Σ., του δέρματος, του ήπατος, του σπλήνα, του μυελού των οστών και στα μεγάλα μονοκύτταρα στο περιφερικό αίμα.

Στα φαγολυσοσώματα των μονοκυττάρων/ μακροφάγων του τελικού ξενιστή τα μετακυκλικά παράσιτα μετατρέπονται σε αμαστιγώτα. Η αμαστιγώτη μορφή είναι ωοειδής με διάμετρο 2-6μm X 1.5-2μm και φέρει έναν έκκεντρο πυρήνα με πυρηνίσκο και έναν κινητοπλάστη που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Ο υπόλοιπος χώρος του κυττάρου περιλαμβάνει οργανίδια όπως η προμαστιγώτη μορφή του παρασίτου, όμως είναι λιγότερο ανεπτυγμένα. Επιπλέον η αμαστιγώτη μορφή περιέχει ένα ενδοκυττάριο μαστίγιο (Killick-Kendrick, 1979; Sacks et al., 2001).



Εικόνα 2: Μορφολογικά στάδια του παρασίτου *Leishmania*.

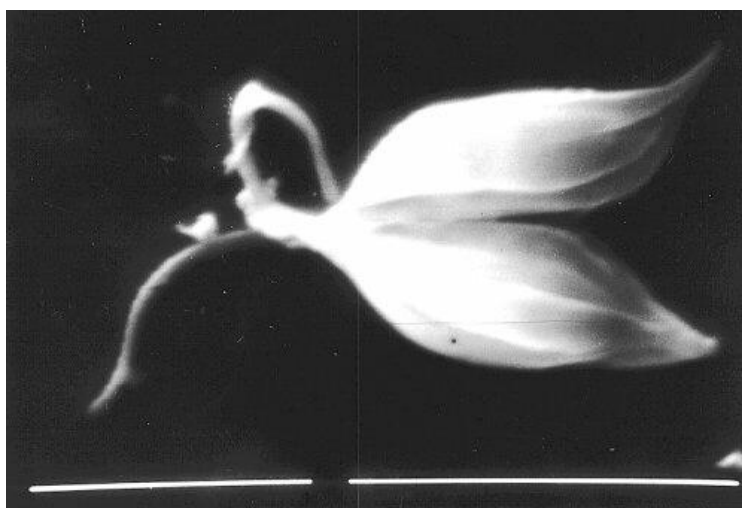
A. Προμαστιγώτη μορφή, B. Αμαστιγώτη μορφή
(www.mh-hannover.de/3548.html)



Σχήμα 2: Μορφολογία της προμαστιγωτής μορφής (A) και της αμαστιγωτής μορφής (B) του παρασίτου *Leishmania* (Besteiro et al., 2007).

Αναπαραγωγή

Στη *Leishmania* δεν έχει παρατηρηθεί φυλετική αναπαραγωγή και δεν έχει ακόμη αποδειχτεί πειραματικά η ύπαρξη ανασυνδυασμού. Μελέτες σε φυσικούς πληθυσμούς παρασίτων έχουν οδηγήσει τους ερευνητές σε διαφορετικές απόψεις, καθώς υποστηρίζεται η τυχαία ανταλλαγή γενετικής πληροφορίας (Bastien et al., 1992) αλλά και η αναπαραγωγή με απλή διχοτόμηση (εικόνα 3) (Tibayrenc et al., 1990; Banuls et al., 2000). Έχει επίσης προταθεί η ύπαρξη περιστασιακού φυλετικού ανασυνδυασμού, κάτι που τεκμηριώθηκε με την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των υβριδίων (Banuls et al., 1997, Ravel et al., 2006).



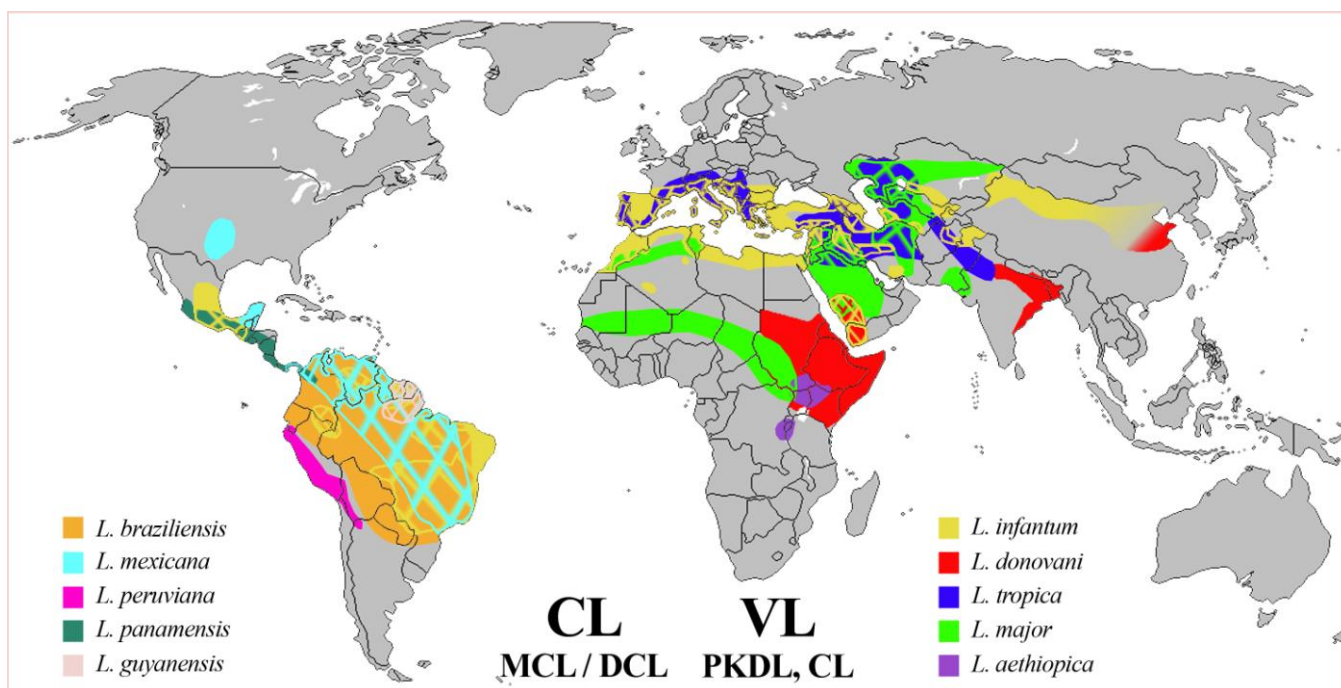
Εικόνα 3: Διχοτόμηση παρασίτου *Leishmania*. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Η λευκή γραμμή στο δεξιό κάτω άκρο της φωτογραφίας είναι της τάξεως των 5 μm (Courtesy of Mr Duncan Kennedy, University of East London).

Λείσμανίαση

Είναι νόσημα το οποίο προκαλείται από πρωτόζωα του γένους *Leishmania*. Τα παράσιτα πολλαπλασιάζονται σε διάφορα είδη σπονδυλωτών ζώων, τα οποία δρουν ως δεξαμενές. Η δεξαμενή του παρασίτου παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και την επιδημιολογία του παρασίτου. Το παράσιτο μεταφέρεται στους ανθρώπους μέσω του τσιμπήματος από τον ενδιάμεσο ξενιστή, ο οποίος συμμετέχει στο βιολογικό κύκλο του παθογόνου παράγοντα, τον οποίο και μεταδίδει στον τελικό ξενιστή (σκνίπες του γένους *Phlebotomus* και *Lutzomyia*), (WHO, 2006a).

Είναι ανθρωποζωνόσοι, και παρουσιάζουν μεγάλη γεωγραφική κατανομή.

Η λείσμανίαση είναι διαδεδομένη σε όλες τις ηπείρους με εξαίρεση την Αυστραλία και την Ανταρκτική (χάρτης 1).



Χάρτης 1: Παγκόσμια κατανομή λείσμανίασης (Haralambous, 2007).

Κλινικές μορφές λεισμανίασης

Περίπου 20 είδη παρασίτων του γένους *Leishmania* προσβάλλουν τον άνθρωπο και μπορούν να προκαλέσουν ομάδα νοσημάτων με ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων. Αυτό είναι αποτέλεσμα των πολλών πολύπλοκων παθογενετικών μηχανισμών των νοσημάτων καθώς και της ποικιλομορφίας των ανοσολογικών απαντήσεων από τους ξενιστές (Solbach et al., 2000). Επίσης το είδος/ υποείδος του παρασίτου σχετίζεται με συγκεκριμένες κλινικές μορφές, αν και πολλές φορές παρατηρείται πλειομορφισμός (πίνακας 1).

Βασικές κλινικές μορφές

Υπάρχουν τρεις βασικές κλινικές μορφές λεισμανίασης:

- ✓ σπλαχνική λεισμανίαση (*VL-visceral leishmaniasis*)
- ✓ δερματική λεισμανίαση (*CL-cutaneous leishmaniasis*)
- ✓ βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (*MCL-mucocutaneous leishmaniasis*).

Είδος παρασίτου	Κλινικές μορφές*	Κύριος ενδιάμεσος ξενιστής	Δεξαμενή (ξενιστής αποθήκη)	Γεωγραφική κατανομή
Παλιός κόσμος				
<i>L.donovani infantum</i>	VL, CL	<i>P.perniciosus</i> <i>P.ariasi</i> <i>P.langeroni</i> <i>P.chinesis</i> <i>P.major</i>	σκύλος αλεπού τσακάλι	Χώρες Μεσογείου, Μέση Ανατολή, Κεντρική Ασία
<i>L.donovani chagasi</i> ^α	VL, CL	<i>Lu.longipalpis</i>	σκύλος αλεπού	Νότια Αμερική (Βραζιλία, Βενεζουέλα, Μεξικό)
<i>L.donovani archibaldi</i> ^β	VL, PKDL	<i>P.argentipes</i> <i>P.orientalis</i> <i>P.martini</i> <i>P.alexandri</i>	άνθρωπος τροκτικά κυνοειδή	ΒΑ Ινδία, Μπαγκλαντές, Νεπάλ, Κίνα, Αν.Αφρική (Σουδάν, Κένυα, Αιθιοπία)
<i>L.major</i>	CL, DCL	<i>P.papatasi</i> <i>P.duboscqi</i>	τροκτικά άνθρωπος	Μέση Ανατολή, Β.Ινδία, Πακιστάν, Β.Αφρική, Κεντρική Ασία, Σουδάν
<i>L.tropica</i>	CL, VL	<i>P.sergenti</i> <i>P.saevus</i>	άνθρωπος	Μέση Ανατολή, χώρες Μεσογείου, Κεντρική Ασία, Κένυα
<i>L.aethiopica</i>	CL, DCL ^γ	<i>P.longipes</i> <i>P.pedifer</i>	ύραξ(Hyrax)	Κένυα, Αιθιοπία
Νέος κόσμος				
<i>L.mexicana</i>	CL	<i>Lu.olmeca</i>	τροκτικά	Μεξικό, Μπελιζέ, Γουατεμάλα
<i>L.amazonensis</i>	CL, DCL, VL	<i>Lu.flaviscutellata</i>	τροκτικά	Τροπικά δάση Ν.Αμερικής
<i>L.peruviana</i>	CL	<i>Lutzomyia spp.</i>	σκύλος	Δυτ. Άνδεις Περού, Αργεντινή
<i>L.guyanensis</i>	CL, DCL ^γ , MCL	<i>Lu.umbratilis</i>	βραδύποδες, μυρμηγκοφάγοι οπόσσουμ	Γουινέα, Σουρινάμ, Βραζιλία
<i>L.panamensis</i>	CL, MCL	<i>Lu.trapidoi</i>	βραδύποδες	Παναμάς, Κόστα Ρίκα, Κολομβία
<i>L.braziliensis</i>	CL, MCL, DCL	<i>Lutzomyia spp</i> <i>Psychodopygus</i> <i>Wellcomei</i>	τροκτικά, περιοικιστικά ζώα, οπόσσουμ	Τροπικά δάση Νότιας και Κεντρικής Αμερικής

Πίνακας 1: *Η πιο συνήθης μορφή κλινικής εκδήλωσης σημειώνεται με **κόκκινο** VL (σπλαχνική λεισμανίαση), PKDL (post Kala-Azar δερματική λεισμανίαση), MCL (βλεννογονοδερματική λεισμανίαση), DCL (διάχυτη δερματική λεισμανίαση)
^α το είδος αυτό θεωρείται συνώνυμο με το είδος *L.infantum*, ^β σύμφωνα με καινούρια μοριακά δεδομένα η ύπαρξη του *L.archibaldi* αμφισβητείται (Ibrahim et al., 2001; Lewin et al., 2002; Mauricio et al., 2004; Quispe Tintaya et al., 2004; Kuhls et al., 2005), ^γ κατά τη διάρκεια ανοσοκαταστολής

Σπλαχνική Λεισμανίαση

(Visceral Leishmaniasis/ Kala-Azar/ Dum Dum fever)

Η σπλαχνική λεισμανίαση, γνωστή και ως Kala-Azar (μαύρος πυρετός), προκαλείται από τα παράσιτα του είδους *L.d.donovani* στην Ινδία και στην Αφρική, ενώ παράσιτα *L.d.infantum* προκαλούν τη νόσο στη Μεσόγειο καθώς και στην Κεντρική και Νότια Αμερική (WHO, 2006a).

Η σπλαχνική λεισμανίαση είναι η πιο σοβαρή από τους τρεις τύπους της νόσου. Σε αυτό τον τύπο το παράσιτο επιτίθεται συστηματικά και εξαπλώνεται σε ολόκληρο το σώμα, μολύνοντας τα μακροφάγα κύτταρα του οργανισμού, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρουν το παράσιτο στον σπλήνα, στα λεμφοειδή γάγγλια, στο ήπαρ και στο μυελό των οστών.

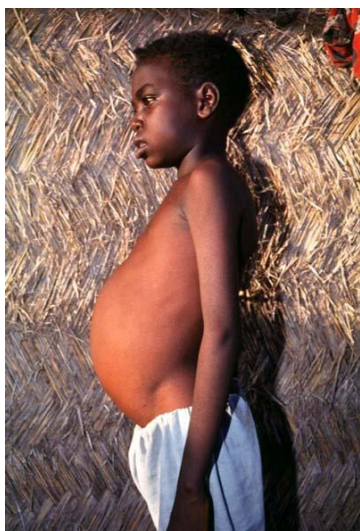
Η περίοδος επώασης αν και είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ακριβώς, κυμαίνεται από 2-6 μήνες.

Τα τυπικά συμπτώματα της νόσου είναι διαλείπων πυρετός, ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια, νυχτερινές εφιδρώσεις, κόπωση, αδυναμία, ανορεξία, διάρροια, σταδιακή απώλεια βάρους, εμετοί, βήχας, δερματικά έλκη και απώλεια μαλλιών. Τα αιματολογικά ευρήματα είναι τα εξής: λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία, αναιμία και υπερ-γ-σφαιριναιμία.

Στα προχωρημένα στάδια της νόσου μπορούν να εμφανιστούν οιδήματα, διάφορες αιμορραγικές εκδηλώσεις καθώς και άλλες θανατηφόρες επιπλοκές από τις λοιμώξεις, όπως η πνευμονία, η δυσεντερία και η φυματίωση.

Σε περίπτωση που δεν υπάρξει θεραπεία το αποτέλεσμα είναι ο θάνατος του ξενιστή εξαιτίας της καταστροφής του ήπατος, του πυρετού, της απώλειας βάρους και συχνά των δευτερογενών λοιμώξεων.

Η σπλαχνική λεισμανίαση είναι άκρως επικίνδυνη για τους ασθενείς που πάσχουν από AIDS, επειδή το αποδιοργανωμένο ανοσιακό σύστημα εξασθενεί ακόμη περισσότερο από την απώλεια των μακροφάγων (WHO, 1996).



Εικόνα 4: Σπλαχνική λεισμανίαση, είναι εμφανής η ηπατομεγαλία και η σπληνομεγαλία (WHO, 2006b).

Post Kala-Azar δερματική λεισμανίαση

Μετά από την επιτυχή θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης, οι ασθενείς που έχουν μολυνθεί με το είδος *L. donovani* μπορεί να εμφανίσουν την post Kala-Azar δερματική λεισμανίαση (Post Kala-Azar dermal leishmaniasis, PKDL) (Pearson et al., 1983b). Περίπου 50-60% του πληθυσμού των ασθενών που θεραπεύτηκε από σπλαχνική λεισμανίαση εμφανίζουν την PKDL.

Ο Ινδικός τύπος της PKDL εμφανίζεται σε περίπου 10% των Ινδών ασθενών 2 με 3 χρόνια μετά τη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης, σε αυτές τις περιπτώσεις εμφανίζονται διάσπαρτες δερματικές αλλοιώσεις (υπόχρωμες κηλίδες, ερύθημα, οζίδια). Οι υπόχρωμες κηλίδες εμφανίζονται κυρίως στον κορμό του σώματος, στους βραχίονες, στους μηρούς και στην κνήμη. Στην αρχή είναι μικρές, αλλά αυξανόμενες αθροίζονται και σχηματίζουν πλάκες. Αργότερα στην πορεία της μόλυνσης και κυρίως στο πρόσωπο εμφανίζονται οζίδια (μοιάζουν με λέπρα).

Ο Αφρικανικός τύπος της ασθένειας εμφανίζεται τους πρώτους έξι μήνες και μπορεί να παρουσιαστεί ακόμη και κατά τη διάρκεια της θεραπείας, πριν να υποχωρήσουν οι κλινικές εκδηλώσεις της σπλαχνικής νόσου. Το εξάνθημα σε αυτή την περίπτωση είναι συνήθως στικτό και μοιάζει με ιλαρά. Οι δερματικές αλλοιώσεις εμφανίζονται συνήθως γύρω από το στόμα και εξαπλώνονται σε όλο το πρόσωπο, ενώ μπορούν να εμφανιστούν και στον κορμό, στους βραχίονες, στους μηρούς και στην κνήμη.

Σε αντίθεση με τον Ινδικό τύπο ο Αφρικανικός είναι αυτοθεραπευόμενος (WHO, 2006b).

Δερματική λεισμανίαση

(Cutaneous Leishmaniasis/ Oriental Sore)

Η δερματική λεισμανίαση (εικόνα 5), γνωστή και ως «*Φύμα της Ανατολής*» είναι η πιο κοινή μορφή λεισμανίασης με 1-1,5 εκατομμύρια περιστατικά παγκοσμίως κάθε χρόνο (Desjeux, 2004b).

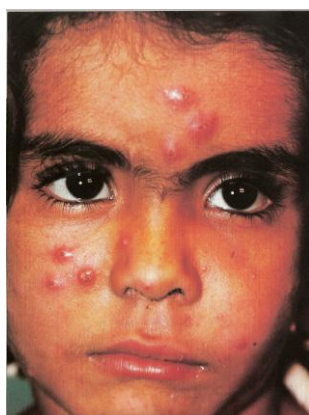
Η δερματική λεισμανίαση στον «Παλιό κόσμο» προκαλείται από τα παράσιτα *L. major* και *L. tropica*. Τα τελευταία προκαλούν δερματική λεισμανίαση ξηρού τύπου. Στα προκαταρκτικά στάδια της λοίμωξης η αλλοίωση είναι μονήρης ή πολλαπλή και εμφανίζεται ως ερυθρωματώδης βλατίδα. Τα συμπτώματα που σχετίζονται με τη δερματική λεισμανίαση είναι μικρά εξογκωμένα έλκη, εξαιρετικά ευαίσθητο δέρμα που ματώνει εύκολα στην περιοχή της αρχικής μόλυνσης, δορυφορικά έλκη (μικρά έλκη που εμφανίζονται σε απόσταση μερικών εκατοστών από την περιοχή της αρχικής

μόλυνσης). Πειραματικές έρευνες έδειξαν ότι η *Leishmania* μολύνει και κύτταρα του Langerhans (Besteiro et al., 2007).

Ξηρά έλκη μπορούν να προκαλέσουν τα παράσιτα του είδους *L.infantum* και *L.aethiopica*. Σε αυτή την περίπτωση η δερματική αλλοίωση, συνήθως, μένει στο στάδιο του οζιδίου. Και τα δυο είδη προκαλούν δερματικά έλκη στα εκτεθειμένα σημεία του σώματος. Η μόλυνση συνήθως εντοπίζεται στα σημεία του τσιμπήματος, που είναι συνήθως τα χέρια, το πρόσωπο και τα πόδια. Η επούλωση διαρκεί συνήθως 1 χρόνο και συχνά αφήνει μόνιμες ουλές.

Το παράσιτο *L.major* προκαλεί δερματική λεισμανίαση υγρού τύπου. Η αλλοίωση αναπτύσσεται όπως του ξηρού έλκους, αλλά υπάρχει τάση νέκρωσης της κεντρικής περιοχής και δημιουργία αιμορραγικής εφεκλίδας. Παρόμοια συμπτώματα αναφέρονται και στον «Νέο Κόσμο» από τα είδη *L.mexicana*, *L.amazonensis*, *L.braziliensis* κα.

Σε μερικές περιπτώσεις τα άτομα που έχουν προσβληθεί από δερματική λεισμανίαση δεν λαμβάνουν θεραπεία, επέρχεται όμως αυτόματη ίαση. Στις ανεπτυγμένες χώρες η ασθένεια θεραπεύεται φαρμακευτικά για την αποφυγή παραμορφωτικών αλλοιώσεων. Μετά την ίαση το άτομο αποκτά ανοσία. Σε μερικά άτομα η εκτεταμένη δερματική λεισμανίαση εξελίσσεται και δεν θεραπεύεται χωρίς φαρμακευτική αγωγή (Pearson et al., 1983a).



Εικόνα 5: Δερματική λεισμανίαση (WHO, 1993b)

Διάχυτη Δερματική Λεισμανίαση

Είναι μια σπάνια (1 στις 10000 μολύνσεις καταλήγουν σε αυτή τη μορφή ασθένειας (Bryceson, 1970)) της δερματικής λεισμανίασης. Κύριος υπαίτιος της DCL (Diffuse cutaneous Leishmaniasis) θεωρείται το παράσιτο *L.aethiopica*. Παράσιτα του είδους *L.amazonensis* μπορούν επίσης να προκαλέσουν DCL.

Στη Διάχυτη Δερματική Λεισμανίαση το νόσημα ξεκινά σαν πομφός που όμως δεν υπερκερατώνεται, ενώ σταδιακά εμφανίζονται μεταστάσεις σε άλλες περιοχές του δέρματος όπως στο πρόσωπο και τα άκρα. Ο κύκλος της ασθένειας είναι παρατεταμένος αλλά δεν παρατηρείται προσβολή των σπλαχνικών οργάνων.

Η ασθένεια έχει κλινική εικόνα που παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την λέπρα (Pearson et al., 1983a).

Βλεννογονοδερματική Λεισμανίαση

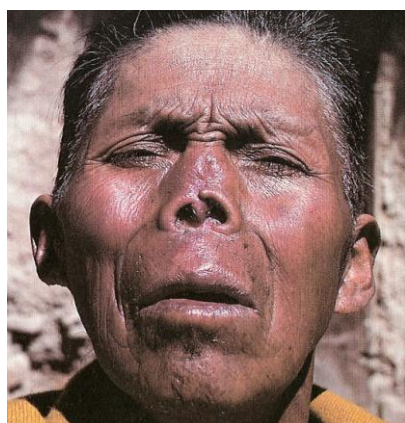
(Mucocutaneous Leishmaniasis/ Νόσος Espundia)

Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (MCL) προκαλείται από το παράσιτο *L.braziliensis*. Το παράσιτο αυτό συνήθως προκαλεί απλά δερματικά έλκη που μπορούν να οδηγήσουν σε εκτεταμένες και παραμορφωτικές βλάβες. Περίπου στο 10-20% των περιστατικών παρατηρείται δευτεροπαθής εκδήλωση MCL.

Η προσβολή των βλεννογόνων της μύτης, του οισοφάγου και της στοματικής κοιλότητας μπορεί να γίνει σε διάστημα λίγων εβδομάδων (ενώ το πρωτοπαθές έλκος είναι ακόμη ενεργό) ή μπορεί να γίνει πολλά χρόνια μετά την ίαση της αρχικής αλλοίωσης.

Εμφανίζονται δυο είδη αλλοιώσεων, ελκωτικές και μη ελκωτικές, αν και μπορεί να παρατηρηθούν και μεικτές ή ενδιάμεσες αλλοιώσεις.

Συνήθως παρατηρούνται όταν το σημείο νύγματος βρίσκεται κοντά σε βλεννογόνο. Επίσης μπορεί να προκύψει από σπλαχνική ή δερματική επέκταση. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ξηρότητα του βλεννογόνου της μύτης, καταρροή και αιμορραγία της μύτης, του παχέως εντέρου και του κόλπου, έλκη και «διάβρωση» του βλεννογόνου του στόματος, της μύτης, της γλώσσας, των ούλων και των χειλέων. Οι αλλοιώσεις που παρουσιάζονται στη MCL δεν επουλώνονται αυτόματα. Εάν δε χορηγηθεί θεραπευτική αγωγή δημιουργούνται προοδευτικά εκτεταμένες και παραμορφωτικές αλλοιώσεις (Haralambous, 2007).



Εικόνα 6: Βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (WHO, 1993b)

Ασυμπτωματικός Παρασιτισμός

Ένας σημαντικός αριθμός ατόμων που μολύνονται με το είδος *L.infantum* δεν εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα. Σε ενδημικές περιοχές έχει βρεθεί ότι το 3-30% του πληθυσμού είναι οροθετικό. Γενικά υπολογίζεται ότι ένα στα πέντε με δέκα φυσιολογικά άτομα που μολύνονται με το παράσιτο, αναπτύσσουν την νόσο (Alvar et al., 1997).

Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι σε ενδημικές περιοχές της Μεσογείου, οι σκύλοι εμφανίζουν πολύ υψηλά ποσοστά οροθετικότητας, γύρω στα 10-37% (Solano-Gallego et al., 2001) και είναι αρκετά σύνηθες τα περισσότερα από αυτά να είναι ασυμπτωματικά.

Η μόλυνση με το είδος *L.donovani* θεωρείται ότι είναι πιθανότερο να προκαλέσει κλινικά συμπτώματα, αν και η υποκλινική λοίμωξη είναι πάντα πιο κοινή σε σχέση με το κλινικό σύνδρομο.

Η ύπαρξη ενός ασυμπτωματικού πληθυσμού μπορεί να αποκαλυφθεί σε παθολογικές καταστάσεις του ανοσοποιητικού συστήματος όπως για παράδειγμα σε άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV) (Gillis et al., 1995).

Η σημασία της ύπαρξης ασυμπτωματικού πληθυσμού για την παραμονή των παρασίτων σε μια περιοχή είναι δύσκολο να εκτιμηθεί. Είναι πιθανό ότι το δέρμα των ασυμπτωματικών φορέων αποτελεί δεξαμενή παρασίτου από όπου μπορούν να μολυνθούν τα έντομα ξενιστές κατά τη διάρκεια της διατροφής τους.

Στατιστικά στοιχεία -Γεωγραφική κατανομή

Η λεισμανίαση απαντάται γεωγραφικά σε σχεδόν σε όλες τις ηπείρους (εκτός από την Αυστραλία και την Ανταρκτική) και είναι ενδημική στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές 88 χωρών (72 αναπτυσσόμενες και 16 αναπτυγμένες). Περίπου 350 εκατομμύρια άνθρωποι κινδυνεύουν να μολυνθούν σε κάποια φάση της ζωής τους. Ανά την υφήλιο περίπου 14 εκατομμύρια άνθρωποι είναι μολυσμένοι και κάθε χρόνο καταγράφονται περίπου 2 εκατομμύρια καινούρια περιστατικά (WHO, 2006a).

Στις 34 από τις 88 χώρες που ενδημεί η νόσος έχουν αναφερθεί περιπτώσεις σύμμεκτης λοίμωξης με τον ιό HIV. Η λεισμανίαση σε συνδυασμό με τον ιό HIV απαιτεί επείγουσα θεραπεία. Στις περιπτώσεις αυτές τα άτομα ακόμη και στην περίπτωση που λαμβάνουν τη σωστή φαρμακευτική αγωγή, υποτροπιάζουν και το αποτέλεσμα είναι συχνά θανατηφόρο (WHO, 2006a).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), το άθροισμα χρόνων ζωής που έχουν χαθεί λόγω της ασθένειας αγγίζει τα 2,4 εκατομμύρια (WHO, 2002) κάτι που την τοποθετεί τρίτη σε σχέση με άλλα παρασιτικά νοσήματα. Λόγω έλλειψης επαρκών και αξιόπιστων δεδομένων δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα πραγματικά περιστατικά λεισμανίασης είναι κατά πολύ περισσότερα από αυτά που αναφέρονται επίσημα (WHO, 2002).

Κάθε χρόνο εμφανίζονται 500.000 νέα κρούσματα σπλαχνικής λεισμανίασης (90% στη Βραζιλία, στην Ινδία, στο Μπαγκλαντές, στο Νεπάλ και στο Σουδάν) με θνησιμότητα πάνω από 50.000 θανάτους τον χρόνο και 1.500.000 περιστατικά δερματικής λεισμανίασης (90% στην Αλγερία, στο Αφγανιστάν, στη Βραζιλία, στο Ιράν, στο Περού, στη Σαουδική Αραβία και στη Συρία) (Desjeux, 2004a).

Η θνησιμότητα παγκοσμίως είναι δύσκολο να υπολογιστεί επειδή σε πολλές, αναπτυσσόμενες κυρίως, χώρες δεν γίνεται διάγνωση, ιδιαιτέρως στις περιοχές που δεν υπάρχει πρόσβαση στην φαρμακευτική αγωγή.

Αντικειμενικά στοιχεία για τους ακριβείς αριθμούς των ασθενών και των θανάτων δεν είναι διαθέσιμα για τους εξής λόγους :

1. η μετάδοση της νόσου συμβαίνει σε απομακρυσμένες αγροτικές περιοχές και σε πολλές περιπτώσεις δεν γίνεται διάγνωση επειδή οι ασθενείς δεν έχουν πρόσβαση σε ιατρική βοήθεια
2. η λεισμανίαση κοινοποιείται μόνο στις 33 από τις 88 χώρες στις οποίες είναι ενδημική (WHO, 2006b).

Ιστορική αναδρομή

Η ασθένεια της λεισμανίασης αναφέρεται στην Αφρική και στην Ινδία από τα μέσα του 18^{ου} αιώνα, ενώ στην Αμερική διάφορα στοιχεία φανερώνουν την ύπαρξη της ασθένειας για τουλάχιστο 1000 χρόνια (Allison, 1993).

Η πρώτη ένδειξη ότι τα παράσιτα του γένους *Leishmania* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο αποκαλύφθηκε σε μια σοβαρή σπλαχνική νόσο που ονομάστηκε Kala-Azar (μαύρος πυρετός). Το 1885, ο Gunningham παρατήρησε για πρώτη φορά ένα μικροοργανισμό στο εσωτερικό των μακροφάγων που είχαν απομονωθεί από μια δερματική πληγή.

Το 1903 στην Καλκούτα, ο Leishman ανακάλυψε ένα μικροοργανισμό σε επίχρισμα σπλήνα ενώ τον ίδιο χρόνο ο Donovan, σε νοσοκομείο του Μάντρας, έκανε παρόμοιες μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Συγχρόνως ο Ross ασχολήθηκε με την κατάταξη-ταξινόμηση του παρασίτου και δημιουργήσε το γένος *Leishmania* για το συγκεκριμένο παράσιτο. Προς τιμήν των Leishman και Donovan, για το είδος του παρασίτου χρησιμοποίησε το όνομα *Leishmania donovani*.

Τα πρώτα δεδομένα για τη δερματική λεισμανίαση προέκυψαν από τον Wright ο οποίος περιέγραψε έναν παράγοντα που βρήκε στη δερματική πληγή μιας κοπέλας από την Αρμενία.

Το 1904, ο Mesnil παρατήρησε την ομοιότητα που υπήρχε μεταξύ των μικροοργανισμών που παρατηρούνταν στις δερματικές πληγές και αυτών που παρατηρούνταν στις σπλαχνικές μορφές. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δερματική πληγή, λόγω της χαρακτηριστικής της μορφής, ονομάστηκε «Φύμα της Ανατολής». Το 1906, ο Luhe ταξινόμησε το παράσιτο στο γένος *Leishmania*. Ο παθογόνος παράγοντας που απομονώθηκε στο «Φύμα της Ανατολής» ονομάστηκε *L.tropica*.

Το 1914 οι Yakimoff και Schokhor διέκριναν δυο διαφορετικά «είδη» παρασίτων που θεωρήθηκαν υπεύθυνα για τη δερματική λεισμανίαση αλλά προκαλούσαν διαφορετική κλινική εικόνα λόγω της διαφορετικής ταχύτητας εμφάνισης πληγής. Οι ερευνητές βάση αυτής της παρατήρησης διαχώρισαν δυο διαφορετικές «ποικιλίες» παρασίτων: την ποικιλία *L.tropica major* και *L.tropica minor*.

Το 1973, ο Bray (Bray, 1974) αντιμετώπισε τις δυο ποικιλίες ως ξεχωριστές ταξινομικές μονάδες, κάτι που οδήγησε στη μετονομασία τους και στα δυο είδη παρασίτων που γνωρίζουμε σήμερα (*Leishmania major* και *Leishmania tropica*). Η ταξινόμηση αυτή για τα παράσιτα του Παλαιού Κόσμου ισχύει μέχρι σήμερα.

Επιδημιολογία

Η επιδημιολογία της λεισμανίασης σε μια περιοχή, καθορίζεται από τα είδη του παρασίτου που επικρατούν, από τους ενδιάμεσους ξενιστές καθώς και από τους τελικούς ξενιστές. Πολλοί παράγοντες, που έχουν άμεση σχέση με τα παραπάνω, μπορούν να επηρεάσουν τη μετάδοση της ασθένειας:

- ✓ σπίτια σε περιοχές αναπαραγωγής/ ξεκούρασης σκνιπών
- ✓ είδος σπιτιού
- ✓ ανοσοποιητική κατάσταση και επάγγελμα ξενιστή
- ✓ μολυσματική δύναμη του στελέχους κτλ.

Οι ραγδαίες μεταβολές των περιβαλλοντικών και κλιματολογικών συνθηκών (τόσο σε παγκόσμιο όσο και σε περιφερειακό επίπεδο) επηρεάζουν τους ενδογενείς παράγοντες της νόσου, γεγονός που σημειώνεται και σε άλλες μολυσματικές ασθένειες. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται -εν μέρει- στην πλαστικότητα των ειδών *Leishmania* και την ικανότητα των ενδιάμεσων ξενιστών να αναπτύσσουν μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να προσαρμόζονται και να εξελίσσονται.

Η λεισμανίαση είναι νόσος που είναι άμεσα συνδεδεμένη με την φτώχεια. Σε αυτό συμβάλουν διάφοροι παράγοντες όπως: κακές συνθήκες στέγασης και υγιεινής, έλλειψη μέτρων προστασίας, συχνές μεταναστεύσεις και εργασίες που φέρνουν τους ανθρώπους αυτούς σε συχνή επαφή με τις σκνίπες. Η φτώχεια συνδέεται με τον υποσιτισμό καθώς και με διάφορες μολυσματικές νόσους, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εκδήλωσης της ασθένειας. Η έλλειψη πρόσβασης σε σωστή διάγνωση και θεραπεία αυξάνει την θνησιμότητα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Πολλοί ασθενείς από τις χώρες αυτές αναγκάζονται να πουλήσουν τα λιγοστά τους περιουσιακά τους στοιχεία (χωράφια, ζώα) για να βρουν χρήματα για την φαρμακευτική αγωγή, βάζοντας έτσι την οικογένειά τους σε ένα φαύλο κύκλο «ασθένειας - φτώχειας - υποσιτισμού- ασθένειας» (WHO, 2006b).

Σε πολλές περιοχές του κόσμου αρχίζει να διαφαίνεται ο κίνδυνος μετάδοσης της λεισμανίασης στα αστικά κέντρα, στα οποία περιλαμβάνονται το Αφγανιστάν, η Βραζιλία και περιοχές της Κεντρικής Αμερικής. Ο κίνδυνος νόσησης από λεισμανίαση αυξάνει ανάλογα με το χρόνο παραμονής στις ενδημικές περιοχές (χάρτης 2), αλλά έχουν αναφερθεί και κρούσματα της νόσου και σε ταξιδιώτες οι οποίοι παρέμειναν εκεί μόνο μία μέρα.

Ο αριθμός των περιπτώσεων αυξάνεται λόγω της σταδιακής μετακίνησης των πληθυσμών, έκθεσης μη ανοσοποιημένων ατόμων στο παράσιτο, κοινωνικών και οικονομικών περιορισμών στις αγροτικές περιοχές, του υποσιτισμού (με αποτέλεσμα την

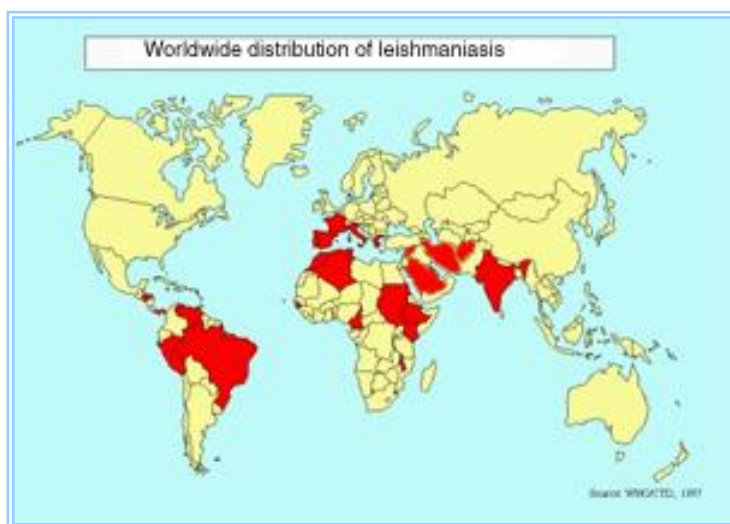
εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος) και ταυτόχρονης μόλυνσης με τον ιό HIV.

Συνήθως οι ασθενείς πρέπει να ξεπεράσουν σημαντικά οικονομικά προβλήματα για να έχουν πρόσβαση στη θεραπεία και να διανύσουν μεγάλες αποστάσεις για να φτάσουν στα ιατρικά κέντρα. Σημαντικό ρόλο, για την εξάπλωση της λεισμανίασης, παίζει η έλλειψη μεταφορικού μέσου και η ακριβή θεραπεία.

Αυτοί είναι οι λόγοι για τους οποίους πολύ συχνά διακόπτεται η θεραπεία και εμφανίζεται ανοχή στη φαρμακευτική αγωγή (WHO, 2006b).

Τα σημεία αναπαραγωγής των σκνιπών, οι συνήθειες πετάγματος και διατροφής τους, ο βαθμός ανθρωποφιλίας ή ζωοφιλίας, η αποδοτικότητα της μετάδοσης καθώς και η διάρκεια ζωής των σκνιπών, είναι σημαντικοί παράγοντες της μόλυνσης και η μελέτη τους μπορεί να βοηθήσει στην εφαρμογή κατευθυνόμενων μέτρων πρόληψης.

Επιπρόσθετα έχει παρατηρηθεί μια αύξηση στα περιστατικά λεισμανίασης, κυρίως λόγω της αυξανόμενης ανοσοκαταστολής, των κλιματολογικών αλλαγών και της εμφάνισης ανοχής στα φάρμακα πρώτης γραμμής (WHO, 2006b).



Χάρτης 2: Παγκόσμια κατανομή της λεισμανίασης.

Οι ενδημικές χώρες σημειώνονται με κόκκινο. Η λεισμανίαση είναι ενδημική σε 88 χώρες. Από τη Βόρεια Αργεντινή έως το Νότιο Τέξας (εκτός από την Ουρουγουάη, τη Χιλή και το Καναδά), στη Νότια Ευρώπη, την Ασία (εκτός από την Νοτιοανατολική Ασία), στη Μέση Ανατολή και στην Αφρική. Στην Αφρική τα περιστατικά είναι πιο κοινά στην Ανατολική και Βόρεια πλευρά.

(<http://www.who.int/ctd/html/leis.html>)

Η Λεϊσμανίαση στην Ελλάδα

Στη χώρα μας, το πρώτο περιστατικό λεϊσμανίασης αναφέρθηκε το 1907 στην Κρήτη (Stoney-Archer, 1907).

Το 1992, ανιχνεύτηκαν ειδικά αντισώματα στο 3,9% των 1958 δειγμάτων αιμοδοτών που εξετάστηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Haralampidis, 1992). Το 2003, σε ανάλογη μελέτη στην Κρήτη που αφορούσε 2000 αιμοδότες, οι 33 (1,65%) βρέθηκαν θετικοί για το παράσιτο (Kyriakou et al., 2003).

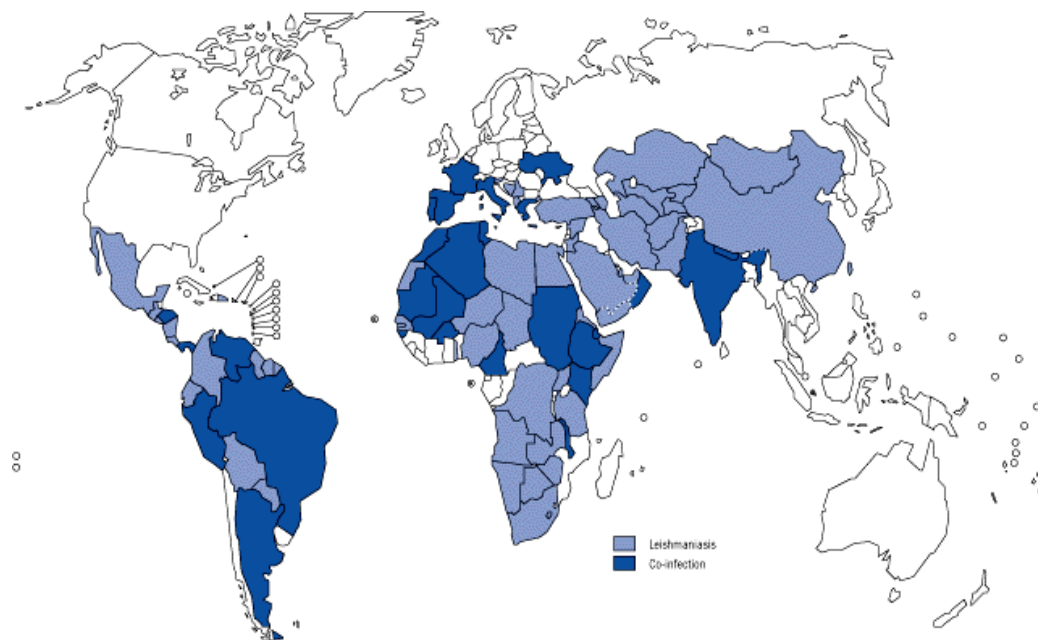
Στη Ελλάδα όμως, το πρόβλημα εντοπίζεται κυρίως στους σκύλους. Οι σκύλοι φαίνεται ότι είναι οι κύριοι ξενιστές του παρασίτου στις περισσότερες αστικές περιοχές και παρατηρείται μεγάλο ποσοστό σκύλων που είναι ασυμπτωματικοί φορείς του παρασίτου. Σε ασυμπτωματικούς σκύλους, 22-25% βρέθηκαν να έχουν αντισώματα έναντι του παρασίτου (Papadopolou et al., 2005). Έχει επίσης αναφερθεί, ότι στους σκύλους που παρουσίαζαν συμπτώματα ύποπτα του νοσήματος, ανιχνεύτηκαν (με τη δοκιμασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού) ειδικά αντισώματα στο 48,4% των ορών (Sideris et al., 1996). Ανάλογες μελέτες το 2003 και το 2005 επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα αυτά (Ikonopoloulos et al., 2003; Papadopolou et al., 2005), ενώ έχουν αναφερθεί και υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης (Leontides et al., 2002).

Στη Ελλάδα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί τα στελέχη *L.infantum* από ανθρώπους και σκύλους με σπλαχνική λεϊσμανίαση (Tzamouranis et al., 1984), αλλά και στελέχη *L.tropica* από δερματικές αλλοιώσεις (Garifallou et al., 1984). Τα περιστατικά δερματικής λεϊσμανίασης που αναφέρονται στη χώρα μας οφείλονται, στις μέρες μας, στο είδος *L.tropica*, ενώ για την σπλαχνική λεϊσμανίαση υπεύθυνο είναι το είδος *L.infantum*.

Σύμμεικτη λοίμωξη HIV/ *Leishmania*

Το πρώτο περιστατικό σπλαχνικής λεισμανίασης σε ασθενή προσβεβλημένο με τον ιό HIV αναφέρεται από τους De la Loma et al. (de la Loma et al., 1985) το 1985. Από τη χρονολογία αυτή παρατηρείται μια σταθερή αύξηση των περιστατικών σύμμεικτης λοίμωξης που αναδεικνύεται ως εξαιρετικά σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας.

Ένα οροθετικό άτομο είναι πιθανότερο να εμφανίσει λεισμανίαση ύστερα από επαφή με το πρωτόζωο μέσω μολυσμένου εντόμου και η ανάπτυξη σπλαχνικής λεισμανίασης μικραίνει το διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της μόλυνσης με HIV και την έναρξη της ασθένειας του AIDS και ελαττώνει τη διάρκεια ζωής των ασθενών. Το AIDS φαίνεται πως είναι υπεύθυνο για την αύξηση κινδύνου εμφάνισης σπλαχνικής λεισμανίασης, στις ενδημικές περιοχές (χάρτης 3) έως και 1000 φορές.



Χάρτης 3: Παγκόσμια κατανομή περιπτώσεων σύμμεικτης λοίμωξης *Leishmania*/ HIV κατά την περίοδο 1990-1998. Οι μοβ περιοχές δείχνουν τις περιοχές με λεισμανίαση. Οι μπλε περιοχές δείχνουν τη σύμμεικτη λοίμωξη *Leishmania*/ HIV (WHO, 2000)

Από την στιγμή που η λεισμανία και ο ιός HIV καταστρέφουν τα ίδια στοιχεία του ανοσιακού συστήματος είναι πολύ δύσκολο να γίνει θεραπεία της παρασίτωσης. Στη νοτιοδυτική Ευρώπη, οι μελέτες έδειξαν ότι το πεντασθενές αντιμόνιο αρχικά είναι αρκετά καλή θεραπεία με ποσοστά επιτυχίας έως 83%. Παρόλα αυτά το 52% των ασθενών υποτροπιάζουν 1 έως 4 φορές σε διάστημα 3 ετών (WHO, 2000; WHO, 2006b).

Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί μια μεγάλη επιδημιολογική αλλαγή στην περιοχή της Μεσογείου, καθώς ενώ παλιά η σπλαχνική λεισμανίαση ήταν παραδοσιακά παιδικό νόσημα, σήμερα περιστατικά σπλαχνικής λεισμανίασης/ HIV έχουμε κυρίως σε άντρες μεταξύ 31 και 50 χρόνων. Η αύξηση των περιστατικών οφείλεται κυρίως στην επικάλυψη της γεωγραφικής κατανομής όπου παρατηρούνται τα δυο αυτά νοσήματα (Desjeux, 1999a; Desjeux, 2001).

Οι ασθενείς με *Leishmania*/ HIV σύμμεικτη λοίμωξη δρουν ως δεξαμενή του παρασίτου καθώς αυτό αναπτύσσεται σε μεγάλους αριθμούς στους ιστούς και στο αίμα τους. Έτσι, έχει αναφερθεί η μετάδοση της νόσου μέσω μολυσμένων σκνιπών ή και συριγγών από άνθρωπο σε άνθρωπο παρόλα που στην Ευρώπη η νόσος είναι καθαρά ζωνοτικού τύπου (Cruz et al., 2002b).

Οι ασθενείς με AIDS είναι ευαίσθητοι σε ευκαιριακές μολύνσεις καθώς το ανοσοποιητικό τους σύστημα δεν μπορεί να τις αντιμετωπίσει εύκολα. Έτσι έχουν αυξημένο κίνδυνο να μολυνθούν με το παράσιτο *Leishmania*, το οποίο μάλιστα καταστρέφει τα ίδια κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που καταστρέφει και ο ιός HIV, επιδεινώνοντας έτσι την κατάσταση του ασθενή και κάνοντάς τον ακόμη πιο επιρρεπή σε ευκαιριακές λοιμώξεις.

Σε αυτές τις περιπτώσεις η διάγνωση είναι δύσκολη επειδή δεν παράγουν αντισώματα έναντι του παρασίτου.

Ενδιάμεσοι ξενιστές

Η μετάδοση του παρασίτου γίνεται με διάφορα είδη σκνιπών που ποικίλουν ανάλογα με τη χώρα που ενδημούν. Γενικά υπάρχουν γύρω στα 600 είδη σκνιπών (κατατάσσονται στην τάξη *Diptera*, οικογένεια *Psychodidae* και υπο-οικογένεια *Phlebotominae* που περιλαμβάνει 6 γένη), από τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι περίπου 80 είδη είναι μεταδότες του παρασίτου *Leishmania spp* (Sacks et al., 2001; Kamhawi, 2006). Μόνο οι θηλυκές σκνίπες μεταδίδουν το παράσιτο (επειδή τρέφονται με αίμα, ενώ τα αρσενικά τρέφονται με νέκταρ φυτών).

Στην Ελλάδα και γενικά στην Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική είναι υπεύθυνες οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* (εικόνα 7α) (κυρίως τα είδη *P.papatasi*, *P.sergenti*, *P.argentipes*, *P.ariasii*, *P.neglectus*, *P.perfiliewi*, *P.tobbi* και *P.similes*). Στην Αμερική το παράσιτο μεταδίδεται από σκνίπες του γένους *Lutzomyia* (εικόνα 7β) (κυρίως τα είδη *Lu.longipalis* και *Lu.flaviscutellata*).

Οι φλεβοτόμοι αφθονούν όπου υπάρχει μεγάλη βλάστηση με υγρασία και κατάλληλη θερμοκρασία. Είναι μικρά δίπτερα έντομα μεγέθους 2-3 χιλιοστών. Το χρώμα του σώματός των είναι λευκό και μετά την απομύζηση αίματος εμφανίζει μια κόκκινη κηλίδα.



Εικόνα 7: Σκνίπες του γένους *Phlebotomus* (α) και *Lutzomyia* (β)
(<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>)

Οι πτητικές ικανότητες της σκνίπας δεν είναι πολύ καλές, υπολογίζεται ότι δεν ξεπερνούν το πρώτο με δεύτερο όροφο μιας πολυκατοικίας και συνήθως επιτίθενται στο θύμα τους, όταν αυτό κοιμάται ή είναι ακίνητο. Κατά τη διάρκεια της ημέρας οι ενήλικες σκνίπες κρύβονται σε δέντρα και θάμνους, καθώς και σωρούς σκουπιδιών, σε σπηλιές, πέτρες ή χώμα.

Η διάρκεια ζωής των ενήλικων εντόμων είναι περίπου 2 εβδομάδες.

Η μετάδοση γίνεται συνήθως τους θερμούς μήνες (Απρίλης-Οκτώβρης) και κυρίως μεταξύ της δύσης και της αυγής (Killick-Kendrick et al., 2002).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η είσοδος και η εγκατάσταση του παρασίτου στον τελικό ξενιστή διευκολύνεται σε μεγάλο βαθμό από τη σίελο της σκνίπας, η οποία έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη μολυσματικότητα της *Leishmania* (Cruz et al., 1993; Tselentis et al., 1994). Η σίελος περιέχει φαρμακολογικά ενεργά υποστρώματα που γενικά αναστέλλουν τους αιμοστατικούς μηχανισμούς του ξενιστή και προκαλούν αγγειοδιαστολή και τοπική ανοσοκαταστολή (Kamhawi, 2006).

Δεξαμενή (reservoir) του παρασίτου

Ο σκύλος είναι ο κυριότερος ξενιστής-δεξαμενή στη σπλαχνική λεισμανίαση ζωνοτικού τύπου, που προκαλείται από το παράσιτο *L. infantum*. Σε μερικές περιοχές, θεωρείται ότι ορισμένα άγρια ζώα (αλεπού, τσακάλι, τρωκτικά, λύκοι) μπορούν επίσης να δράσουν ως δεξαμενές του παρασίτου.

Ο άνθρωπος θεωρείται τυχαίος ξενιστής, αν και πρόσφατα έχει γίνει εμφανής ένας ανθρωπονοτικός κύκλος σε χρήστες ναρκωτικών ουσιών μέσω των μολυσμένων συριγγών που μοιράζονται (Cruz et al., 2002b).

Στη σπλαχνική λεισμανίαση του ανθρωπονοτικού τύπου (από άνθρωπο σε άνθρωπο, μέσω σκνίπας) (*L. donovani*, Ανατολική Αφρική, Ινδική χερσόνησος) δεξαμενή είναι κυρίως ο άνθρωπος (WHO, 1996; Hommel, 1999).

Το είδος *L. tropica* προκαλεί δερματική λεισμανίαση σε πολλές χώρες της δυτικής Ασίας και είναι κυρίως ανθρωπονοτικού τύπου, αλλά έχει απομονωθεί και από σκύλους (Dereure et al., 1991). Ως ξενιστές-δεξαμενή της δερματικής λεισμανίαση που προκαλείται από το παράσιτο *L. major* φαίνεται να είναι διαφορά τρωκτικά.

Στη δερματική λεισμανίαση που προκαλείται από πολλά παράσιτα του «Νέου Κόσμου», σημαντικό ρόλο ως δεξαμενή φαίνεται να έχουν διάφορα ζώα όπως οι βραδίποδες, οι μυρμηγκοφάγοι, τα ύραξ, τα οπόσσουμ, τα διάφορα τρωκτικά του δάσους (εικόνα 8) καθώς και ο σκύλος (Arias et al., 1981; Reithinger et al., 1999).



Εικόνα 8: Ξενιστές-δεξαμενή Λεισμανίασης

Εξέλιξη παρασίτου – Βιολογικός κύκλος ζωής

Ο βιολογικός κύκλος ζωής (σχήμα 3) του παρασίτου περιλαμβάνει:

- ✓ ανάπτυξη του παρασίτου σε ενδιάμεσο ξενιστή.
- ✓ Ανάπτυξη του παρασίτου στον τελικό ξενιστή όπως σε σαρκοφάγα ζώα, τρωκτικά κ.ά. καθώς και τον άνθρωπο (Vogiatzaki, 1999).

Αναλυτικότερα :

Η μετακυκλική προμαστιγώτη μορφή του παρασίτου *Leishmania* μεταδίδεται στον τελικό ξενιστή από μολυσμένες θηλυκές σκνίπες (γένους *Phlebotomus* και *Lutzomyia*). Στον ξενιστή, τα μετακυκλικά προμαστιγώτα φαγοκυτταρώνονται από τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα κύτταρα των τοπικών ιστών και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε αμαστιγώτα.

Αυτά καταφέρνουν να επιζήσουν και να πολλαπλασιαστούν στο όξινο περιβάλλον των φαγολυσσώματων των μακροφάγων. Τελικά επέρχεται λύση των μακροφάγων και τα αμαστιγώτα που απελευθερώνονται στη συνέχεια μολύνουν καινούρια μονοκύτταρα/ μακροφάγα κύτταρα (Russell et al., 1999).

Η καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων και η προσβολή νέων, επαναλαμβάνεται συνήθως κάθε 12-24 ώρες. Όταν η ενδοκυτταρική ανάπτυξη των αμαστιγώτων παραμένει εντοπισμένη στο σημείο του ενοφθαλμισμού, η ελευθέρωση κυτταροκίνων καθώς και διάφορες κυτταρικές αντιδράσεις οδηγούν στην ανάπτυξη εντοπισμένης δερματικής αλλοίωσης (δερματική λείσμανίαση).

Σε άλλες περιπτώσεις, τα μολυσμένα μακροφάγα μεταναστεύουν με το αίμα σε άλλους ιστούς, μολύνοντας έτσι τον σπλήνα, το ήπαρ και τον μυελό των οστών (σπλαχνική λείσμανίαση).

Αν και τα διάφορα είδη/ υποείδη του παρασίτου εμφανίζουν συνήθως συγκεκριμένο τροπισμό, τα χαρακτηριστικά που οδηγούν σε αυτόν δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμη.

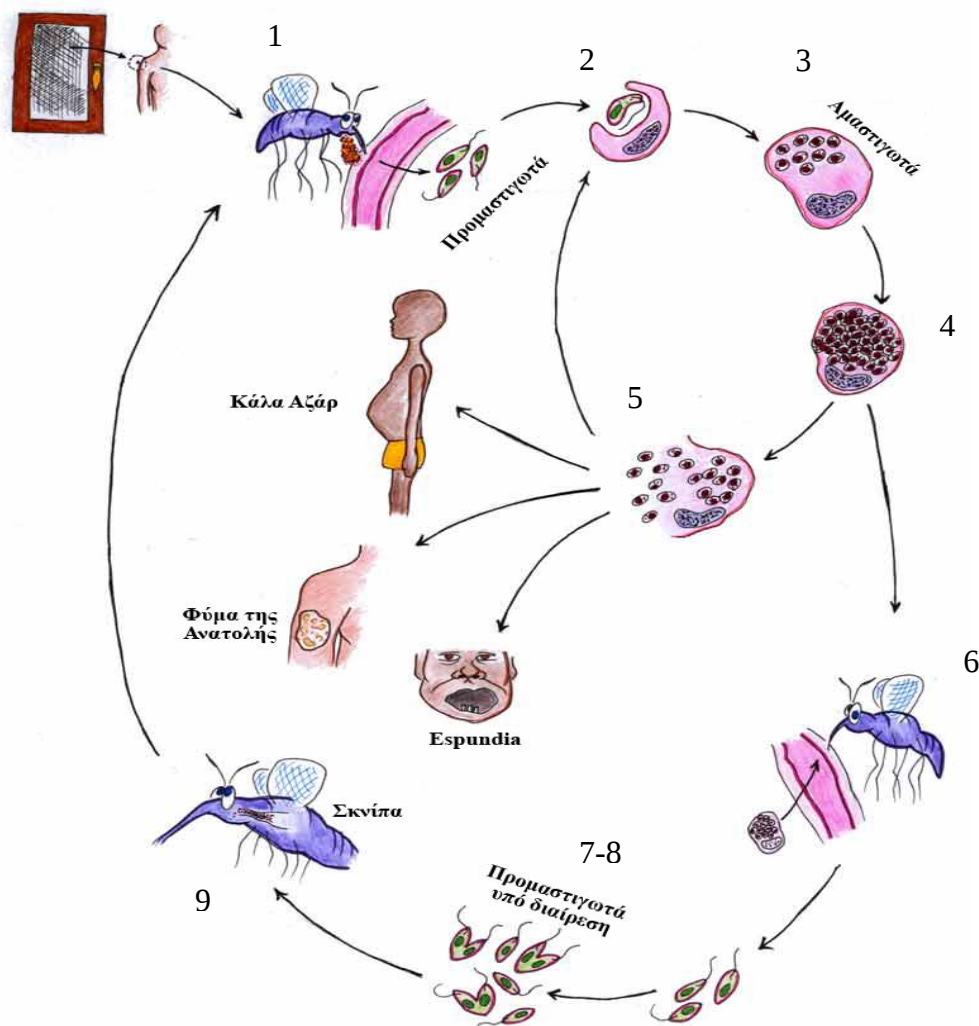
Πιστεύεται ότι ο τροπισμός εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, οι κυριότεροι εκ των οποίων είναι ο ξενιστής, ο γονότυπος του παρασίτου και η ανοσοποιητική κατάσταση του ξενιστή (Molyneux et al., 1987; Hommel, 1999).

Ο κύκλος ζωής ολοκληρώνεται με την σκνίπα που προσλαμβάνει, κατά το γεύμα αίματος, από το μολυσμένο ξενιστή (μαζί με το υγρό των ιστών) μονοκύτταρα/ μακροφάγα κύτταρα τα οποία περιέχουν αμαστιγώτες μορφές του παρασίτου.

Τα παράσιτα που προσελήφθηκαν με το γεύμα αίματος περιβάλλονται στον εντερικό αυλό της σκνίπας από περιτροφική μεμβράνη. Σε 3 περίπου μέρες, η μεμβράνη αυτή καταστρέφεται (Schlein et al., 1991). Τα αμαστιγώτα μετατρέπονται σε κινητές προμαστιγώτες μορφές (στο τμήμα του μεσέντερου της σκνίπας) και πολλαπλασιάζονται με συνεχείς διχοτομήσεις. Τα περισσότερα από

αυτά προσκολλώνται στο τοίχωμα του εντέρου με το μαστίγιό τους (Killick-Kendrick et al., 1974).

Από εκεί, 4-5 μέρες μετά την απομύζηση αίματος, τα προμαστιγωτά μετακινούνται προς την οισοφαγική βαλβίδα του θωρακικού μεσέντερου του εντόμου, με ταυτόχρονη ωρίμανση των παρασιτικών μορφών σε μετακυκλικά. Όταν τα παράσιτα καταλήξουν στο πρόσθιο έντερο γίνεται δυνατή η μετάδοσή τους κατά την απομύζηση αίματος από την σκνίπα στο σπονδυλωτό ξενιστή. Περίπου 10-200 μετακυκλικά μεταδίδονται με αυτό τον τρόπο στον ξενιστή.



Σχήμα 3: Κύκλος ζωής του παρασίτου *Leishmania*

1. είσοδος της προμαστιγωτής μορφής στο δέρμα του τελικού ξενιστή (άνθρωπος, σκύλος κα) κατά το τσίμπημα από τον ενδιάμεσο ξενιστή (σκνίπα)
2. φαγοκυττάρωση του παρασίτου από το μακροφάγο
3. δημιουργία παρασιτοφόρου φαγολυσσοσώματος και μετασχηματισμός της προμαστιγωτής μορφής σε αμαστιγωτή
4. πολλαπλασιασμός των αμαστιγωτών μορφών στο εσωτερικό του φαγολυσσοσώματος, πλήρωση του μακροφάγου από τα παράσιτα
5. ρήξη του κυττάρου και απελευθέρωση των παρασίτων
6. πρόσληψη του μολυσμένου μακροφάγου (του τελικού ξενιστή) από τη σκνίπα (ενδιάμεσος ξενιστής)
7. ελευθέρωση των παρασίτων στο έντερο ενδιάμεσου ξενιστή
8. μετασχηματισμός των αμαστιγωτών μορφών σε προμαστιγωτές
9. πολλαπλασιασμός των προμαστιγωτών μορφών στο μεσέντερο της σκνίπας, ωρίμανσή τους σε μετακυκλικά και μετανάστευσή τους προς την οισοφαγική βαλβίδα του θωρακικού μεσέντερου του ενδιάμεσου ξενιστή.

Κύτταρα Ξενιστές: Μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αποτελούν το δεύτερο μεγαλύτερο κυτταρικό πληθυσμό του ανοσιακού συστήματος. Πρόκειται για κύτταρα μυελικής προέλευσης (προέρχονται από το πολυδύναμο αρχέγονο κύτταρο), με κύρια λειτουργία τους τη φαγοκυττάρωση (Paulatou, 2004).

Στο μυελό των οστών τα κύτταρα του συστήματος μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων ωριμάζουν μέχρι τη μορφή του προμονοκυττάρου. Τα προμονοκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία, στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε μονοκύτταρα και παραμένουν περίπου 8 ώρες. Ύστερα, τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στους ιστούς και εκεί διαφοροποιούνται σε μακροφάγα.

Η ικανότητα των μακροφάγων να φαγοκυτταρώνουν ξένες ουσίες (μικρόβια και μακρομόρια) καθιστά αυτό το πληθυσμό τον κυριότερο κυτταρικό μεσολαβητή της φυσικής ανοσίας. Παράλληλα τα μακροφάγα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε όλες τις φάσεις της ειδικής ανοσιακής απάντησης (Germentis, 2000).

Τα μακροφάγα κύτταρα, επίσης, έχουν την ικανότητα να φαγοκυτταρώνουν νεκρά ή αλλοιωμένα κύτταρα του ίδιου του οργανισμού, δηλαδή αυτά που έχουν υποστεί απόπτωση. Η απομάκρυνσή τους προστατεύει τον ιστό από ενδεχόμενη φλεγμονή, που θα προκαλούσε σε αυτούς η παραμονή των κυττάρων που διαρκώς πεθαίνουν. Η διαδικασία της απομάκρυνσης είναι τόσο αποτελεσματική, ώστε να μην ανευρίσκονται νεκρά κύτταρα στους υγιείς ιστούς (Germentis, 2000).

Θεραπεία

Η αποτελεσματική θεραπεία αποτελεί την σημαντικότερη πρόκληση στο πεδίο της λείσμανιάσης καθώς :

- ✓ υπάρχουν λίγα διαθέσιμα φάρμακα, τα οποία είναι ακριβά και τοξικά
- ✓ οι ασθενείς ζούνε συνήθως σε απομακρυσμένες περιοχές, με περιορισμένη πρόσβαση σε κεντρικά νοσοκομεία και φάρμακα
- ✓ συχνές ελλείψεις των φαρμάκων ανεβάζουν ακόμη περισσότερο τις τιμές τους, ενώ η μεγάλη διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής έχει μεγάλη επίπτωση στην οικονομική κατάσταση των οικογενειών.

Η κατάσταση στο πεδίο της θεραπείας έχει βελτιωθεί αρκετά σε σχέση με τις περασμένες δεκαετίες. Καινούρια καθώς και τροποποιημένα παλιά φάρμακα έχουν περάσει ή είναι στα τελευταία στάδια κλινικών ερευνών. Τα φάρμακα αυτά όμως δεν είναι ιδανικά και χρειάζονται βελτιώσεις στη διάρκεια της αγωγής. Γίνονται επίσης προσπάθειες για την ανάπτυξη συνδυαστικών θεραπειών (Thakur et al., 2000b).

Επιπρόσθετα πολλές φορές υπάρχουν διακυμάνσεις στην αποτελεσματικότητα των φαρμάκων αναλόγως με το είδος του παρασίτου, την φαρμακοκινητική καθώς και την ανοσολογική κατάσταση των ασθενών.

Ανθεκτικά στελέχη στα φάρμακα του αντιμονίου έχουν είδη εμφανιστεί στην Ινδία, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι η ανθεκτικότητα μπορεί να εμφανιστεί και σε άλλα φάρμακα.

Είναι λοιπόν συνετό να παρθούν τα αναγκαία μέτρα για την αντιμετώπιση της λείσμανιάσης, μέσω σωστής και ελεγχόμενης φαρμακευτικής αγωγής, ελέγχου της ανθεκτικότητας του παρασίτου και της σωστής και έγκαιρης διάγνωσης της νόσου.

Τα φάρμακα που υπάρχουν εναντίον των λείσμανιάσεων προκαλούν τοξικότητα και πολύ συχνά αποτυγχάνουν στη θεραπεία.

Πεντασθενές αντιμόνιο

Τα φάρμακα πρώτης γραμμής για την αντιμετώπιση της λείσμανιάσης είναι αυτά που βασίζονται σε ενώσεις του πεντασθενούς αντιμονίου (το σκεύασμα Sodium stibogluconate με το εμπορικό όνομα Pentostam και το Meglumine antimoniate με το εμπορικό όνομα Glucantime). Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως στη δερματική καθώς και στη σπλαχνική λείσμανιάση τα τελευταία 60 χρόνια. Οι διακυμάνσεις της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου σε VL, CL και MCL είναι ένα από τα προβλήματα που εμφανίζονται σε αυτού του είδους τα θεραπευτικά σχήματα. Η αποκλειστική χρήση του φαρμάκου αυτού και πολλές φορές χωρίς ολοκλήρωση της αγωγής, έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών και κατ' επέκταση σε πολύ υψηλά ποσοστά αποτυχίας της θεραπείας. Έχει αναφερθεί ότι ποσοστό μέχρι και 65% των ασθενών στο νομό Bihar της Ινδίας δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία (Croft et al., 2006).

Πενταμιδίνη

Ως φάρμακο δεύτερης γραμμής, σε περίπτωση αποτυχίας του πεντασθενούς αντιμονίου, χρησιμοποιείται η πενταμιδίνη (Pentacarinat). Αυτό είναι ένα αρωματικό διαμινικό σύμπλοκο που χορηγείται ενδομυϊκά και είναι ικανό να καταστρέψει το DNA των πρωτόζωων. Είναι όμως ιδιαίτερα τοξικό και προκαλεί διάφορες παρενέργειες όπως υπόταση, ταχυκαρδία και έμετο. (http://www.eof.gr/E_S_2004/dra1150.htm)

Αμφοτερικίνη Β

Είναι αντιμυκητιασικό φάρμακο το οποίο χρησιμοποιείται εδώ και δύο δεκαετίες. Είναι ιδιαίτερα τοξικό και η χορήγηση πρέπει να γίνεται ελεγχόμενα και σε νοσοκομειακό περιβάλλον.

Μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί αντοχή σε αυτό το φάρμακο.

Η Λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β, προτείνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) για την αντιμετώπιση της λείσμανιάσης στον άνθρωπο και είναι καινούρια σύνθεση του προαναφερθέντος φαρμάκου, έχει μειωμένη τοξικότητα, μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και υψηλά επίπεδα δραστηριότητας στην θεραπεία της σπλαχνικής λείσμανιάσης (Sundar, 2001a).

Έχει λιγότερες παρενέργειες αλλά είναι πολύ ακριβό φάρμακο (η αδυναμία του ασθενή να καταβάλει το αντίτιμο περιορίζει τη χρήση του). Οι παρενέργειες του σκευάσματος αυτού σχετίζονται με τον τρόπο χορήγησης (πυρετός, ρίγη) (WHO, 2006b).

Παραμομυκίνη

Η αντι-λεϊσμανιακή δράση του αντιβιοτικού αυτού ήταν γνωστή από το 1960, αλλά χρειάστηκαν πολλές δεκαετίες μέχρι να αρχίσουν οι κλινικές μελέτες για τη σπλαχνική και τη δερματική λεϊσμανίαση.

Είναι αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται ως εναλλακτική θεραπεία για τη δερματική λεϊσμανίαση. Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αρκετά ενθαρρυντικά (Thakur et al., 2000a; Thakur et al., 2000b).

Καινούρια φάρμακα

Μιλτεφοσίνη

Είναι το πρώτο φάρμακο κατά της λεϊσμανίασης που χορηγείται από το στόμα. Δρα αναστέλλοντας τη μεταφορά της χολίνης του παρασίτου. Το ποσοστό επιτυχίας του φαρμάκου φτάνει έως και 97% στη σπλαχνική λεϊσμανίαση.

Παρενέργειες: η Miltefosine φαίνεται πιο ήπια σε σχέση με τα συνηθισμένα φάρμακα. Το 38% ανέφερε εμέτους και το 20% διάρροια. Αυτές οι γαστρεντερικές ενοχλήσεις διαρκούν 1-2 μέρες.

Κοστίζει λιγότερο από την Λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β και χορηγείται εύκολα ως φάρμακο που λαμβάνεται από το στόμα. Μέχρι στιγμής έχει εγκριθεί μόνο στη Γερμανία, στην Ινδία και στην Κολομβία. Έχει αναφερθεί ότι μπορεί να προκαλέσει τερατογένεση και η λήψη της πρέπει να γίνεται με επιτήρηση. Βρίσκεται στη φάση IV των κλινικών δοκιμών (WHO, 2006b).

Κόστος θεραπείας

Το φάρμακο πρώτης γραμμής για τη σπλαχνική λεισμανίαση είναι ακριβό και χορηγείται μόνο στο νοσοκομείο σε ενέσημη μορφή.

Το κόστος ενός κύκλου θεραπείας κυμαίνεται στα:

- ✓ generic sodium stibogluconate US\$ 30
- ✓ meglumine antimonite US\$ 120
- ✓ sodium stibogluconate US\$ 150

Σε περίπτωση που ο ασθενείς υποτροπιάσει το φάρμακο δεύτερης γραμμής που χρησιμοποιείται είναι ιδιαίτερα τοξικό.

- ✓ amphotericin B US\$ 60
- ✓ pentamidine US\$ 70

Η λιποσωμική αμφοτερικίνη Β δεν έχει παρενέργειες αλλά το κόστος της είναι υψηλό για τις αναπτυσσόμενες χώρες, πάνω από 1500 US\$.

Το πρώτο φάρμακο που χορηγείται από το στόμα, η *miltefosine*, κοστίζει πάνω από 150 US\$.

Το βασικό πρόβλημα είναι η πρόσβαση στη θεραπεία, λόγω υψηλού κόστους (στο κόστος εκτός από την αγορά φαρμάκων πρέπει να προστεθεί και η περίοδος διαμονής στο νοσοκομείο καθώς και η αποχή από την εργασία).

Εμβόλια

Αυτή την στιγμή δεν υπάρχουν φάρμακα ή εμβόλια για την πρόληψη της λεισμανίασης. Η ανάπτυξη εμβολίου κατά της λεισμανίασης αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους της έρευνας και γίνονται προσπάθειες, με ποικιλία μορίων-στόχων προς αυτή την κατεύθυνση. Διάφορα εμβόλια έχουν δοκιμαστεί σε ανθρώπους και σκύλους, αλλά δεν είναι έτοιμα για ευρεία χρήση.

Αρχικά προστασία κατά της δερματικής λεισμανίασης γινόταν με τη λήψη πύου από τη δερματική βλάβη και ενοφθαλμισμός του στον ασθενή. Αυτή η ακατέργαστη μορφή εμβολίου προστάτευε τον ξενιστή αλλά υπήρχε κίνδυνος σοβαρής μόλυνσης. Βασίζεται στην ικανότητα του παρασίτου να εισέρχεται στα κύτταρα και να προκαλεί την αντίδραση των Τ-λεμφοκυττάρων.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν εμβόλια με νεκρά προμαστιγωτά παράσιτα του είδους *L. major* (γίνεται με παραμονή του παρασίτου σε κλίβανο αποστείρωσης). Ούτε όμως αυτά είχαν τα επιθυμητά αποτελέσματα, ενώ βρέθηκε ότι το νεκρό παράσιτο χάνει τη δραστηριότητά του με τη πάροδο του χρόνου.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ



Διάγνωση

Η διάγνωση της λείσμανιάσης βασίζεται στη κλινική παρατήρηση, στα επιδημιολογικά δεδομένα και σε μη-ειδικές παραμέτρους. Επιβεβαιώνεται συνήθως με την παρασιτολογική μέθοδο ή/ και με μοριακές μεθόδους.

Παρασιτολογική εξέταση

Μικροσκοπική μέθοδος

Η σπλαχνική λείσμανιάση προκαλείται από παράσιτα του συμπλέγματος *L.donovani*, τα οποία εντοπίζονται στον σπλήνα, στο ήπαρ, στο μυελό των οστών και στους λεμφαδένες.

Επομένως η αναζήτηση των παρασίτων θα γίνει:

- ✓ στο μυελό των οστών
- ✓ στο σπληνικό πολφό
- ✓ στο ήπαρ
- ✓ στο περιφερικό αίμα
- ✓ σε υλικό λεμφαδένων

Οι μέθοδοι εκλογής που προτιμώνται, είναι η παρακέντηση και η δειγματοληψία από τον μυελό των οστών και τον σπλήνα. Με το βιολογικό υλικό που θα συλλέξουμε μπορούμε να κάνουμε:

- επιχρίσματα χρωσμένα με Giemsa
- καλλιέργεια σε ειδικά υποστρώματα
- ενοφθαλμισμό σε πειραματόζωα

Ειδικότερα, στα χρωσμένα επιχρίσματα, το παράσιτο αναζητείται μέσα στα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα, στα μακροφάγα και στα μονοκύτταρα, όπου παρασιτεί ανευρισκόμενο συνήθως σε μεγάλους αριθμούς.

Με τη χρώση Giemsa, ο πυρήνας καθώς και άλλα στοιχεία που περιέχουν πυρηνικό οξύ, χρωματίζονται ζωηρώς ερυθρά, ή καμιά φορά ιώδη, ενώ το πρωτόπλάσμα του παρασίτου ανοιχτό κυανούν. Επειδή όμως μερικές φορές το χρώμα του πρωτοπλάσματος της *Leishmania* συμπίπτει με το χρώμα του πρωτοπλάσματος των μακροφάγων κυττάρων, η αναγνώριση του παρασίτου θα γίνει από το ζωηρό ερυθρό χρώμα που παίρνουν τα δυο πυρηνικά μορφώματα, ο πυρήνας και ο βλεφαριδοπλάστης, ο οποίος φαίνεται μικρότερος και κοντά στον πυρήνα (Haralampidis, 2001).

Αυτή η μέθοδος αν και έχει απόλυτη ειδικότητα, έχει χαμηλή ευαισθησία και βασίζεται στην εμπειρία του εξεταστή. Επιπρόσθετα, η δειγματοληψία είναι επώδυνη και επικίνδυνη.

Εξέταση επιχρισμάτων Μυελού των Οστών

Η παρακέντηση του μυελού των οστών για τους ενήλικες είναι στην στερνική ή στη λαγόνια περιοχή, ενώ στα παιδιά μπορεί να γίνει και στην κνήμη. Μετά την παρακέντηση το υλικό παραλαμβάνεται με ήπια αναρρόφηση του μυελού, τίθεται σε γυάλινο τρυβλίο και από αυτό γίνονται γρήγορα επιχρίσματα σε αντικειμενοφόρες πλάκες, τα οποία βάφονται με χρώση Giemsa.

Εξέταση επιχρισμάτων από σπληνική παρακέντηση

Δεν γίνεται τόσο συχνά, γιατί οι επιπλοκές από την παρακέντηση είναι συχνές και αρκετά σοβαρές, διότι το παρακεντώμενο όργανο είναι πολύ διογκωμένο (προβάλλει αρκετά από το πλευριτικό τόξο) και εύθρυπτο.

Ο κίνδυνος προέρχεται από την αιμορραγία που ακολουθεί την παρακέντηση και ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται από την υπάρχουσα θρομβοπενία, τη διαταραχή πήξεως του αίματος κλπ.

Μερικοί κλινικοί υποστηρίζουν ότι η σπληνική παρακέντηση μπορεί να γίνει, αν τηρηθούν ορισμένα μέτρα, όπως η προληπτική χορήγηση ασβεστίου, η συγκράτηση του σπλήνα ακίνητου από ένα βοηθό, η χρησιμοποίηση λεπτής βελόνας προσαρμοσμένης σε ειδική σύριγγα αυτόματου αναρροφήσεως και κατά την εκτέλεση της παρακέντησης ο ασθενής να συγκρατεί την αναπνοή του.

Σε περίπτωση πραγματοποίησης της παρακέντησης, ο ασθενής βρίσκεται υπό παρακολούθηση επί 24 ώρες, με πιεστική περίδεση στο σημείο του σπληνός και σε πλήρη ανάπαυση.

Το υλικό που λαμβάνεται, επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρες πλάκες, βάφεται με χρώση Giemsa και τα παράσιτα αναζητούνται στα στοιχεία του ΔΕΣ του σπληνός και σπανιότερα στο αίμα που λήφθηκε από το σπλήνα κατά την παρακέντηση.

Και στις δυο περιπτώσεις η παρακέντηση πρέπει να γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες και από έμπειρο προσωπικό.

Εξέταση επιχρισμάτων περιφερικού φλεβικού αίματος

Το αίμα λαμβάνεται με αντιπηκτικό. Θα πρέπει να γίνουν αρκετά επιχρίσματα και να βαφτούν με τη χρώση May Grunwald- Giemsa. Το παράσιτο παρατηρείται μέσα στα μεγάλα μονοπύρρηνα του αίματος και όχι στα πολυμορφοπύρρηνα. Τα μονοπύρρηνα θα αναγνωρισθούν από το ερυθρό χρώμα του πυρήνα της *Leishmania* και του βλεφαριδοπλάστη (ο οποίος εντοπίζεται μπροστά και κοντά στον πυρήνα). Το χρώμα του πρωτοπλάσματος του παρασίτου συμπίπτει πολλές φορές με αυτό του μονοπύρηνου κυττάρου και δύσκολα ξεχωρίζει.

Η διαγνωστική αξία αυτής της εξέτασης δεν είναι ιδιαίτερα ψηλή (Haralampidis, 2001).

Καλλιέργεια παρασίτου

Το δείγμα προς καλλιέργεια είναι υλικό από παρακέντηση σπληνός, ήπατος, μυελού των οστών, λεμφαδένος ή και περιφερικό αίμα με αντιπηκτικό (ηπαρίνη). Το δείγμα πρέπει να έχει ληφθεί υπό άσηπτες συνθήκες.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι:

- ✓ το N.N.N (Novy-Nicolle-Mac Neal)
- ✓ το διφασικό αιματούχο agar

Η επώαση των καλλιεργειών για τα μαστιγοφόρα του αίματος και των ιστών πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία 22-25°C, ποτέ στους 37-40°C. Το θερμικό σημείο θανάτου του παρασίτου είναι οι 40°C επί 30 λεπτά.

Η *Leishmania* αναπτύσσεται μεταξύ της 3^{ης} και της 7^{ης} ημέρας, αν και μερικές φορές υπάρχει κάποια καθυστέρηση, γι' αυτό το λόγο οι καλλιέργειες παραμένουν υπό παρακολούθηση μέχρι 15 μέρες ή και περισσότερο.

Η αναζήτηση γίνεται σε νωπά παρασκευάσματα που φτιάχνονται από την υγρή φάση του υλικού. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση ύστερα από την επικάλυψη του παρασκευάσματος με καλυπτρίδα.

Το υλικό N.N.N.

Είναι θρεπτικό υλικό που περιέχει 14g agar και 6g NaCl, σε 1000mL απεσταγμένο νερό. Μετά τη διάλυση των συστατικών αυτών, το υλικό διανέμεται σε σωλήνες, οι αποστειρώνονται και φυλάσσονται στο ψυγείο.

Για να χρησιμοποιηθεί το θρεπτικό υλικό, ρευστοποιείται με θέρμανση το περιεχόμενο ενός σωλήνος, το αφήνεται να κρυώσει και όταν η θερμοκρασία του φτάσει στους 45°C, προστίθεται αίμα κονίκλου σε ποσότητα ίση με το 1/3 του όγκου του υλικού του σωληναρίου. Γίνεται ανάμιξη και τοποθετείται το σωληνάριο σε λοξή θέση, ώστε το υλικό να πήξει στη θέση αυτή.

Ο εμβολιασμός του υλικού γίνεται με στείρο, ηπαρινισμένο, φλεβικό αίμα (1-2 mL). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (στους 22-25°C) επί μια εβδομάδα, ο έλεγχος ξεκινάει από την 3^η μέρα. Επί αρνητικού αποτελέσματος οι καλλιέργειες παραμένουν πέραν των 15 ημερών.

Στη συνέχεια παρασκευάζονται παρασκευάσματα από την υγρή φάση του υλικού, τα οποία μικροσκοπούνται με καλυπτρίδα.

Αν το αποτέλεσμα είναι θετικό, θα δούμε το παράσιτο με τη μορφή της λεπτομονάδας. Αν το βιολογικό υλικό ήταν αίμα τότε θα βρίσκεται μέσα στα μονοπύρνα με την αμαστίγωτη μορφή (Allahverdiyev et al., 2004).

Διφασικό αιματούχο agar (blood agar diphasic)

Και αυτό το θρεπτικό υλικό φέρεται σε σωληνάρια σε λοξή θέση. Ο εμβολιασμός του υλικού γίνεται με φλεβικό ηπαρινισμένο αίμα, περίπου 2 mL. Η επώαση και ο έλεγχος γίνεται όπως και στο N.N.N.

Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται και για την καλλιέργεια των Τρυπανοσωμάτων (Murray et al., 1992).

Ορολογική διάγνωση της Λεισμανίασης

Αντισώματα στον ορό των πασχόντων θα βρούμε μόνο στις περιπτώσεις που το παράσιτο διασπείρεται και δεν είναι εντοπισμένο. Παραδείγματος χάρη όταν προσβληθεί το λεμφικό σύστημα εκτεταμένα, όπως στη σπλαχνική λεισμανίαση, στη νόσο Esprundia και στη διάχυτη δερματική λεισμανίαση. Στη σπλαχνική λεισμανίαση βρίσκονται αυξημένες οι IgG ανοσοσφαιρίνες και λιγότερο οι IgM (Haralampidis, 1992).

Ειδικές ορολογικές δοκιμασίες

Αυτές οι δοκιμασίες αποτελούν τις απλούστερες και περισσότερο χρησιμοποιούμενες στην πράξη διαγνωστικές μεθόδους. Τόσο κατά τη σπλαχνική όσο και κατά τη διάχυτη δερματική λεισμανίαση, ο ασθενής αναπτύσσει χυμική ανοσία με την παραγωγή υψηλών τίτλων ειδικών αντισωμάτων για τη *Leishmania* (εκτός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, όταν ο ασθενής βρίσκεται υπό την κάλυψη αντιβιοτικών ή όταν το υλικό δεν είναι κατάλληλο). Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται με μια ποικιλία ορολογικών μεθόδων.

Αντίθετα στη δερματική μορφή οι περισσότεροι ασθενείς δεν αναπτύσσουν αντισώματα και έτσι δεν χρησιμοποιούνται τέτοιες μέθοδοι για την διάγνωση της δερματικής λεισμανίασης.

Στην κλινική πρακτική χρησιμοποιούνται κυρίως:

- ✓ ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA, ειδικότητα 70-89%, ευαισθησία 55-70%)
- ✓ η ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA, ειδικότητα 84-100%, ευαισθησία 63-100%)
- ✓ η άμεση συγκόλληση (DAT, ειδικότητα 72-95%, ευαισθησία 91-100%) (Sundar and Rai, 2002)

Οι περισσότερες από τις πιο πάνω ορολογικές δοκιμασίες δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν στις αναπτυσσόμενες χώρες, κυρίως λόγω της έλλειψης των εργαστηριακών οργάνων τα οποία είναι απαραίτητα για την πραγματοποίησή τους. Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί τρεις μέθοδοι ταχείας διάγνωσης που πληρούν την απαιτούμενη ευαισθησία/ ειδικότητα οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις περιφερειακές διαγνωστικές μονάδες.

Αυτές είναι:

- ✓ Ανοσοχρωματογραφική μέθοδος με χρήση του αντιγόνου rk39
- ✓ Δοκιμασία άμεσης συγκόλλησης (DAT) με κατεψυγμένο αντιγόνο
- ✓ latex agglutination test για ανίχνευση αντιγόνων στα ούρα (KAtex) (<http://www.kalonbio.co.uk/html/leishmania.html>)

Με την ανοσοχρωματογραφική μέθοδο, γίνεται ανίχνευση στον ορό, του αντιγόνου rk39 που βρίσκεται ακινητοποιημένο σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η ειδικότητα των ταινιών κυμαίνεται μεταξύ 88-100%, ενώ έχει αναφερθεί πολύ υψηλή ευαισθησία της τεχνικής αυτής στην Ινδία, μέτρια όμως στο Σουδάν (67%) και στην Ευρώπη (71,4%) (Sundar et al., 2002).

Καθώς τα αντισώματα παραμένουν για αρκετό καιρό μετά την μόλυνση, οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευσή τους δεν μπορούν να διαφοροποιήσουν νέες από παλιές μολύνσεις. Επιπρόσθετα, έχουν χαμηλή ευαισθησία σε περιπτώσεις ασθενών που δεν αναπτύσσουν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων (ασθενείς με σύμμεκτη λοίμωξη *Leishmania*/ HIV, ασυμπτωματικοί ασθενείς και ασθενείς με δερματική λεισμανίαση).

Αυτά τα μειονεκτήματα δεν υπάρχουν στη μέθοδο KAtex, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση ενός σταθερού μη πρωτεϊνικού αντιγόνου στα ούρα των ασθενών με ενεργή νόσο (ευαισθησία 68-100%). (<http://www.kalonbio.co.uk/html/leishmania.html>)

Μοριακές μέθοδοι

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πιο ευαίσθητη και ειδική μέθοδο διάγνωσης της λεισμανίασης. Βασίζεται στην ανίχνευση του DNA του παρασίτου. Οι μοριακές μέθοδοι διάγνωσης που βασίζονται στην τεχνική αυτή, έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια και μπορούν να εφαρμοστούν σε διάφορους τύπους κατάλληλα επεξεργασμένων δειγμάτων.

Η ευαισθησία της μεθόδου μάλιστα φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από το δείγμα που χρησιμοποιείται (Cavaliero et al., 1999; Roura et al., 1999a; Reithinger et al., 2000; Lachaud et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2001), από την μέθοδο απομόνωσης του DNA (Reithinger et al., 2000; Lachaud et al., 2001) και από την γενωμική περιοχή-στόχο (Lachaud et al., 2002).

Το ολικό αίμα έχει τη χαμηλότερη ευαισθησία, επειδή περιέχει μικρό αριθμό παρασίτων (Reithinger et al., 2000; Lachaud et al., 2001), ενώ όταν το κλινικό δείγμα είναι μυελός των οστών ή σπλήνας (Ashford et al., 1995; Mathis and Deplazes, 1995; Deplazes et al., 1998; Roura et al., 1999b) ή το δέρμα, στην περίπτωση της δερματικής λεισμανίασης (Berrahal et al., 1996; Roura et al., 1999a; Solano-Gallego et al., 2001), τότε η ευαισθησία που αναφέρεται είναι ιδιαίτερα υψηλή.

Διάφορες αλληλουχίες- στόχοι έχουν χρησιμοποιηθεί, αλλά αυτές που έχουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία είναι οι αλληλουχίες που

επαναλαμβάνονται πολλές φορές (πχ το κινητοπλαστικό DNA (Rodgers et al., 1990; Smyth et al., 1992; Ravel et al., 1995; le Fichoux et al., 1999; Cortes et al., 2004), τα γονίδια mini exon (Marfurt et al., 2003a) κα) στο γονιδίωμα του παρασίτου.

Αν και δεν έχει καθοριστεί ακόμη μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση της λεισμανίασης, οι μέθοδοι PCR που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα διαγνωστικά κέντρα βασίζονται στην ενίσχυση κινητοπλαστικού DNA.

Η μέθοδος αυτή αποτελεί την πλέον αξιόπιστη μέθοδο διάγνωσης, με υψηλή προγνωστική αξία, ενώ είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση σε ασθενείς με HIV/ λεισμανίαση ή με δερματική λεισμανίαση, καθώς και σε αυτούς με ασυμπτωματική λεισμανίαση.

Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι το κόστος, το εξειδικευμένο προσωπικό που απαιτείται αλλά και η πραγματοποίηση της μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια ή μεγάλα νοσοκομεία.

Πρόσφατα αναπτύχθηκε η real-time PCR (Nicolas et al., 2002; Schulz et al., 2003) που επιτρέπει τον καθορισμό του παρασιτικού φόρτου.

Τυποποίηση του παρασίτου *Leishmania*

Η τυποποίηση/ ταυτοποίηση του παρασίτου είναι ιδιαίτερα σημαντική για την διάγνωση καθώς και τις επιδημιολογικές, ταξινομικές και πληθυσμιακές μελέτες. Η ταυτοποίηση του είδους του παρασίτου καθοδηγεί τους κλινικούς στη σωστή επιλογή της θεραπευτικής αγωγής και επιτρέπει τη σωστή εποπτεία της ασθένειας.

Καθώς τα διάφορα είδη/ υποείδη *Leishmania* δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν μορφολογικά, είναι απαραίτητη η χρήση εναλλακτικών μεθόδων διάκρισης.

Ισοενζυμική Πολυεστιακή Ηλεκτροφόρηση (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE)

Η τεχνική ισοενζυμικής πολυεστιακής ηλεκτροφόρησης αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ταυτοποίηση, την ταξινόμηση και την τυποποίηση στελεχών *Leishmania*. Χιλιάδες στελέχη έχουν τυποποιηθεί με το ισοενζυμικό σύστημα τυποποίησης MON που βασίζεται στον καθορισμό της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας 15 ισοενζύμων (Rioux et al., 1990; Pratlong et al., 2001; Pratlong et al., 2004).

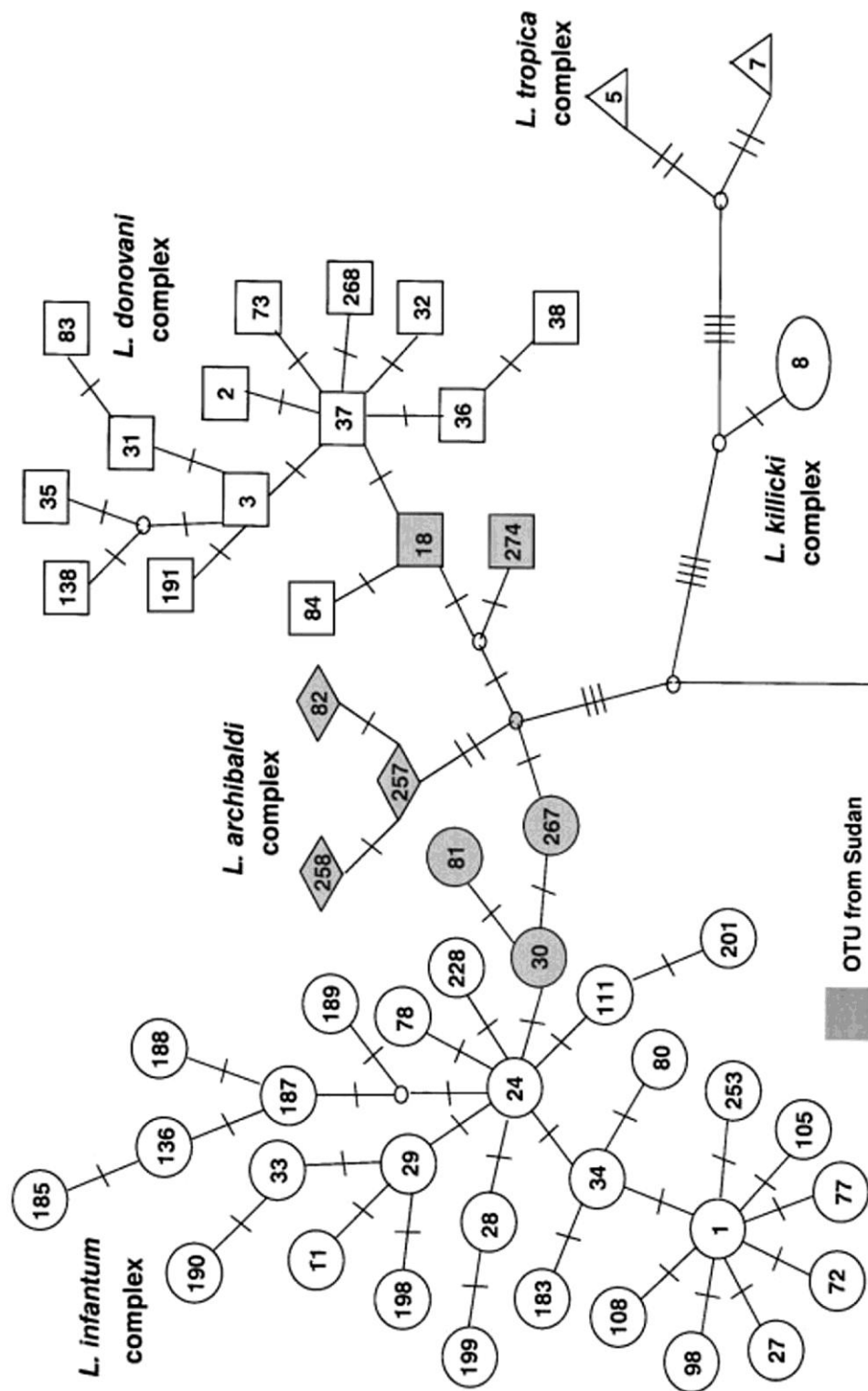
Αρχικό βήμα της μεθόδου αυτής είναι οι μαζικές καλλιέργειες των παρασίτων από τις οποίες λαμβάνεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά από λύση των παρασίτων. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των ισοενζύμων, με ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη ή σε λεπτή στοιβάδα αμύλου και η οπτικοποίηση τους με την χρήση κατάλληλων υποστρωμάτων και χρωστικών μεθόδων εμφάνισης.

Στη συνέχεια η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των 15 ισοενζύμων συγκρίνεται με αυτή ενός στελέχους αναφοράς και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να καθοριστούν ομάδες στελεχών (zymodemes, ζυμοδέματα) που έχουν το ίδιο ισοενζυμικό προφίλ (MON-1 έως MON-274).

Το είδος *L.infantum* χαρακτηρίζεται από εκτεταμένο ισοενζυμικό πολυμορφισμό (σχήμα 4) και περιλαμβάνει περίπου 29 ζυμοδέματα (Pratlong et al., 1995). Μερικά από αυτά έχουν απομονωθεί αποκλειστικά από περιστατικά σπλαχνικής λειψμανίας και άλλα μόνο από δερματικής λειψμανίας (Pratlong et al., 2004).

Μερικά από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι:

1. αδυναμία εφαρμογής της μεθόδου απευθείας σε κλινικά δείγματα
2. μη ανιχνεύση σιωπηλών μεταλλάξεων νουκλεοτιδικών αλλαγών οι οποίες δεν αλλάζουν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα
3. διαφορετικά ισοένζυμα μπορεί να εμφανίζουν ίδια ή και παρόμοια ηλεκτροφορητική κινητικότητα
4. είναι χρονοβόρα και επίπονη με υψηλό κόστος.



Σχήμα 4: Κλαδόγραμμα του συμπλέγματος *L. donovani* βασισμένο σε MLEE δεδομένα. Το κλαδόγραμμα βασίζεται στην ανάλυση 15 ισοενζύμων και αποτελείται από 70 εξελικτικά βήματα. Τα τρία είδη του συμπλέγματος (*L. donovani*, *L. infantum* και *L. archibaldi*) σχηματίζουν διακριτές ομάδες, με μεγάλη φυλογενετική απόσταση από τα είδη *L. tropica* και *L. killicki* (Pratlong et al., 2001).

DNA τυποποίηση

Τα τελευταία χρόνια οι προσπάθειες εστιάζονται στην ανάπτυξη τεχνικών βασιζόμενων στο DNA για το χαρακτηρισμό του παρασίτου. Αυτές οι τεχνικές είναι γρήγορες και μπορούν να εφαρμοστούν σε κλινικά δείγματα, επιτρέποντας έτσι την ευκολότερη επιτήρηση της λείσμανιάσης.

Έτσι αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές ταυτοποίησης και τυποποίησης του παρασίτου, συμπληρωματικές της MLEE.

Για τη διαφοροποίηση των ειδών, στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν ανοσολογικές τεχνικές (χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων) και υβριδοποίηση με ειδικούς, για κάθε είδος παρασίτου, ανιχνευτές.

Με την εμφάνιση νέων μοριακών τεχνικών αναπτύχθηκαν πολλά εναρκτήρια μόρια (primers) και πρωτόκολλα PCR για την ταυτοποίηση των στελεχών σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα (γένος, σύμπλεγμα, είδος). Οι μοριακοί στόχοι των τεχνικών αυτών είναι διάφοροι.

Οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνουν την εύρεση μοριακού καρυότυπου (Lighthall, 1992), τον καθορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Lewin et al., 2002; Mauricio et al., 2006; Zemanova et al., 2007), τον πολυμορφισμό διαμόρφωσης μονής έλικας (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism) (El Tai et al., 2001; Pandey et al., 2007), την PCR fingerprinting/ random amplified polymorphic DNA (RAPD), την τυποποίηση με καθορισμό μεγέθους μικροδορυφορικών αλληλουχιών (MLMT- Multilocus Microsatellite Typing) κ.α.

Αν και όλες οι προαναφερθείσες τεχνικές έχουν φανεί ιδιαίτερα χρήσιμες στη διαφοροποίηση στελεχών και έχουν δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την ταξινομική κατάταξη, διάφοροι παράγοντες περιορίζουν την εκτεταμένη χρήση των περισσότερων από αυτές στη διάγνωση, καθώς και σε επιδημιολογικές/ πληθυσμιακές μελέτες.

Συγκεκριμένα, πολλές από τις τεχνικές αυτές έχουν δοκιμαστεί σε περιορισμένο αριθμό στελεχών ή σε μη αντιπροσωπευτικά στελέχη, ενώ ελάχιστες έχουν συσχετιστεί με τη μέθοδο MLEE. Η μέθοδος PCR fingerprinting/ random amplified polymorphic DNA (RAPD), αν και έχει καλή διακριτική ικανότητα, είναι πολύ δύσκολο να επαναληφθεί με τον ίδιο τρόπο σε άλλα εργαστήρια, ενώ υπάρχει δυσκολία ερμηνείας των πολύπλοκων ηλεκτροφορητικών προτύπων.

Επιπλέον πολλές από αυτές τις τεχνικές δεν έχουν την απαιτούμενη διακριτική ικανότητα για να διαχωρίσουν φυλογενετικά κοντινά στελέχη. Το μειονέκτημα αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορούν οι τεχνικές αυτές να χρησιμοποιηθούν σε μια επιδημιολογική/ πληθυσμιακή μελέτη ή να διαχωρίσουν μια εκ νέου μόλυνση από μια αναζωπύρωση παλαιάς μόλυνσης.

Το ζυμόδεμα MON-1

Μέθοδοι τυποποίησης υψηλής διακριτικής ικανότητας

Στην Ευρώπη η κυριαρχία των παρασίτων MON-1 (MLEE τυποποίηση) καθιστά μια, ευρείας κλίμακας, επιδημιολογική μελέτη ακόμη πιο δύσκολη. Το ζυμόδεμα MON-1 απαντάται σε 30 χώρες και αντιπροσωπεύει το 70% όλων των στελεχών που έχουν τυποποιηθεί (Gallego et al., 2001). Στη Ν. Γαλλία το ποσοστό των MON-1 στελεχών ανέρχεται στο 88% (Zemanova et al., 2004), στην Ιταλία είναι μεγαλύτερο του 50% (Gramiccia, 2003), στην Πορτογαλία 96,7% (Campino et al., 2006) και την Ισπανία 46-58% (Martin-Sanchez et al., 2004). Σε ανοϊσοκανούς ασθενείς, το 90% των περιστατικών σπλαχνικής και το 20% δερματικής λεισμανίασης οφείλονται σε στελέχη MON-1 (Alvar et al., 1997), ενώ σε ασθενείς με σύμμεκτη λοίμωξη HIV/ σπλαχνική λεισμανίαση το ποσοστό είναι 73% (Pratlong et al., 2003).

Το ζυμόδεμα αυτό είναι επίσης το κυρίαρχο στους σκύλους, ενώ είναι ενδιαφέρον ότι έχει ανιχνευτεί μόνο στο 18% των σκνιπών (Martin-Sanchez et al., 2004).

Ελάχιστες τεχνικές έχουν την διακριτική ικανότητα για την περαιτέρω διαφοροποίηση των πληθυσμών MON-1.

Αυτές είναι:

- ✓ η τεχνική RAPD (Zemanova et al., 2004)
- ✓ η πολυεστιακή τυποποίηση μικροδορυφορικών αλληλουχιών (MultiLocus Microsatellite Typing- MLMT) (Kuhls et al., 2007)
- ✓ η τυποποίηση βάση σημειακών νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων SNPs –Single Nucleotide Polymorphisms (Mauricio et al., 2006)
- ✓ ο καθορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πολλαπλών στόχων MLST– MultiLocus Sequence Typing (Ravel et al., 1996; Mauricio et al., 2006)
- ✓ η PCR-RFLP των *cpb* και *gp63*– κωδικών/ μη κωδικών περιοχών (Chicharro et al., 2002; Quispe Tintaya et al., 2004) και
- ✓ η PCR-RFLP κινητοπλαστικού DNA- kDNA PCR-RFLP (Chicharro et al., 2002).

Για το σύμπλεγμα *Leishmania donovani*, το οποίο αποτελείται από τα είδη *L. donovani* και *L. infantum* και είναι υπεύθυνο για τη σπλαχνική λεισμανίαση, η ισοενζυμική πολυεστιακή ηλεκτροφόρηση (multilocus enzyme electrophoresis- MLEE) είναι η μέθοδος αναφοράς για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση του παρασίτου. Όπως ήδη αναφέρθηκε με αυτή τη μέθοδο, τα στελέχη χωρίζονται σε ομάδες με πανομοιότυπα ενζυμικά πρότυπα, που ονομάζονται

«ζυμοδέματα». Όσο αναφορά το είδος *L.infantum*, η υπεροχή του ζυμοδέματος MON-1 μειώνει σημαντικά την διακριτική ικανότητα αυτής της προσέγγισης.

Οι εναλλακτικές μέθοδοι για τον διαχωρισμό των στελεχών αυτών περιλαμβάνουν την ανάλυση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Grimaldi et al., 1987), το μοριακό καρυότυπο (Dujardin et al., 1995; Guerbouj et al., 2001c), τη χρήση της τεχνικής RAPD (PCR fingerprinting-random amplified polymorphic DNA analysis) (Andresen, 1996; Motadezian et al., 1996; Schonian, 1996; Hide et al., 2001; Zemanova et al., 2004), τον καθορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας διαφόρων γενετικών στόχων, την PCR ενίσχυση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ή κινητοπλαστικού DNA που ακολουθείται από πέψη με διάφορα περιοριστικά ένζυμα (πολυμορφισμός μεγέθους τμήματος μετά από πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση) (Cupolillo et al., 1995; Mauricio et al., 2001; Morales et al., 2002; Marfurt et al., 2003a; Mauricio et al., 2004; Quispe Tintaya et al., 2004), πολυμορφισμό στερεοδιαμόρφωσης απλής αλυσίδας (SSCP-single strand conformation polymorphism analysis) (El Tai et al., 2000) και την πολυεστιακή τυποποίηση μικροδορυφορικών αλληλουχιών (MultiLocus Microsatellite Typing).

Πολλές από τις πιο πάνω μεθόδους έχουν περιορισμένη διακριτική ικανότητα και μπορούν να διαφοροποιήσουν τα MON-1 στελέχη σε σπάνιες περιπτώσεις. Δεν μπορούν έτσι να χρησιμοποιηθούν για επιδημιολογικές ή πληθυσμιακές μελέτες στελεχών *L.infantum*.

Η σύγκριση της διακριτικής ικανότητας μερικών από των πιο πάνω τεχνικών αποκάλυψε ότι οι τεχνικές kDNA PCR-RFLP και MLMT είναι από τα πιο ισχυρά εργαλεία τυποποίησης MON-1 στελεχών (Botilde et al., 2006).

kDNA PCR-RFLP

Το γενετικό υλικό του κινητοπλάστη (kDNA) (εικόνα 9α), απαρτίζεται από ένα γιγαντιαίο δίκτυο εκατοντάδων κυκλικών μορίων DNA, οι οποίοι ονομάζονται μικροκύκλοι και μεγακύκλοι (Simpson, 1987). Κάθε παράσιτο έχει περίπου 10.000 μικροκύκλους (εικόνα 9β) καθώς και 50 μεγακύκλους που περιέχουν την γενετική πληροφορία για την μεταγραφή μερικών μορίων rRNA αλλά και για την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Οι μικροκύκλοι είναι μια ετερογενής, σε επίπεδο αλληλουχίας, ομάδα μορίων που κωδικοποιούν τα RNA οδηγούς (guide RNAs) που εμπλέκονται σε ένα ιδιαίτερο μηχανισμό διόρθωσης του RNA (RNA editing) των μεγακύκλων.

Ο μηχανισμός επιτυγχάνει την αποκατάσταση λειτουργικών πλαισίων ανάγνωσης με την προσθήκη ή απομάκρυνση καταλοίπων ουρακίλης (U) σε συγκεκριμένες θέσεις των μεταγράφων των μεγακύκλων (Simpson and Shaw, 1989; Blum and Simpson, 1990).

Οι μικροκύκλοι χωρίζουν τυχαία κατά την διάρκεια της μίτωσης και αυτός είναι ένας σημαντικός παράγοντας διαφοροποίησης (παρέκκλισης) των πληθυσμών (minicircle population drift).

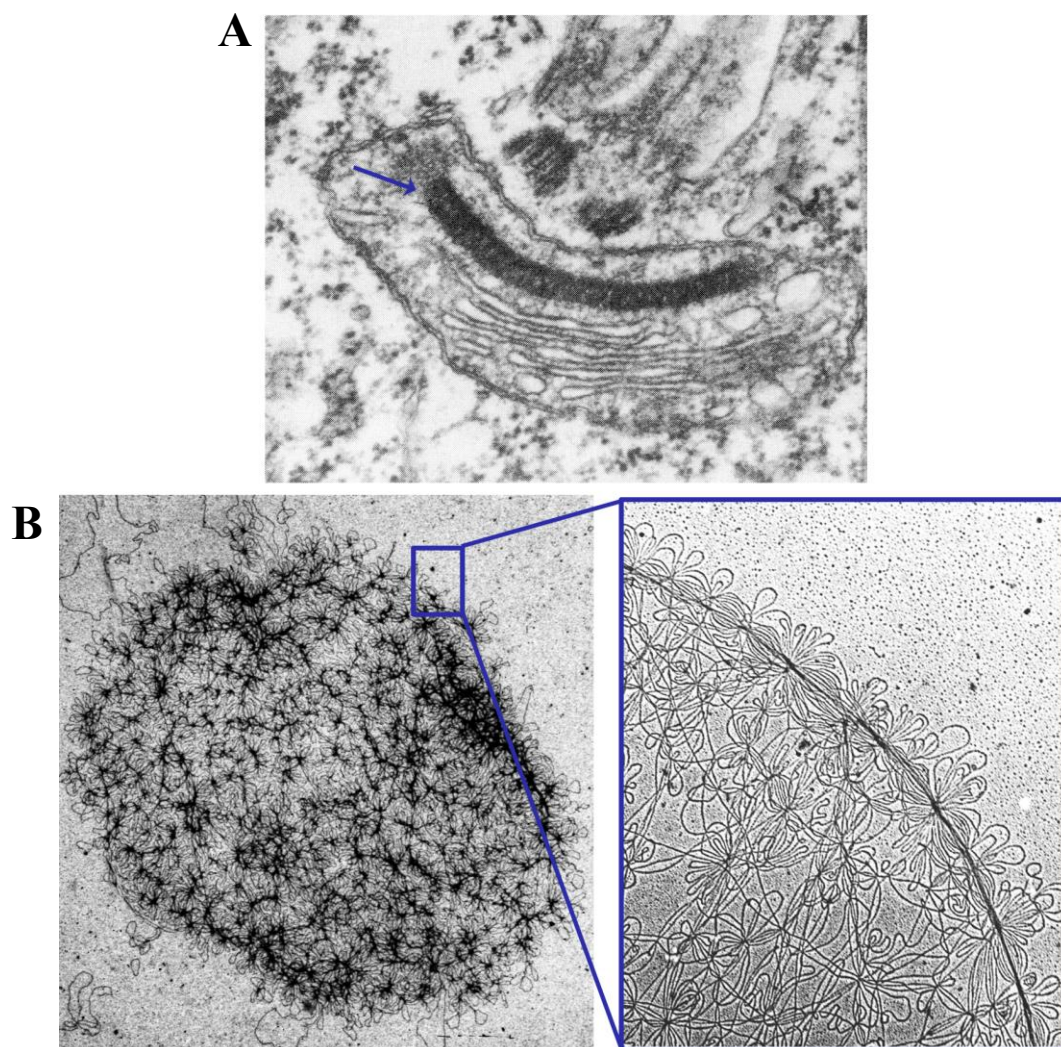
Παρόλα αυτά μια άλλη μελέτη έχει δείξει την σταθερότητα μερικών τάξεων μικροκύκλων ανεξαρτήτως της γεωγραφικής απόστασης (Gutierrez-Solar et al., 1995).

Καθώς η πλειονότητα των παρασίτων που απομονώνονται στην Ευρώπη ανήκουν στο υποείδος MON-1, δεν είναι δυνατή η πραγματοποίηση επιδημιολογικών μελετών με χρήση της τεχνικής MLEE. Μια μέθοδος που έχει την απαραίτητη διακριτική ικανότητα για να τυποποιήσει τα στελέχη αυτά είναι η ανάλυση kDNA με την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεάσεων (Angelici et al., 1989). Η μέθοδος αυτή βελτιώθηκε με αντικατάσταση του πρώτου βήματος της απομόνωσης του kDNA από τα παράσιτα με την ενίσχυση των μικροκύκλων (minicircles) kDNA με PCR (Morales et al., 2001; Chicharro et al., 2002).

Ο εκτεταμένος πολυμορφισμός που παρατηρείται, οφείλεται στις διαφορές που εντοπίζονται στους πολυάριθμους μικρόκυκλους. Αυτός όμως ο πολυμορφισμός κάνει την επεξεργασία των δεδομένων αρκετά πολύπλοκη. Η ύπαρξη ή όχι μερικών ζωνών μπορεί να οφείλεται στην μικρή συγκέντρωση του αρχικού προϊόντος PCR, στην κρίση του ατόμου που αναλύει τα δεδομένα ή στην πραγματική απουσία τους. Υποκειμενικό είναι επίσης και το αν πρέπει να καταμετρηθούν διαφορές στην ένταση των ζωνών, καθώς η οικογένεια των μικροκύκλων δεν είναι τελείως ομοιογενής ενώ μερικά περιοριστικά τμήματα βρίσκονται σε ιδιαίτερα χαμηλή ποσότητα (σπάνια ποικιλία μικρόκυκλου). Τέλος προβλήματα μερικής πέψης καθώς και μικροδιαφορών στην συγκέντρωση της πηκτής,

στην χρώση του DNA και στην ποιότητα της φωτογραφίας μπορούν να δημιουργήσουν επιπρόσθετα προβλήματα. Όλα αυτά οδηγούν σε δυσκολίες σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, έχει προταθεί η χρήση μηχανημάτων υψηλής ανάλυσης (capillary electrophoresis) και αυστηρά καθορισμένου πρωτοκόλλου εργασίας (Botilde et al., 2006).



Εικόνα 9: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες του κινητοπλάσθη και του κινητοπλαστικού DNA (Haralambous, 2007).

A. Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία του κινητοπλάσθη.

Το κινητοπλαστικό DNA διακρίνεται εύκολα καθώς έχει υψηλή πυκνότητα (σημειώνεται με βέλος).

B. Το δίκτυο των διαπλεγμένων μικροκύκλων και μεγακύκλων

Πολυεστιακή τυποποίηση μικροδορυφορικών αλληλουχιών (MLMT)

Πρόσφατα η ανάλυση του πολυμορφισμού μεγέθους γενετικών περιοχών που περιέχουν μικροδορυφορικές αλληλουχίες (οι οποίες είναι πολυμορφικοί γενετικοί τόποι στο γενωμικό DNA και αποτελούνται από αλληλουχίες με επαναλαμβανόμενα μοτίβα με μέγεθος 1-4 ζεύγη βάσεων) έχει γίνει ένα σημαντικό εργαλείο για πληθυσμιακές και γενετικές μελέτες σε πολλούς οργανισμούς (FitzSimmons et al., 1995; Toth et al., 2000).

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες είναι επαναλαμβανόμενα μοτίβα νουκλεοτιδίων, που αποτελούνται από 1 έως 4 ζεύγη βάσεων και είναι διασκορπισμένα στο γενετικό υλικό των ευκαριωτικών κυττάρων. Τα μοτίβα αυτά εξελίσσονται με ρυθμούς 5 ή 6 φορές γρηγορότερα από το υπόλοιπο γονιδίωμα, κυρίως με μεταβολή του αριθμού των επαναλήψεων τους. Οι μικροδορυφορικές αυτές αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλή ποικιλότητα (Ellegren, 2000). Ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί εύκολα να ελεγχθεί με χρήση εκκινητών που υβριδοποιούνται στις αλληλουχίες εκατέρωθεν των περιοχών αυτών.

Τα αποτελέσματα τέτοιων αναλύσεων είναι επαναλήψιμα και έτσι η εφαρμογή της μεθόδου δεν περιορίζεται σε λιγοστά ειδικευμένα εργαστήρια όπως στην περίπτωση της MLEE.

Η μέθοδος αυτή δεν έχει τα μειονεκτήματα της τεχνικής kDNA PCR-RFLP καθώς τα αποτελέσματα της είναι απλά στην ερμηνεία τους και συγκρίσιμα μεταξύ εργαστηρίων. Η φυσική επιλογή δεν επηρεάζει την εξέλιξη των μικροδορυφορικών αλληλουχιών εκτός από σπάνιες περιπτώσεις. Ένα από τα κύρια εμπόδια στην ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων είναι η ανάγκη εύρεσης καινούργιων δεικτών (markers), συνήθως για κάθε είδος του οργανισμού υπό μελέτη.

Καθώς το παράσιτο είναι πλούσιο σε μικροδορυφορικές αλληλουχίες (Rossi et al., 1994) έχουν αναπτυχθεί αρκετοί τέτοιοι δείκτες.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μικροδορυφορικών αλληλουχιών είναι εύκολα συγκρίσιμα μεταξύ των εργαστηρίων και είναι πιο εύκολο να καταχωρηθούν σε βάσεις δεδομένων. Η ανάλυση τους έχει αποδειχτεί ότι είναι ισχυρό εργαλείο για τη γενετική, πληθυσμιακή και επιδημιολογική μελέτη των ειδών της *Leishmania*. Αυτές οι περιοχές είναι υψηλά πολυμορφικές και επαναλαμβάνονται πολλές φορές στο γονιδίωμα του παρασίτου. Έχει αποδειχτεί ότι οι μικροδορυφορικές περιοχές της οικογένειας των Τρυπανοσωματίδων είναι σταθερές σε εργαστηριακές συνθήκες και μπορούν να απομονωθούν κατευθείαν από βιολογικά δείγματα που περιέχουν μικρές ποσότητες παρασιτικού DNA (Macedo et al., 2001; Bulle et al., 2002).

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται 13 δείκτες για το παράσιτο *L.major* (Jamjoom et al., 2002), 16 δείκτες για το παράσιτο *L.tropica* (Schwenkenbecher et al., 2004) και 31 δείκτες για το παράσιτο *L.donovani* (Jamjoom et al., 2002; Ochsenreither et al., 2006).

Επίσης έχουν αναφερθεί δυο ανεξάρτητες περιοχές μικροδορυφορικών αλληλουχιών (Rossi et al., 1994) και τρεις πολυμορφικές στο είδος *L.infantum* περιοχές που περιέχουν μικροδορυφορικές αλληλουχίες (Bulle et al., 2002).

Από όλους αυτούς τους δείκτες χρήσιμοι στην τυποποίηση MON-1 είναι οι δείκτες που αναπτύχθηκαν το 2006 (Ochsenreither et al., 2006). Αυτοί οι δείκτες εμπλουτίστηκαν στην συνέχεια με 4 νέους δείκτες και χρησιμοποιήθηκαν στην τυποποίηση στελεχών του συμπλέγματος *L.donovani* (Kuhls et al., 2007).

Καινούρια μοριακά δεδομένα για το ζυμόδεμα MON-1

Πληθυσμιακή και γενετική μελέτη στελεχών MON-1 με χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Τα στελέχη MON-1 είναι τα κυρίαρχα στελέχη σε όλες τις ενδημικές περιοχές, σε ανθρώπους και σκύλους. Το υποείδος αυτό απαντάται σε 30 χώρες και αντιπροσωπεύει το 70% όλων των στελεχών που έχουν τυποποιηθεί. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει την πραγματοποίηση πληθυσμιακών μελετών, καθώς είναι δύσκολο να βρεθούν εργαλεία με την απαραίτητη διακριτική ικανότητα να διαχωρίσουν τους πληθυσμούς.

Πρόσφατα όμως με την ανάπτυξη μικροδορυφορικών δεικτών ικανών να διαφοροποιήσουν τα στελέχη MON-1 έγινε δυνατή η πραγματοποίηση τέτοιας μελέτης (Jamjoom et al., 2002).

Χρησιμοποιήθηκαν 14 μικροδορυφορικοί δείκτες για την ανάλυση 141 στελεχών *L.infantum* κυρίως από Ισπανία, Πορτογαλία και Ελλάδα. Όλοι οι δείκτες μπορούσαν να διαφοροποιήσουν τα στελέχη MON-1 από τα μη-MON-1 στελέχη, ενώ εμφανίζουν εκτεταμένο πολυμορφισμό και μεταξύ στελεχών του υποείδους MON-1.

Σκοπός ήταν η διερεύνηση της πληθυσμιακής δομής και της δυναμικής των στελεχών MON-1 στις χώρες αυτές, καθώς και η αντιμετώπιση σημαντικών επιδημιολογικών ερωτημάτων όπως η συσχέτιση συγκεκριμένων γονότυπων με τους ξενιστές ή την κλινική εκδήλωση.

Αρχικά ενισχύθηκαν οι πολυμορφικές περιοχές με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια έγινε έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων με χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου, αγαρόζης Metaphor (ειδική μορφή αγαρόζης ικανή να αναλύσει διαφορές ακόμη και 2 βάσεων) και την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis). Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με μέθοδο μοντελοποίησης καθώς και με μεθόδους ομαδοποίησης γενετικών αποστάσεων.

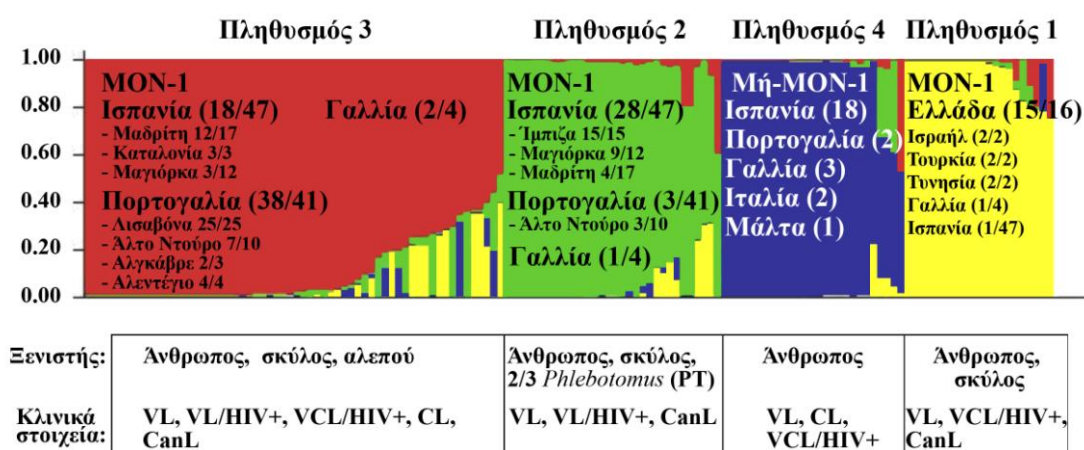
Και οι τρεις μέθοδοι ανίχνευσαν μια παρόμοια πληθυσμιακή δομή στελεχών με εμφανή διαχωρισμό των στελεχών MON-1 από τα μη-MON-1 στελέχη που είχαν και μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία.

Τα στελέχη MON-1 ομαδοποιήθηκαν σε τρεις γεωγραφικά καθορισμένους και γενετικά διακριτούς πληθυσμούς (σχήμα 5): (1) Ελλάδα (συμπεριλαμβανομένων ελάχιστων στελεχών από Τουρκία, Ισραήλ και Τυνησία), (2) Νησιά Ισπανίας (Μαγιόρκα και Ίμπιζα) και (3) Πορτογαλία και (4) Ηπειρωτική Ισπανία. Και οι τέσσερις πληθυσμοί *L.infantum* εμφάνισαν μια «κλωνική» δομή, με ενδείξεις περιστασιακού ανασυνδυασμού και γενετικής ροής μεταξύ στελεχών

MON-1 και μη-MON-1, όπως η εύρεση πιθανών υβριδίων καθώς και μωσαϊκών γονότυπων. Κύριο ρόλο στην διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας φαίνεται να έχουν οι σκνίπες (ενδιάμεσος ξενιστής) καθώς και οι χρήστες ναρκωτικών ουσιών που είναι θετικοί στη λεισμανίαση με τη χρήση κοινής σύριγγας (ανθρωπονοτικός τύπος νόσου).

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ γονότυπων *Leishmania* και κλινικής εκδήλωσης (σπλαχνικής, δερματικής λεισμανίασης και σύμμεκτης λοίμωξης *Leishmania*/ HIV), ούτε όμως ομαδοποιήθηκαν τα στελέχη σύμφωνα με τον τελικό ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκαν (σκύλος, άνθρωπος, αλεπού). Επίσης η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την διαφοροποίηση επαναμόλυνσης/ επανεμφάνισης.

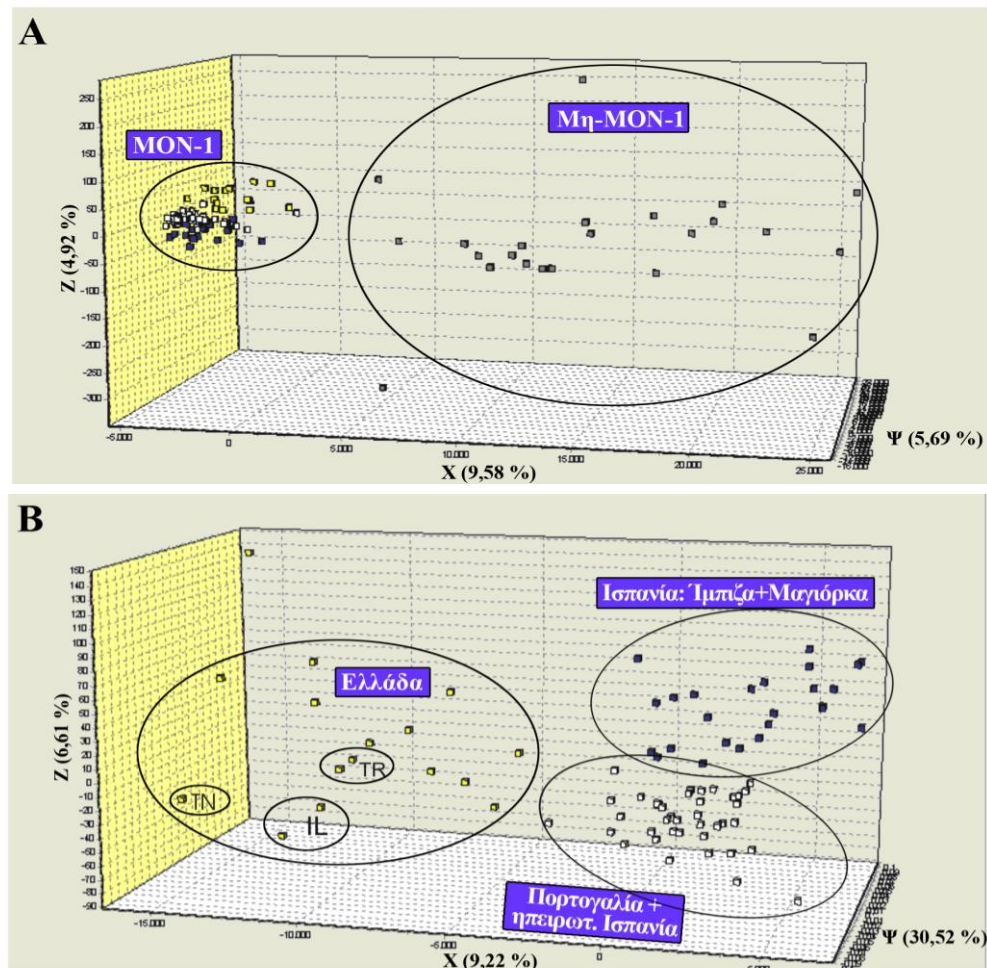
Με αυτή την μελέτη μπόρεσαν να απαντηθούν για πρώτη φορά (λόγω της χρήσης δεικτών με υψηλή διακριτική ικανότητα) διάφορα σημαντικά επιδημιολογικά ερωτήματα για τα υποείδη MON-1 (Kuhls et al., υπό κρίση).



Σχήμα 5: Πληθυσμιακή δομή των Μεσογειακών *L. infantum* στελεχών, όπως έχει υπολογιστεί με το πρόγραμμα STRUCTURE, σύμφωνα με δεδομένα από 14 μικροδορυφορικούς δείκτες για 141 στελέχη (Kuhls et al., υπό κρίση).

Κάθε στέλεχος αντιπροσωπεύεται με μια κάθετη γραμμή που έχει το χρώμα του πληθυσμού στον οποίο ανήκει ($K=4$). Το χρώμα κατά μήκος κάθε γραμμής δείχνει το υπολογισμένο ποσοστό συμμετοχής του στελέχους, σε κάθε πληθυσμό.

Για την γραφική αναπαράσταση της πληθυσμιακής δομής σε ατομικό επίπεδο (σχήμα 6) εφαρμόστηκε η παραγοντική ανάλυση αντιστοιχιών (factorial correspondence analysis, FCA) του προγράμματος GENETIX software (Dawson and Belkhir, 2001). Αυτή η ανάλυση, τοποθετεί το κάθε στέλεχος σε ένα τρισδιάστατο χώρο, σύμφωνα με τις ομοιότητες που έχουν τα αλληλόμορφα του με αυτά των άλλων στελεχών.



Σχήμα 6: Παραγοντική ανάλυση αντιστοιχιών (factorial correspondence analysis, FCA) των Μεσογειακών *L. infantum* στελεχών (Kuhls et al. υπό κρίση).

A. Ανάλυση πληθυσμών MON-1 και μη-MON-1 (141 στελέχη)

B. Ανάλυση των τριών κύριων MON-1 πληθυσμών (113 στελέχη).

TR – Τουρκία, TN – Τυνησία, IL – Ισραήλ (Kuhls et al., υπό κρίση).

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



Καλλιέργεια παρασίτων

Οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου *Leishmania* καλλιεργούνται στους 27°C απουσία CO₂, σε διάφορα θρεπτικά υλικά (DMEM, Medium 199, RPMI 1640 και NNN-agar) που συμπληρώνονται με 10% (v/v) FCS (Foetal Calf Serum). Σε όλα τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας προστίθενται επίσης 25 mM γλουταμίνης, αντιβιοτικά (5 µg/mL στρεπτομυκίνη, 5 U/mL πενικιλίνη) και 10 mM HEPES. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, παρακολουθείται ο ρυθμός ανάπτυξής τους και πραγματοποιείται καταμέτρηση των παρασίτων.

Συντήρηση παρασίτων

Για τη συντήρηση των διαφόρων στελεχών *Leishmania*, αυτά συλλέγονται στην αρχή της στατικής φάσης με φυγοκέντρηση (1500 rpm, 10 λεπτά της ώρας). Στην συνέχεια, περίπου 5×10^7 παράσιτα αναδιαλύονται σε 1mL υλικού καλλιέργειας με 20% FCS και 10% DMSO και τοποθετούνται σε ειδικούς κρυοπροστατευτικούς σωλήνες 1,5 mL. Ιδανικά το πάγωμα πρέπει να γίνεται σταδιακά με ρυθμό 1°C/λεπτό έως τους -80°C. Εναλλακτικά, οι σωλήνες περιτυλίγονται με χαρτί και μπαίνουν αρχικά στους -20°C για περίπου 2 ώρες ή για την διάρκεια μιας νύχτας. Στην συνέχεια μπαίνουν στους -80°C, όπου μπορούν να φυλαχτούν για μικρό χρονικό διάστημα. Η διατήρησή τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απαιτεί τη μεταφορά τους σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.

Για την απόψυξη, τα παράσιτα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο (25°C) για να ξεπαγώσουν γρήγορα. Στην συνέχεια ξεπλένονται δύο φορές, με προσθήκη 9mL PBS και φυγοκέντρηση (1500 rpm, 10 λεπτά της ώρας). Μετά την τελευταία απόχυση, το ίζημα των παρασίτων αναδιαλύεται σε 10mL υλικού καλλιέργειας και τοποθετούνται στις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη τους.

Απομόνωση γενωμικού DNA

Το DNA είναι ένα πολύ σταθερό μόριο αν δεν εκτεθεί στη δράση των νουκλεασών. Η απομόνωση του DNA γίνεται συνήθως από ολικό αίμα, από ιστούς, από ούρα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Στην αντίδραση PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA το οποίο έχει απομονωθεί από ζωικούς ή φυτικούς ιστούς, από κυτταρικές καλλιέργειες, ή και βακτήρια. Όσον αφορά το ανθρώπινο DNA αυτό μπορεί να απομονωθεί από τα εμπύρνηνα κύτταρα περιφερικού αίματος, το αμνιακό υγρό, τρίχες, ούρα κ.ά.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται μεγάλος αριθμός πειραματικών μεθόδων απομόνωσης DNA. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στη κυτταρική λύση, ακολουθούμενη από αποπρωτεΐνωση και ανάκτηση του DNA (Sambrook et al., 1989). Οι κύριες διαφορές μεταξύ των διαφόρων προσεγγίσεων έγκειται στο βαθμό αποπρωτεΐνωσης και το μοριακό βάρος του παραγόμενου DNA.

Κατά την απομόνωση του DNA πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η αποικοδόμηση του. Αυτές οι προφυλάξεις αφορούν στην ελαχιστοποίηση των συνεργιστικών δυνάμεων με ήπια ανάμειξη σε όλα τα στάδια απομόνωσης και στην απομάκρυνση των οργανικών διαλυμάτων και αλάτων από το απομονωθέν DNA με διάλυση παρά με καταβύθιση με τη βοήθεια αιθανόλης (Sambrook et al., 1989). Το γενωμικό DNA μπορεί να απομονωθεί από τις εξής πηγές:

- ✓ κυτταρικές καλλιέργειες του παρασίτου ,
- ✓ αίμα από ανθρώπους και σκύλους (μετά από διαχωρισμό των λευκών αιμοσφαιρίων, από ολικό αίμα ή από σταγόνες δειγμάτων αίματος σε χαρτί Whatman #1),
- ✓ άλλα κλινικά δείγματα όπως δείγμα μυελού των οστών και λεμφαδένων.

Στο εργαστήριό μας για την απομόνωση του DNA από τα πιο πάνω δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φαινόλης (Sambrook et al., 1989) καθώς και το κιτ απομόνωσης NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel).

Απομόνωση γενωμικού DNA από καλλιέργειες παρασίτων *Leishmania*

Για την απομόνωση DNA από καλλιέργειες παρασίτων έχει χρησιμοποιηθεί το κιτ NucleoSpin Tissue της Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, καθώς και η μέθοδος της φαινόλης που περιγράφεται πιο κάτω. Και με τις δύο μεθόδους απομονώθηκε DNA με παρόμοια ποιότητα και ποσότητα.

Η μέθοδος της φαινόλης βασίζεται στην ισχυρή πρωτεολυτική δράση της πρωτεΐνωσης K σε συνδυασμό με την ικανότητα αποδιάταξης του ιονικού αντιδραστηρίου SDS (δωδέκυλο-σουλφονικό νάτριο, sodium dodecyl sulfate). Στα κατεργαζόμενα κύτταρα προστίθεται διάλυμα πρωτεΐνωσης K και SDS και το εναιώρημα αφήνεται προς επώαση μέχρις ότου το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρικής πρωτεΐνης αποσυντεθεί. Μετά από διαδοχικές προσθήκες φαινόλης και χλωροφορμίου το δείγμα υφίσταται αποπρωτεΐνωση και ανακτάται μετά από καταβύθιση με αλκοόλη, ξηραίνεται και επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TE ή νερό.

Συγκεκριμένα τα στάδια που περιλαμβάνει η πορεία απομόνωσης είναι τα ακόλουθα:

1. Τα παράσιτα από τις φιάλες καλλιέργειας μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon των 50mL και υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση (1800 rpm, 10 λεπτά της ώρας).
2. Το ίζημα των κυττάρων προστίθενται σε 20mL κρύο PBS και το εναιώρημα υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση (1800 rpm, 5 λεπτά της ώρας) στους 4°C.
3. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και τα παράσιτα τοποθετούνται για 15 λεπτά στους -80°C.
4. Τα παγωμένα παράσιτα αναδιαλύονται σε διάλυμα λύσης κυττάρων (50mM NaCl, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 7.4) σε αναλογία 1:10 (όγκος ιζήματος: όγκος διαλύματος λύσης κυττάρων).
5. Προστίθενται SDS, πρωτεΐνωση K και RNase A τελική συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι ώστε η τελική συγκέντρωση τους στο διάλυμα να είναι 0,5%, 10% τελική αραιώση.
6. Το δείγμα τοποθετείται στους 55°C κι αφήνεται για τουλάχιστο 5 ώρες
7. Ακολούθως προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και το δείγμα φυγοκεντρείται (3500 rpm, 10 λεπτά της ώρας) σε θερμοκρασία δωματίου (στο σημείο αυτό έχει γίνει λύση των παρασίτων και το προκύπτουν διάλυμα αποτελείται από DNA, RNA και πρωτεΐνες).
8. Λαμβάνεται η υδατική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα) και μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου erpendorf. Προστίθεται ½

- όγκος φαινόλης και $\frac{1}{2}$ όγκος χλωροφορμίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (3500 rpm, 5 λεπτά της ώρας) σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Συλλέγεται πάλι η υδατική φάση σε σωληνάκι τύπου errendorf προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου (αυτή η εκχύλιση αποσκοπεί στην απομάκρυνση του υπολείμματος της φαινόλης). Φυγοκέντρηση (3500 rpm, 5 λεπτά της ώρας) σε θερμοκρασία δωματίου.
 10. Λαμβάνεται η υδατική φάση και προστίθενται 1/10 όγκου οξικού νατρίου 3M και 2,5 όγκοι αιθανόλη 100% (η αιθανόλη κατακρημνίζει όλα τα μακρομόρια RNA, DNA, πρωτεΐνες).
 11. Αν το DNA καταβυθιστεί φυγοκεντρείται (3500 rpm, 15 λεπτά της ώρας) και αποχύνεται το υπερκείμενο. Αν το DNA δεν καταβυθιστεί τοποθετείται στους 4°C για τουλάχιστο μία ώρα πριν την φυγοκέντρηση.
 12. Αφαιρείται προσεκτικά η αιθανόλη.
 13. Το ίζημα εκπλένεται με ίσο όγκο (όπως στο βήμα 7) διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v).
 14. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (3500rpm, 15 λεπτά της ώρας).
 15. Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και αφήνεται ανοιχτό το δοχείο στον απαγωγό μέχρι να εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης (εναλλακτικά ο διαλύτης εξατμίζεται σε speed vac).
 16. Το ίζημα του DNA επαναδιαλύεται σε περίπου 250μL νερό (αναλόγως με το ιξώδες του διαλύματος προστίθεται επιπλέον ανάλογη ποσότητα νερού).
 17. Η συγκέντρωση του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm, με βάση τη σχέση: $\text{DNA} \mu\text{g/mL} = A_{260} \times \text{αραίωση} \times 50,0$.
Η καθαρότητα του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται από το λόγο $\text{O.D.}_{260\text{nm}} / \text{O.D.}_{280\text{nm}}$. Καθαρά παρασκευάσματα DNA έχουν $\text{O.D.}_{260\text{nm}} / \text{O.D.}_{280\text{nm}} = 1,8$.
Τέλος, η ποιότητα του DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Το απομονωμένο DNA φυλάσσεται στους 4°C για αρκετούς μήνες ή στους -20°C για μεγαλύτερο διάστημα

Απομόνωση DNA παρασίτων *Leishmania* από αίμα

Για την απομόνωση του DNA των παρασίτων από αίμα έχει χρησιμοποιηθεί το κιτ NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, καθώς και η μέθοδος της φαινόλης που περιγράφεται πιο κάτω. Σημειώνεται ότι έχει βρεθεί ότι είναι καλύτερα (για την επιτυχία της αντίδρασης PCR) η απομόνωση να γίνεται από λευκά αιμοσφαίρια παρά από ολικό αίμα (Lachaud et al., 2001). Ιδιαίτερα πρακτική είναι η μέθοδος απομόνωσης DNA από σταγόνες αίματος σε διηθητικό χαρτί. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη καθώς δεν απαιτούνται ιδιαίτερα μέτρα προστασίας (ψύξη) κατά την μεταφορά και φύλαξη του δείγματος. Καθώς όμως το παρασιτικό φορτίο είναι συνήθως χαμηλό στο αίμα, η μέθοδος αυτή πολλές φορές δεν δίνει ικανή ποσότητα DNA για την μετέπειτα αντίδραση PCR.

Απομόνωση DNA παρασίτων *Leishmania* από λευκά αιμοσφαίρια

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει δύο βήματα, την απομόνωση των λευκών αιμοσφαιρίων και στην συνέχεια την απομόνωση του DNA από αυτά:

A. Απομόνωση λευκών αιμοσφαιρίων από το αίμα

1. Τα δείγματα αίματος αρχικά τοποθετούνται για τουλάχιστον 1 ώρα στους -20°C και αφήνονται στη συνέχεια να ξεπαγώσουν (αυτό το βήμα βοηθάει να σπάσουν ευκολότερα τα ερυθρά αιμοσφαίρια).
2. Προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων ($0.155\text{M NH}_4\text{Cl}$, 10mM KHCO_3 , $0,1\text{mM Na}_2\text{EDTA}$ pH 7,4)
3. Ακολουθεί συνεχής ανάδευση για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φυγοκέντρηση (4000 rpm , 5 λεπτά της ώρας)
5. Αν το ίζημα δεν είναι λευκό, αναδιαλύεται με το διάλυμα λύσης και επαναλαμβάνεται η διαδικασία (βήματα 3-4), μέχρι να απομακρυνθούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται οι βαθμονομημένοι κύλινδροι Windrobe.

1. Αυτοί γεμίζονται με αίμα, με τη βοήθεια πιπέτας παστέρ.
2. ακολουθεί φυγοκέντρηση (2000 rpm, 10 λεπτά της ώρας) και απομονώνεται σε falcon το πλάσμα (υπερκείμενο), μαζί με τη στιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων (buffy coat), η οποία βρίσκεται πάνω από τη στιβάδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων.
3. Ακολουθεί έκπλυση της πιπέτας με PBS και νέα φυγοκέντρηση (2000 rpm, 10 λεπτά της ώρας).

Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως για την απομόνωση του DNA ή διατηρούνται στους -20°C.

B. Απομόνωση DNA

Σε ίζημα λευκών αιμοσφαιρίων που έχουν απομονωθεί όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω, προστίθενται 250 µL διαλύματος λύσης (50mM NaCl, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 7.4), SDS σε τελική συγκέντρωση 0,5% (v/v), πρωτεϊνάση K σε τελική συγκέντρωση 200 µg/mL και RNase A σε τελική συγκέντρωση 200 µg/mL. Το δείγμα επωάζεται για τουλάχιστο 5 ώρες στους 55 °C.

Στην συνέχεια ακολουθούνται τα βήματα του πρωτοκόλλου «Απομόνωση γενωμικού DNA από καλλιέργειες παρασίτων *Leishmania*», αρχίζοντας από το βήμα 7.

Απομόνωση DNA παρασίτων *Leishmania* από άλλα κλινικά δείγματα

Στο κλινικό δείγμα, προστίθενται διάλυμα λύσης σε αναλογία 1:10 (όγκος δείγματος: όγκος διαλύματος λύσης 50mM NaCl, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 7.4), SDS σε τελική συγκέντρωση 0,5%, πρωτεϊνάση K σε τελική συγκέντρωση 200 µg/mL και RNase A σε τελική συγκέντρωση 200 µg/mL. Το δείγμα επωάζεται για τουλάχιστο 5 ώρες στους 55°C.

Στην συνέχεια ακολουθούνται τα βήματα του πρωτοκόλλου «Απομόνωση γενωμικού DNA από καλλιέργειες παρασίτων *Leishmania*», αρχίζοντας από το βήμα 7.

Ενίσχυση PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μίας αλληλουχίας DNA, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευσή της. Η μέθοδος PCR καταλύεται από μία DNA πολυμεράση (σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι Taq DNA πολυμεράση και η Ampli Taq DNA πολυμεράση) η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση μιας νέας συμπληρωματικής αλυσίδας, αλλά απαιτεί ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA για να ξεκινήσει τη σύνθεση. Γι' αυτό χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια ως εναρκτήρια μόρια (ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, primers) για τον πολυμερισμό των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Αυτά είναι κατασκευασμένα έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικά με τις αλυσίδες της μήτρας DNA στα δύο άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Τα βασικά κριτήρια που πρέπει να πληρούν οι εκκινητές, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η πιστότητα της διαδικασίας, είναι:

- α) το μέγεθός τους να είναι μεγαλύτερο από 17 βάσεις,
- β) η θερμοκρασία «τήξης» του δίκλωνου DNA, όπου λαμβάνει χώρα ο αποχωρισμός των αλυσίδων (T_m), να είναι 50-65°C,
- γ) η περιεκτικότητα στις βάσεις GC να είναι 40-60%.

Αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη της μήτρας DNA με θέρμανση. Ακολουθεί πτώση της θερμοκρασίας σε επίπεδα που επιτρέπουν την υβριδοποίηση των εναρκτήριων μορίων με τις συμπληρωματικές αλυσίδες της μήτρας DNA. Γενικά, ακολουθείται ο κανόνας $T_a \geq T_m$, όπου T_a είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες της μήτρας DNA. Τέλος, πραγματοποιείται πολυμερισμός των νέων αλυσίδων DNA με την DNA πολυμεράση. Ο κύκλος της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και πολυμερισμού επαναλαμβάνεται πολλές φορές και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους. Το διάλυμα της αντίδρασης στο τέλος «n» αριθμού κύκλων περιέχει θεωρητικά 2^n μόρια DNA, τα οποία είναι αντίγραφα της αλληλουχίας DNA που περικλείουν οι εκκινητές (Jamjoom et al., 2002; Ochsenreither et al., 2006; Kuhls et al., 2007).

Ενίσχυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Έχει αναφερθεί ότι η τεχνική MLMT είναι από τις ελάχιστες που έχουν την διακριτική ικανότητα για την περαιτέρω διαφοροποίηση των πληθυσμών MON-1. Το αρχικό βήμα της τεχνικής είναι η ενίσχυση των μικροδορυφορικών αλληλουχιών, χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται σε σταθερές περιοχές εκατέρωθεν της υπό ανάλυση περιοχής.

Χρησιμοποιήθηκαν 15 δείκτες που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια από άλλες ερευνητικές ομάδες (Jamjoom et al., 2002; Ochsenreither et al., 2006; Kuhls et al., 2007). Οι δείκτες καθώς και διάφορα χαρακτηριστικά τους (αλληλουχίες εκκινητών, αλληλουχία) παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Στον πίνακα 2, φαίνεται επίσης η θερμοκρασία T_A (°C) που χρησιμοποιείται για κάθε δείκτη. Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50 ng γενωμικού DNA για κάθε αντίδραση. Παρακάτω αναφέρονται οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας (πίνακας 2), καθώς και τα στελέχη (πίνακες 4-6).

Εργ. κωδ.	Μοριακ. Δείκτης	Μοτίβο	Πρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής	T_A °C
M1	Li22-35 (E)	CA	CTTGATGTTCTGGGTAGCAAGT	ATGCACACCAAAAATCATGTG	52
M2	Li23-41 (F)	GT	GATCGGAGGTGACAGCGT	CCCTTTAACTGCCAGTGCG	52
M3	Li41-56 (B)	AC	TTGCTTCATGATAACAACCTTGC	CCTGTTGGTGTGAGTTCGTG	50
M4	Li45-25 (G)	AC	GCGCCTACAGGCATAAAGGA	CTGGCGCATCAACGGTGT	54
M7	Li71-7 (R)	CA	GCTGCAGCAGATGAGAAGG	GTGAGAAGGCAGGGATTCAA	50
M9	Lm2TG	TG	AAAAAGCGAGGAATGAAAGAA	TCCCTCCCCTCTACAACCTT	53
M10	Lm4TA	TA	TTTGCCACACACATACACTTAG	GTAGACGACATCGCGAGCAC	54

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά μικροδορυφορικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.

Κώδικας WHO	Στέλεχος	Υποείδη (MLEE)	LM2TG	LM4TA	E Li22-35	G Li-45-24	F Li23-41	R Li71-7	B Li41-56
MHOM/FR/1978/LEM75	LG1	MON-1	25	13	13	15	16	13	10
MHOM/FR/1995/LPN114	LG2	MON-1	25	14	12	14	17	13	10
MHOM/ES/1993/PM1	LG3	MON-1	25	10	11	15	16	12	10
MHOM/FR/1997/LSL29	LG4	MON-1	24	14	13	15	16	13	10
MHOM/ES/1986/BCN16	LG5	MON-1	25	12	13	15	17	13	10
MHOM/PT/2000/IMT260	LG6	MON-1	26	13	13	15	16	13	10
MHOM/FR/1996/LEM3249	LG7	MON-29	21	10	18	19	21	11	12
MHOM/ES/1991/LEM2298	LG8	MON-183	27	9/11	16/18	19	21	11	12
MHOM/FR/1980/LEM189	LG14	MON-11	21	10	17	19/20	23	12	12
MHOM/ES/1988/LLM175	LG19	MON-198	22	10	23	19	16	13	12
MHOM/ES/1992/LLM373	LG20	MON-199	16/22	10	20/25	17/20	17/23	12	11/13
MHOM/IT/1994/ISS1036	LG21	MON-228	23	9	17/20	18	16/18	12	11/13
MHOM/IT/1993/ISS800	LG22	MON-188	12	9	12	16	17	9	12
MHOM/MT/1985/BUCK	LG15	MON-78	12/25	10	6/12	7	18	13	9
MHOM/IN/0000/DEVI	LG9	MON-2	9	6	14	10	31	8	11
MHOM/IN/1996/THAK35	LG10	MON-2	9	6	14	10	31	8	11
MHOM/IN/1954/SC23	LG16	MON-38	12	9	16	8	13	10	16
MHOM/ET/1972/GEBRE 1	LG11	MON-82	9	10	5	10	21	9	8/11
MHOM/SD/1982/GILANI	LG12	MON-30	9	10	5	10	22/27	10	8/11
MHOM/ET/0000/HUSSEN	LG13	MON-31	9	11	15	17/18	6	10	12
MCAN/SD/2000/LEM3946	LG17	MON-274	9	8	5/15	18	6	10	8/12
MHOM/SD/1962/3S	LG18	MON-81	9	9/10	5/17	17/18	22	9	8/11
MHOM/SD/1997/LEM3472	LG23	MON-267	9	9	15	20	22	10	11
MHOM/SD/1997/LEM3429	LG24	MON-257	9	11	5/15	18	22	10	11/12
MHOM/SD/1997/LEM3463	LG25	MON-258	9	9	15	18	6	10	12

Πίνακας 3: Τα αλληλόμορφα (παρουσιάζεται ο αριθμός των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων) 25 στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Παρουσιάζονται τα στοιχεία για τους 7 μικροδορυφορικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας.

Εργ. Κωδικ.	Τύπος	Ξενιστής	Περιοχή/ Πόλη	Ημ/νια απομόνωσης	Ζυμόδεμα MON	Μοριακός Τύπος
EP43	CanVL	σκύλος	Kuşadası	12/ 2000		<i>L. infantum</i>
EP44	CanVL	σκύλος	Kuşadası	12/ 2000		-
EP49	CanVL	σκύλος	Kuşadası	12/ 2000	MON-98 <i>L.infantum</i>	-
EP50	CanVL	σκύλος	Kuşadası	12/ 2000	MON-98 <i>L.infantum</i>	<i>L. infantum</i>
EP53	CanVL	σκύλος	Kuşadası	12/ 2000	MON-98 <i>L.infantum</i>	-
EP55	CanVL	σκύλος	Kuşadası	12/ 2000		-
EP56	CanVL	σκύλος	Bilecik	6/ 2000		-
EP57	CanVL	σκύλος	Muğla	??		-
EP58	CanVL	σκύλος	Muğla	??		-
EP59	HVL	άνθρωπος	Kuşadası	12/ 2001	MON-1 <i>L.infantum</i>	-
EP68	CanVL	σκύλος	Kuşadası	??		-
EP88	HVL	σκύλος	Çorum	8/ 2003		<i>L. infantum</i>
EP89	HVL	άνθρωπος	Alaşehir	10/ 2003		-
EP126	CanVL	σκύλος	Bodrum	6/ 2005	MON-1 <i>L.infantum</i>	-
EP134	CanVL	σκύλος	Antakya	3/ 2007	MON-1 <i>L.infantum</i>	-

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των στελεχών από Τουρκία που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση

Στέλεχος	CD63	CD66	CD73	CD85	CD87	CD88	CD90	CD91	CD108	CD110
Κωδικός WHO:	MCAN/CY/ 2005/CD63	MCAN/CY/ 2005/CD66	MCAN/CY/ 2006/CD73	MCAN/CY/ 2006/GD85	MCAN/CY/ 2006/CD87	MCAN/CY/ 2006/GD88	MCAN/CY/ 2006/GD90	MCAN/CY/ 2006/CD91	MCAN/CY/ 2006/CD108	MCAN/CY/ 2006/CD110
Είδος	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
Περιοχή	Λεμεσός	Λευκωσία	Λευκωσία	Λευκωσία	Πάφος	Πάφος	Πάφος	Πάφος	Λάρνακα	Λευκωσία
Τάξη ξενιστή	Σκύλος	Σκύλος	Σκύλος	Σκύλος	Σκύλος	Σκύλος	Σκύλος	Σκύλος	Σκύλος	Σκύλος
Ασθένεια	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL
Εργαστήριο που το απομόνωσε	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία	Κυπριακή Κτηνιατρική Υπηρεσία
Ημ/νια απομόνωσης	2005	2005	2006	2006	2006	2006	2006	2006	2006	2006
Ζυμόδεμα MON	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?
Όργανο απομόνωσης στελεχούς	Λεμφαδέν.	Λεμφαδέν./ Σπλήνας/ Αίμα	Λεμφαδέν.	Λεμφαδέν.	Αίμα	Αίμα	Αίμα	Αίμα	Αίμα	Λεμφαδέν.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των στελεχών από Κύπρο που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση

Στέλεχος	AH2	AH4
Κωδικός WHO:	MHOM/AL/2006/AH2	MHOM/AL/2006/AH4
Χώρα	Αλβανία	Αλβανία
Πόλη	Zenum	Kleanthi
Τάξη ξενιστή	Άνθρωπος	Άνθρωπος
Ασθένεια	VL	VL
Ημ/νια απομόνωσης	2006	2007
Απομόνωση πριν τη θεραπεία	NAI	NAI
Όργανο απομόνωσης στελέχους	Μυελός των Οστών	Μυελός των Οστών
Ηλικία ασθενή	10 χρονών	22 χρονών
Γένος	Άρρεν	Άρρεν

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των στελεχών από Αλβανία που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση

Ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Η ανάλυση των μικροδορυφορικών αλληλουχιών πραγματοποιείται σε δύο βήματα, την ενίσχυση τους με την μέθοδο PCR και στην συνέχεια τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων σε ειδικές πηκτές.

Καθώς οι μικροδορυφορικές αυτές περιοχές αποτελούνται από δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, τα αλληλόμορφα διαφέρουν κατά δύο βάσεις σε μέγεθος. Επιπλέον, οι μικροδορυφορικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν (εξαιρουμένου του δείκτη LIST 7039 με μέγεθος 193-235 b.p.) έχουν μέγεθος μικρότερο των 150 b.p..

Αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν την ανάλυση των αλληλουχιών με απλές ηλεκτροφορητικές μεθόδους (ανάλυση με πηκτή *metaphor* ή PAGE), που για μόρια DNA με μικρό μέγεθος έχουν την απαιτούμενη διακριτική ικανότητα των δύο ζευγών βάσεων.

Αγαρόζη MetaPhor

Η μέθοδος της αγαρόζης MetaPhor είναι ιδιαίτερα πρακτική και έχει παρόμοια διαχωριστική ικανότητα με την πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Χρησιμοποιείται πηκτή MetaPhor 4 έως 5% (w/v) (BioWhittaker Applications), διαστάσεων 250 X 200 X 1,5 mm ετοιμάζεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE και 0,5 µg/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σύστημα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Owl Buffer Puffer™, Model A5, ThermoFischer Scientific) για περίπου 24 ώρες με σταθερή τάση 150 V (5 V/cm). (http://www.lonzabioscience.com/Lonza_CatNav.asp?oid=700&prodoid=Metaphor)

Χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE με 0,5 µg/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες παρατηρούνται σε σύστημα φωτογράφισης σε UV (AlphaImager, Alphainnotech Corp.). Σε περιπτώσεις που δεν είναι ξεκάθαρο το αποτέλεσμα επαναλαμβάνεται το πείραμα.

Παρασκευή πηκτής MetaPhor

- 1.** Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X (260 mL TBE + 2340 mL απιονισμένο νερό) και τοποθέτηση του στους 4 °C για περίπου 1h.
- 2.** Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης, έτσι ώστε να έχουμε ποσοστό πηκτής, κατάλληλο για τα μεγέθη που θέλουμε να διαχωρίσουμε.
- 3.** Σε 250 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα που παρασκευάστηκε προστίθεται σταδιακά η αγαρόζη (σε κωνική φιάλη 500 mL) και ταυτόχρονα αναδεύεται καλά με μαγνήτη. Καλό θα ήταν η πηκτή να παρασκευαστεί από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για να αποφευχθούν τυχών αλλαγές στην ηλεκτροφορητική ικανότητα.
- 4.** Αφού διαλυθεί η αγαρόζη στο ρυθμιστικό διάλυμα, η κωνική φυάλη τοποθετείται στους 4°C για μισή περίπου ώρα.
- 5.** Το στόμιο της κωνικής φυάλης καλύπτεται με μεμβράνη και δημιουργείται μια τρύπα για να διαφεύγουν οι υδρατμοί κατά τη θέρμανση στο φούρνο μικροκυμάτων.
- 6.** Το μείγμα ζυγίζεται.
- 7.** Η αγαρόζη διαλύεται σε φούρνο μικροκυμάτων σε χαμηλή ένταση μέχρι να διαλυθούν οι σβόλοι που τυχόν δημιουργήθηκαν.
- 8.** Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει.
- 9.** Το διάλυμα ξαναζεσταίνεται στη χαμηλή ένταση και γίνεται επιβεβαίωση απουσίας σβόλων. Η κωνική φυάλη δεν πρέπει να ανακινηθεί βίαια διαφορετικά είναι πιθανό να σχηματιστούν μικρές φυσαλίδες τις οποίες θα είναι δύσκολο να ανέβουν στην επιφάνεια.
- 10.** Η αγαρόζη θερμαίνεται στην υψηλή ένταση και γίνεται επιβεβαίωση ότι το διάλυμα είναι διαυγές και δεν υπάρχει ίχνος αγαρόζης.
- 11.** Σε περίπτωση δημιουργίας φυσαλίδων η αγαρόζη αφήνεται στον πάγκο να κρυώσει και ξαναεπαναλαμβάνονται τα βήματα 9 και 10, όσες φορές χρειαστεί μέχρι να επέλθει το επιθυμητό αποτέλεσμα (διαυγής πηκτή ελεύθερη από φυσαλίδες).
- 12.** Το διάλυμα ζυγίζεται και σε περίπτωση που έχει μειωθεί κατά πολύ ο όγκος συμπληρώνεται με προθερμασμένο απιονισμένο νερό. Καλό θα ήταν να αποφευχθεί η συγκεκριμένη διαδικασία υπολογίζοντας μερικά mL ρυθμιστικού διαλύματος παραπάνω από την αρχή, διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος να δημιουργηθούν φυσαλίδες.
- 13.** Προστίθεται γρήγορα το βρωμιούχο αιθίδιο περίπου 16 μ L για 250 mL πηκτής.
- 14.** Η πηκτή πολυμερίζεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- 15.** Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στους 4 °C στα 130-140 Volt.

Τυποποίηση του συμπλέγματος *L.donovani* με K26-PCR

Σκοπός δημιουργίας αυτής της μεθόδου ήταν η εύρεση μιας αξιόπιστης, γρήγορης και απλής μοριακής τεχνικής τυποποίησης, που να μπορεί να αντικαταστήσει την δύσκολη τεχνική MLEE και να έχει την δυνατότητα της απευθείας εφαρμογής σε κλινικά δείγματα.

PCR ενίσχυση του γονιδίου K26– Πολυμορφισμός μεγέθους των αλληλόμορφων

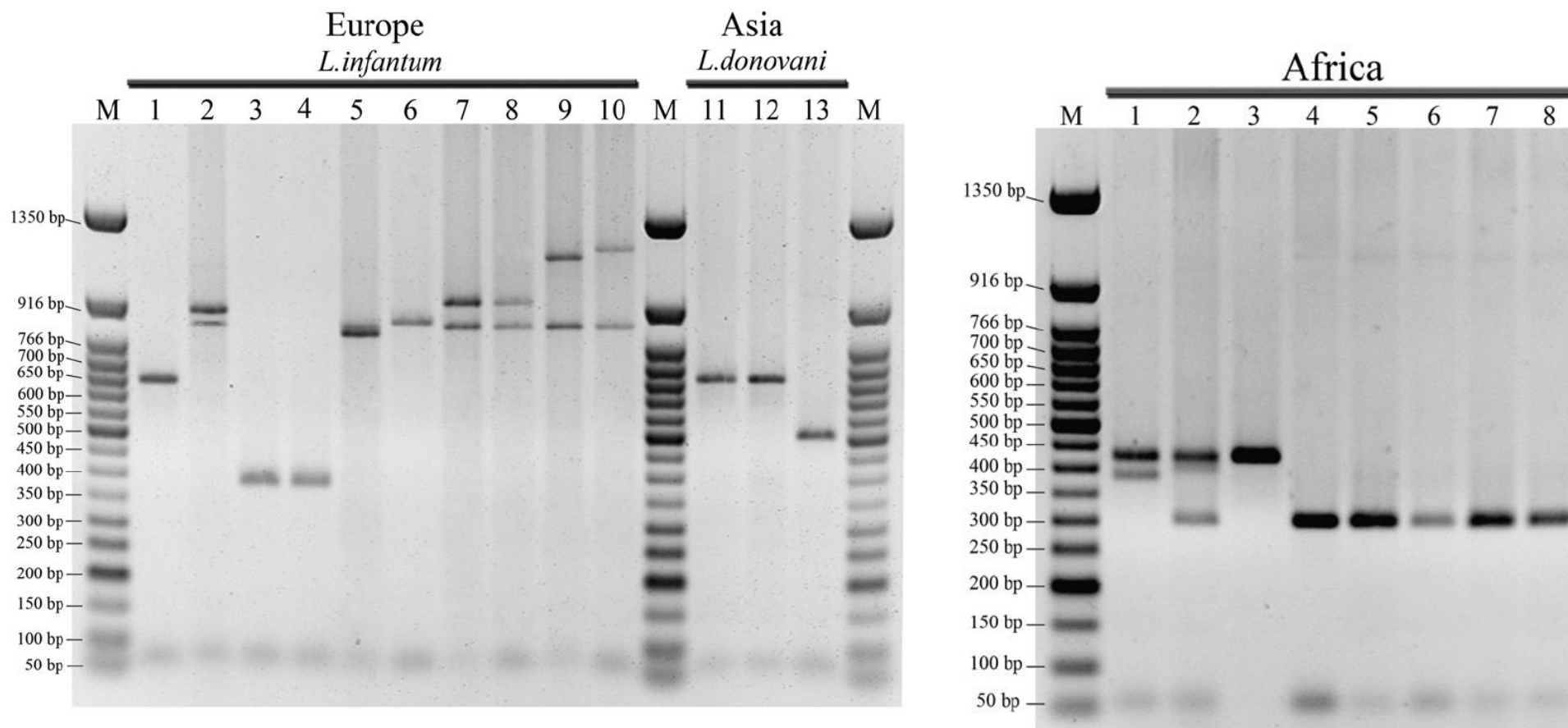
Για την τυποποίηση του συμπλέγματος *L.donovani* οι Χαραλάμπους και συνεργάτες αναπτύξαν μια μέθοδο που βασίζεται στην ενίσχυση του γονιδίου K26 (Haralambous C. et al., 2008). Η πρωτεΐνη K26 είναι γνωστή και ως HASPB (hydrophilic acylated surface protein B; υδρόφιλη ακετυλιωμένη επιφανειακή πρωτεΐνη B), ενώ στο είδος *L.major* αναφέρεται ως GBP (gene B protein). Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει ένα ιδιαίτερα μεταβλητό επαναλαμβανόμενο πρωτεϊνικό μοτίβο 14 αμινοξέων.

Το γονίδιο αποδείχτηκε πολύ πολυμορφικό, καθώς η ενίσχυση του σε μια ομάδα 26 στελεχών (εκ των οποίων τα 6 ήταν υποείδη MON-1) έδωσε 15 διαφορετικούς γονότυπους. Το γονίδιο K26 εμφανίζει πολυμορφισμό μεγέθους όπως φάνηκε από τα προϊόντα της PCR ενίσχυσης του, το μέγεθος των οποίων κυμαινόταν από 284 bp έως περίπου 1300 bp (εικόνα 10). Ο πολυμορφισμός αυτός θα μπορούσε να εξηγηθεί από διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων του πρωτεϊνικού μοτίβου K26.

Το κυρίαρχο στην Ευρώπη υποείδος MON-1 μπορούσε εύκολα να διακριθεί από το μέγεθος του προϊόντος PCR (626bp), ενώ τα υπόλοιπα Ευρωπαϊκά μη MON-1 στελέχη έδωσαν 7 ομάδες K26. Τα στελέχη *L.donovani* από Ινδία και Αφρική έδωσαν επίσης αλληλόμορφα με διαφορετικά μεγέθη από τα στελέχη *L.infantum*, κάνοντας έτσι εύκολη την ταυτοποίηση των δύο ειδών, καθώς και την αναγνώριση διαφόρων υποειδών.

Συγκεκριμένα τα τρία *L.donovani* στελέχη από την Ινδία, δύο στελέχη MON-2 και ένα MON-38, δώσανε προϊόντα 660 bp και 515 bp αντίστοιχα (εικόνα 10). Τέλος στελέχη *L.donovani* από την Ανατολική Αφρική (Σουδάν, Αιθιοπία) δώσανε προϊόντα PCR μικρού μεγέθους (284 bp, το κυρίαρχο προϊόν, έως 425 bp) (Haralambous C. et al., 2008).

Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά γρήγορη, απλή και ευαίσθητη. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ταυτοποίηση του είδους καθώς και την τυποποίηση των στελεχών του συμπλέγματος *L.donovani* σύμφωνα με το μέγεθος του προϊόντος PCR, ενώ έχει την δυνατότητα της απευθείας εφαρμογής σε κλινικά δείγματα.



Εικόνα 10: PCR ενίσχυση του K26 γονιδίου σε διάφορα στελέχη του συμπλέγματος *L. donovani*.

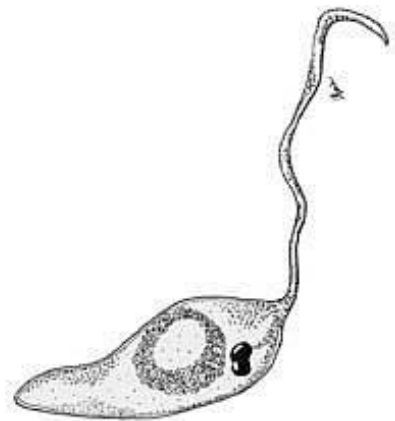
Πληθυσμιακή ανάλυση

Για την μελέτη της πληθυσμιακής δομής, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), που χρησιμοποιεί μια προσέγγιση που βασίζεται στο Μπεϋζιανό μοντέλο (Bayesian model) και χρησιμοποιεί τις συχνότητες των αλληλόμορφων (σχήμα 8). Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι: 20,000 κύκλοι επανάληψης, εκτιμήσεις πιθανότητας βασισμένες σε 200,000 Markov Chain Monte Carlo κύκλους επαναλήψεως.

Ο πιθανότερος αριθμός των πληθυσμών, υπολογίστηκε συγκρίνοντας σε διάγραμμα τις log-πιθανοφάνειες (log-likelihoods) για τιμές K (πληθυσμοί) από 1 μέχρι 7. Στο πλατό της γραφικής η τιμή του K αποτελεί τον αριθμό των πληθυσμών που αντιπροσωπεύει καλύτερα την κύρια δομή τους. Επιπρόσθετα υπολογίστηκε η τιμή ΔK , που βασίζεται στον ρυθμό αλλαγής της log πιθανότητας (log probability) των δεδομένων μεταξύ διαδοχικών τιμών K (Evanno et al., 2005).

Τα δεδομένα από την ανάλυση με τους μικροδορυφορικούς δείκτες, αναλύθηκαν επιπλέον με το πρόγραμμα MICROSAT (Minch et al., 1995). Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον αριθμό των δινουκλεοτιδικών επαναλήψεων χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Ddm. Υπολογίστηκε κοινό κλαδόγραμμα και έγινε στατιστική στήριξη των κλάδων μετά από 1000 επαναλήψεις (Felsenstein, 1985) μέσω του προγράμματος MICROSAT. Το τελικό κλαδόγραμμα Neighbor-joining, Ddm κατασκευάστηκε στο πρόγραμμα PHYLIP, version 3.6 (Felsenstein, 2005).

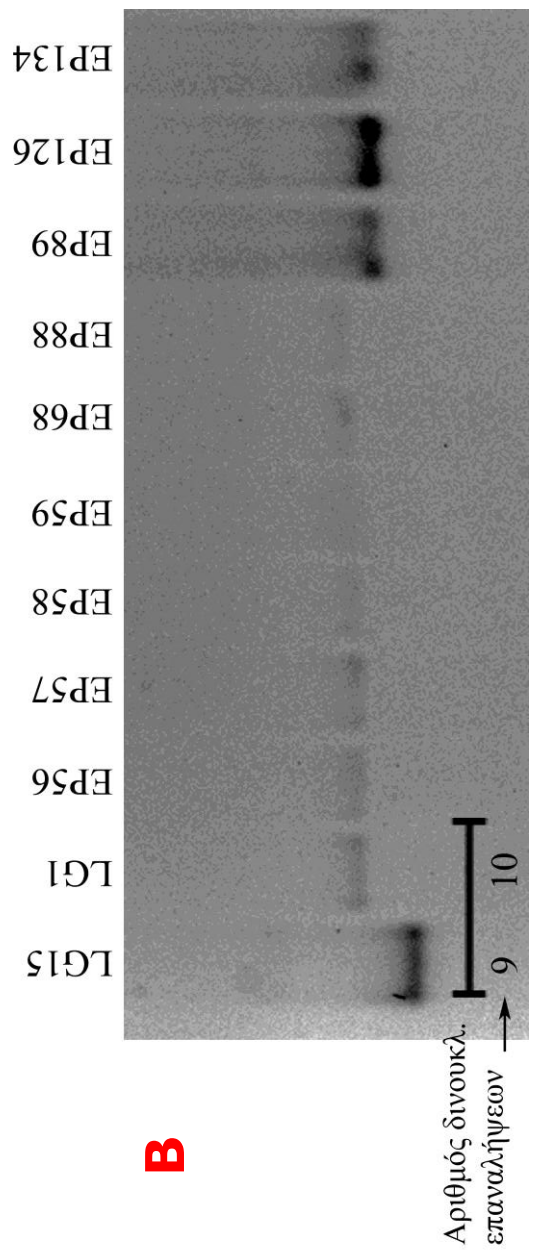
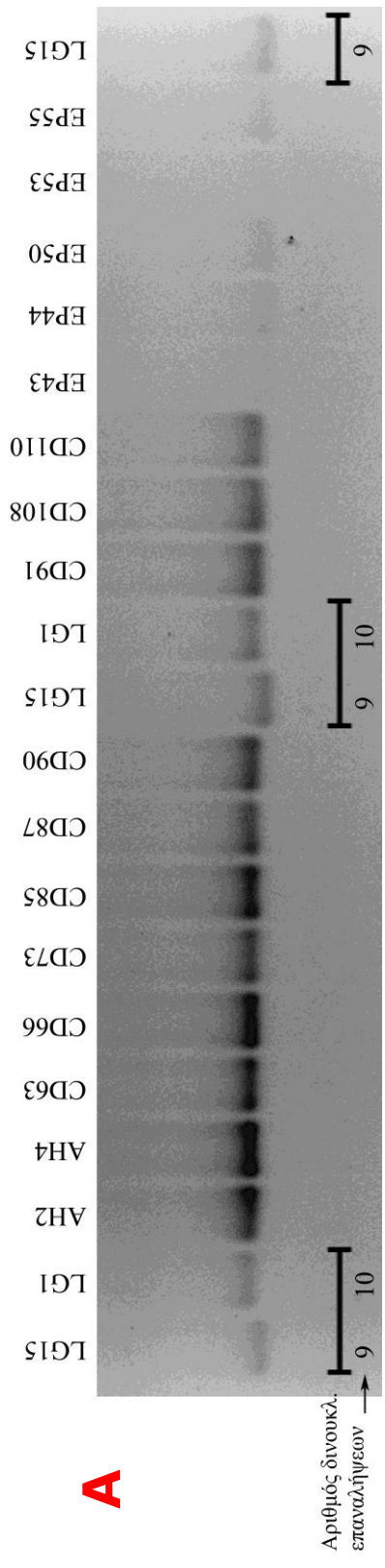
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



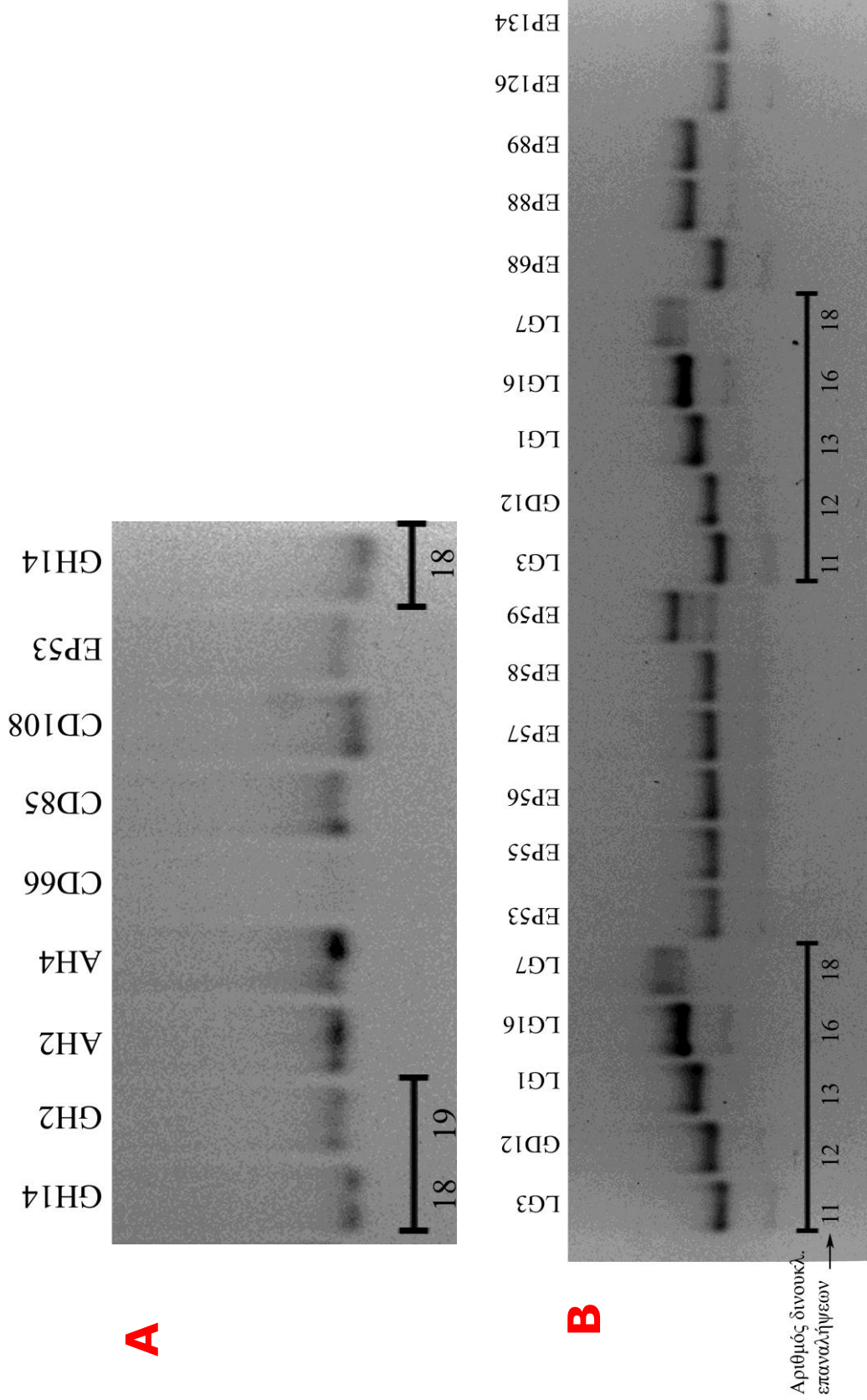
Μελέτη στελεχών με τη χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Για να πάρουμε μια ευρύτερη εικόνα του πολυμορφισμού και των σχέσεων των στελεχών έγινε ανάλυση 15 στελεχών που απομονώθηκαν από σκύλους στην Κύπρο (πίνακας 5), 13 στελεχών που απομονώθηκαν από σκύλους και 2 από ανθρώπους στην Τουρκία (πίνακας 4) καθώς και 2 στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους στην Αλβανία (πίνακας 6). Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα 2, καθώς και στον πίνακα 3. Τα αποτελέσματα για τα 27 συνολικά στελέχη συγκεντρώθηκαν στον πίνακα 7.

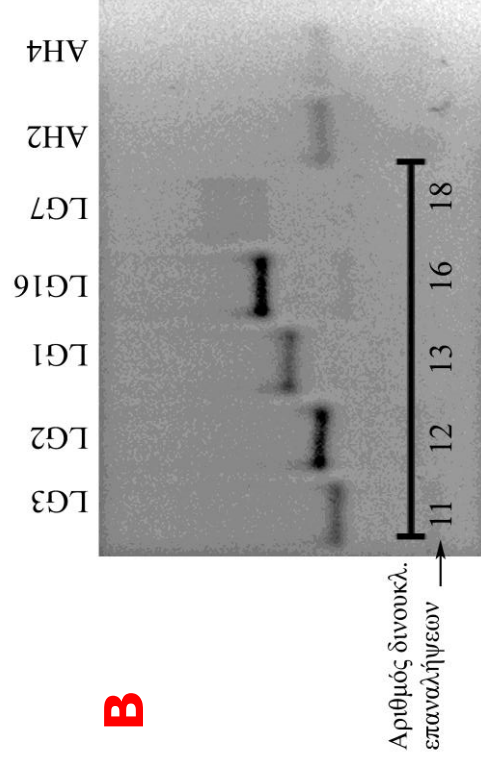
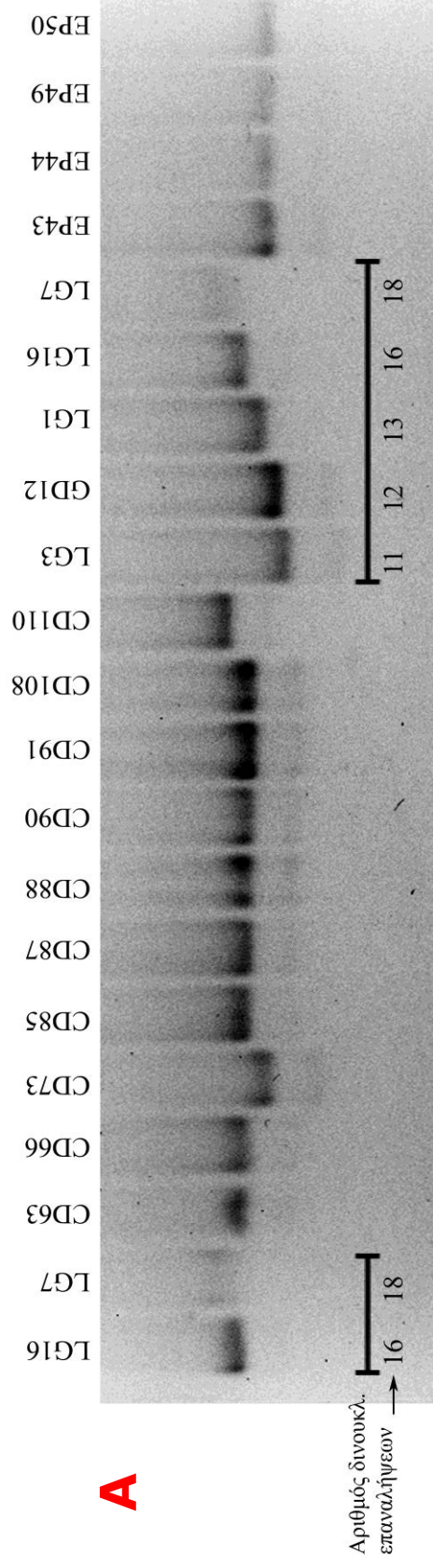
Για τον καθορισμό του μεγέθους των αλληλόμορφων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή MetaPhor. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες των πηκτών (εικόνες 11-21). Τα αλληλόμορφα σε μερικές περιπτώσεις δεν μπορούσαν να διακριθούν με βεβαιότητα και έτσι στις περιπτώσεις αυτές έγιναν επαναληπτικές ηλεκτροφορήσεις.



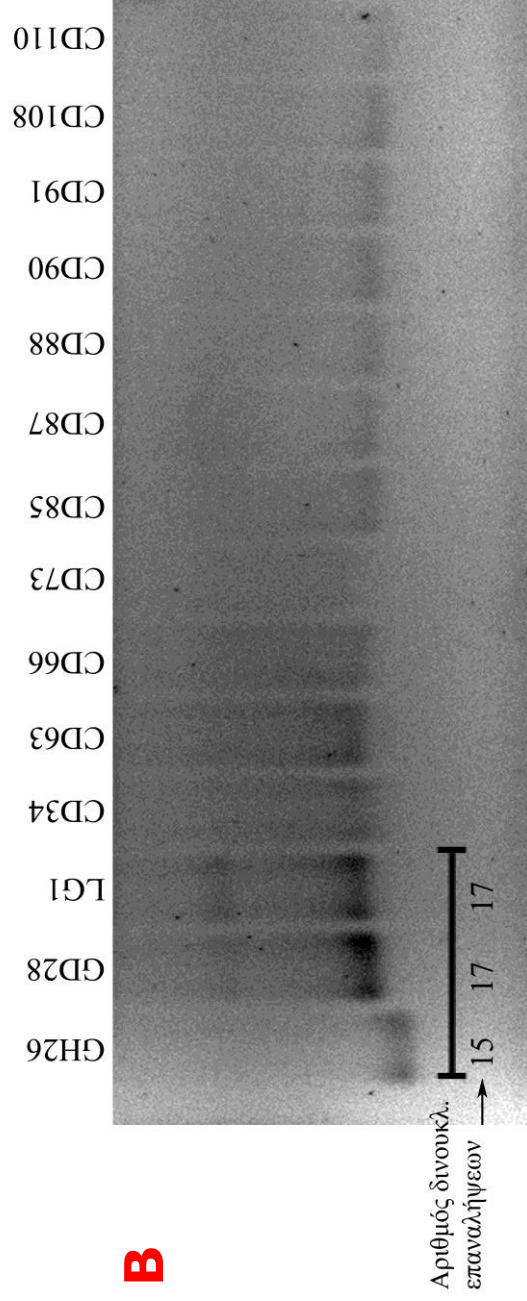
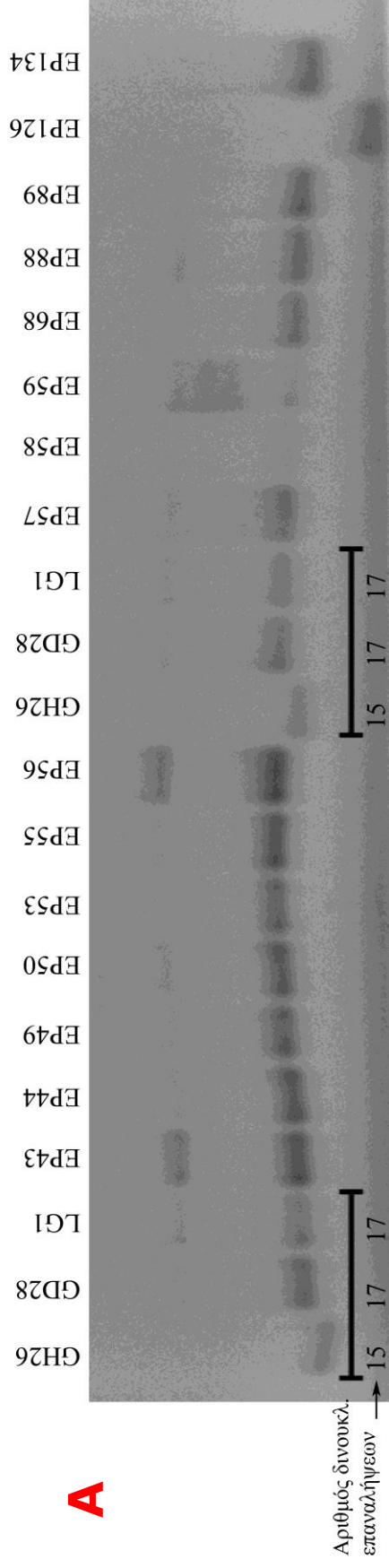
Εικόνα 11: **A.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li41-56 (B) με χρήση πηκτής MetaPhor
B.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li41-56 (B) με χρήση πηκτής Metaphor



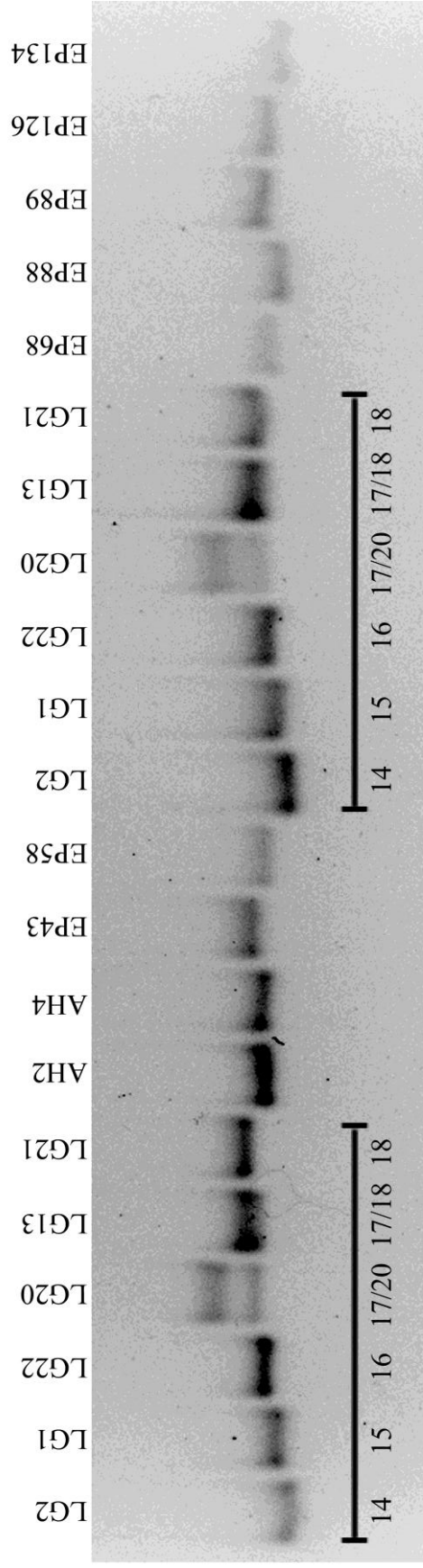
Εικόνα 12: **A**.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη CS20 με χρήση πηκτής MetaPhor. **B**.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li22-35 (E) με χρήση πηκτής MetaPhor.



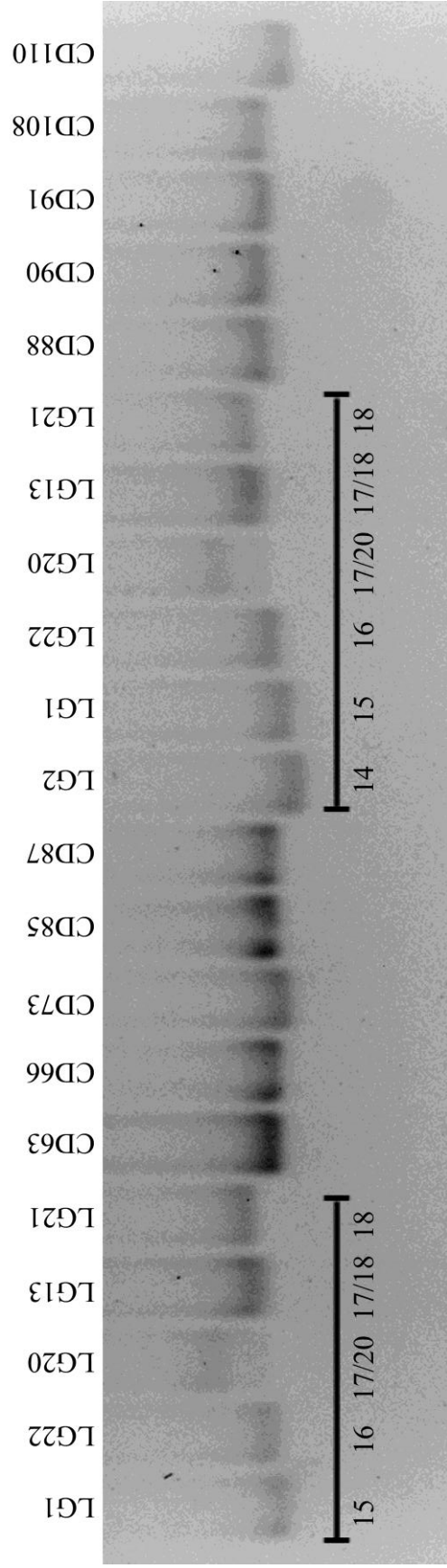
Εικόνα 13: **A**.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li22-35 (E) με χρήση πηκτής MetaPhor. **B**.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li22-35 (E) με χρήση πηκτής MetaPhor.



Εικόνα 14: **A.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li23-41 (F) με χρήση πηκτής MetaPhor
B.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li23-41 (F) με χρήση πηκτής MetaPhor



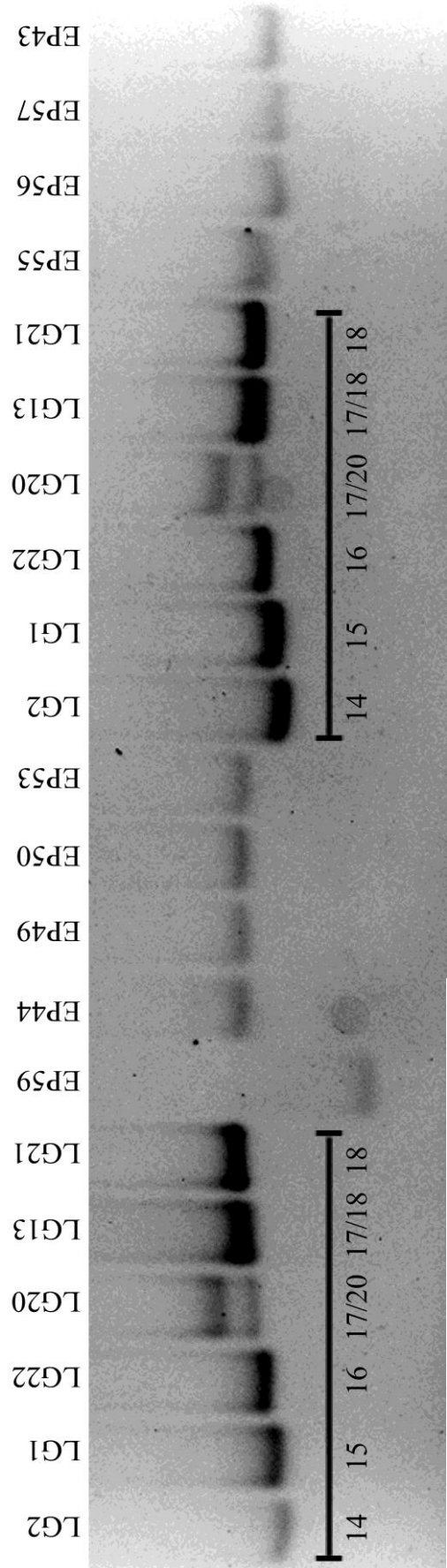
A



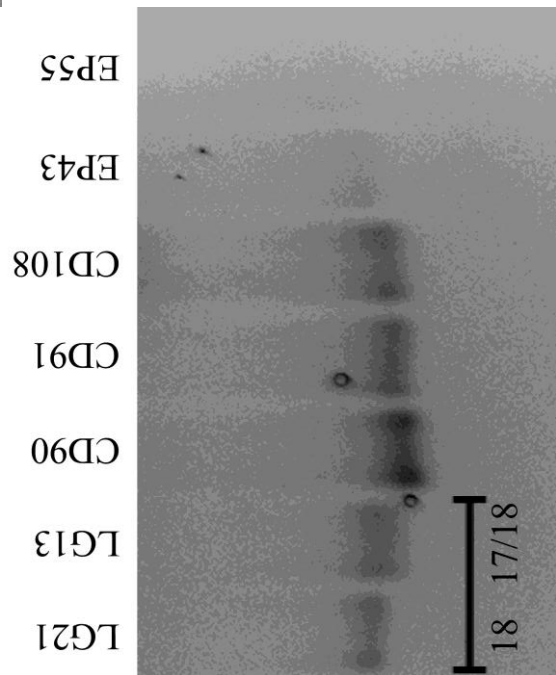
B

Εικόνα 15: **A.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li45-24 (G) με χρήση πηκτής MetaPhor **B.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li45-24 (G) με χρήση πηκτής MetaPhor

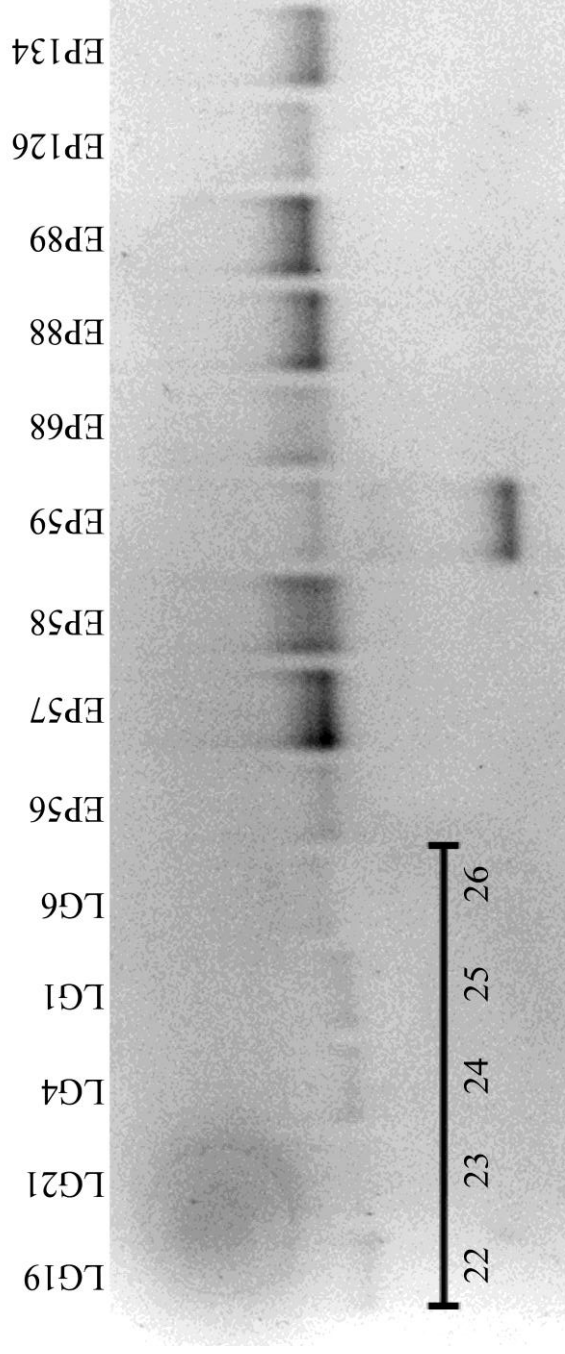
A



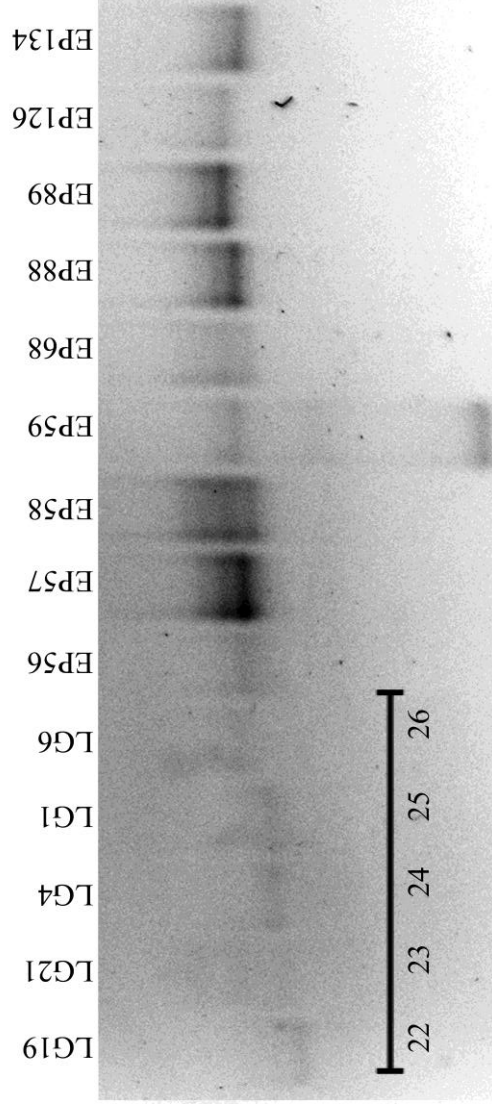
B



Εικόνα 16: **A**.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li45-24 (G) με χρήση πηκτής MetaPhor **B**.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li45-24 (G) με χρήση πηκτής MetaPhor

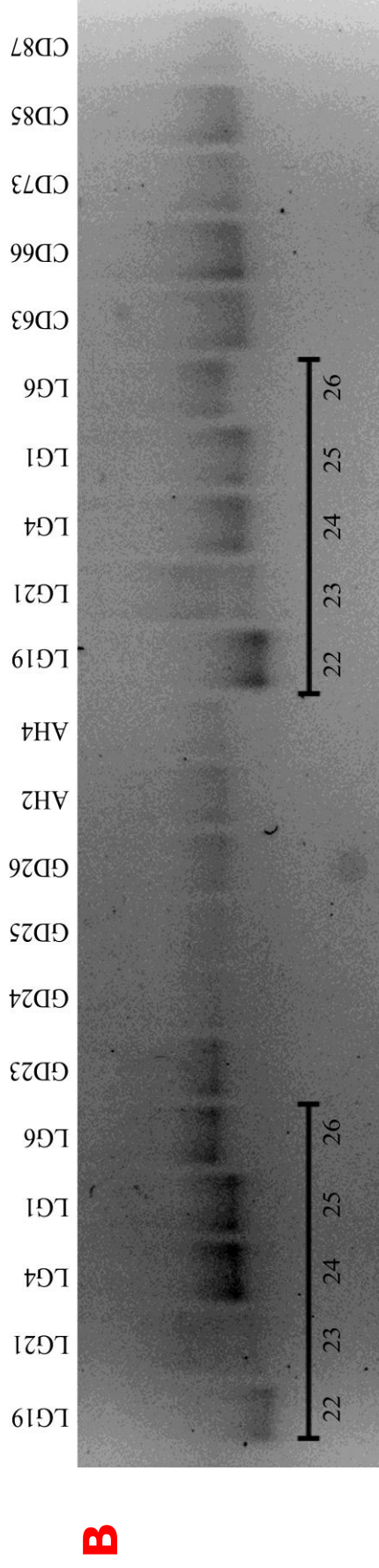
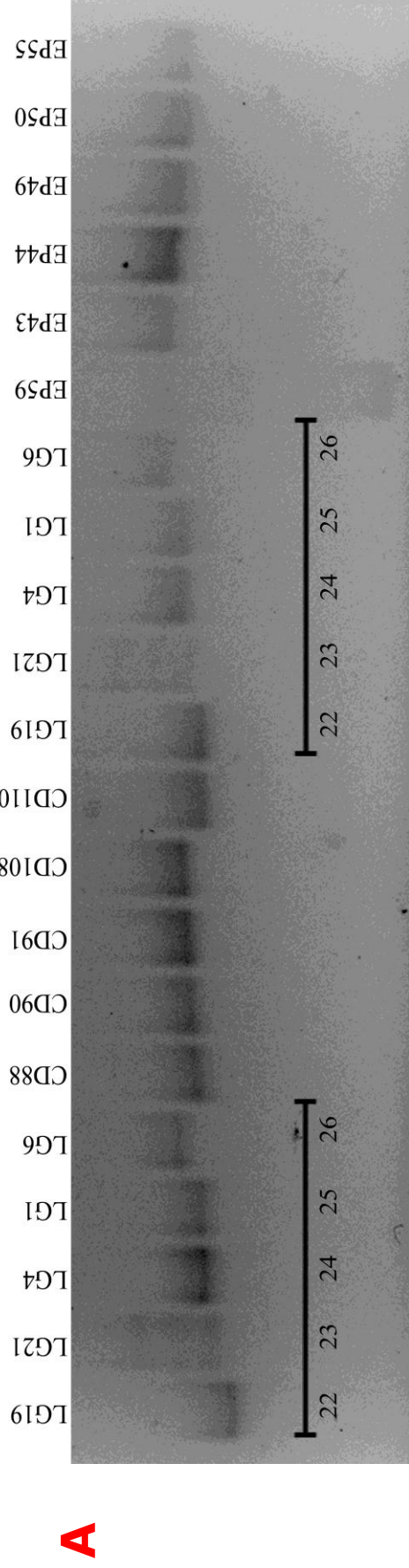


A

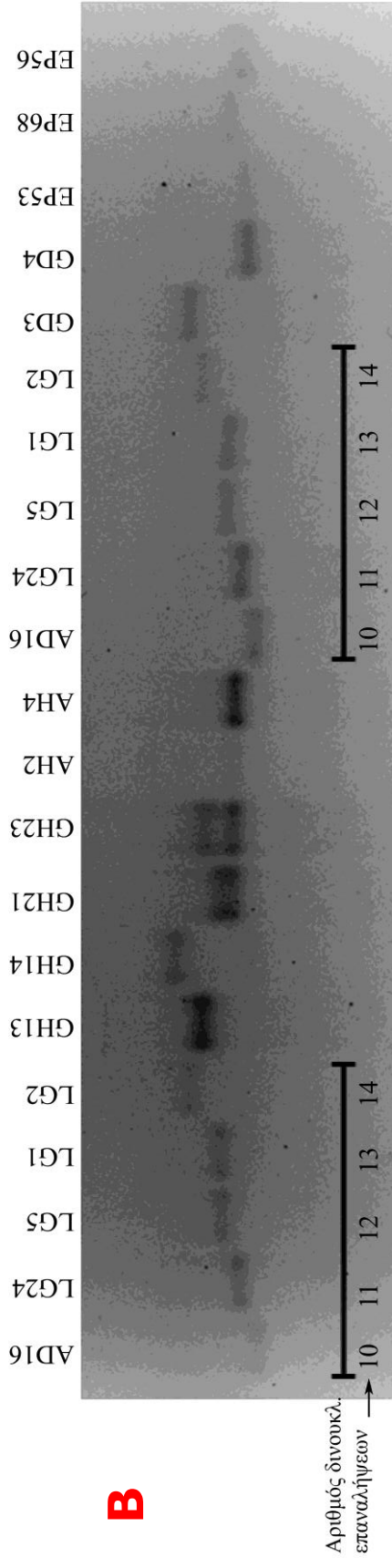
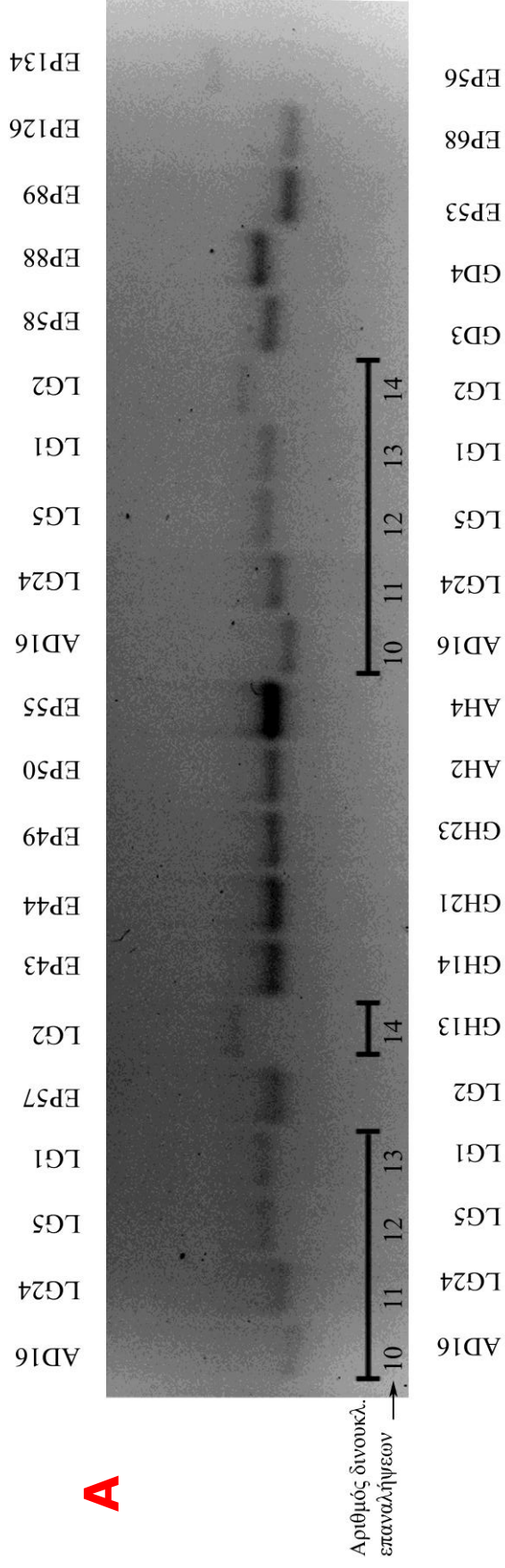


B

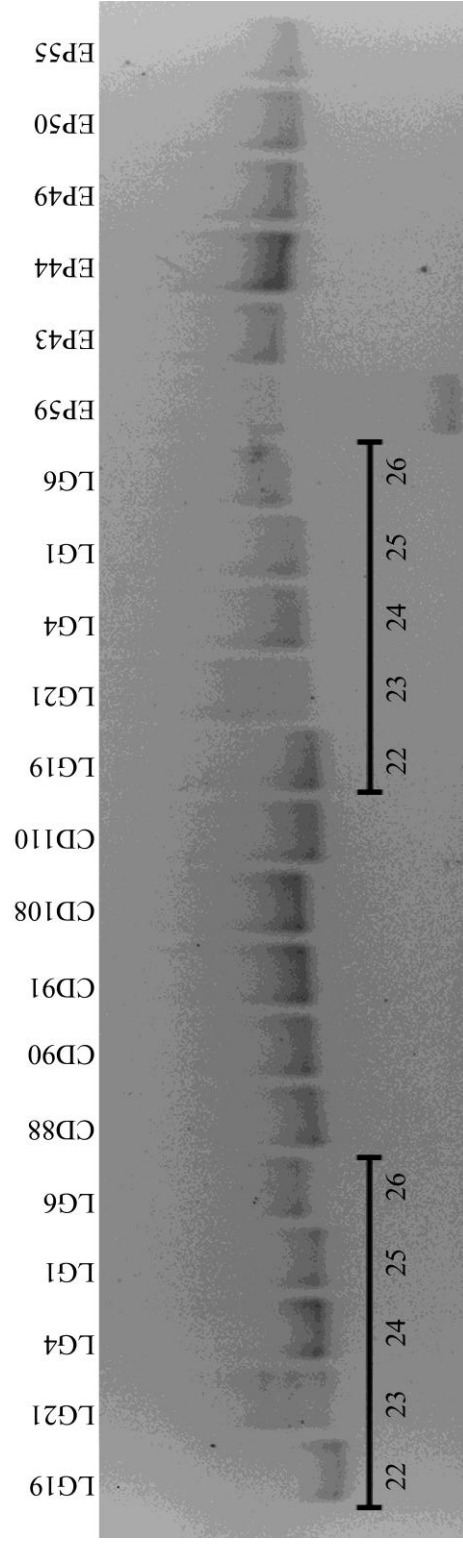
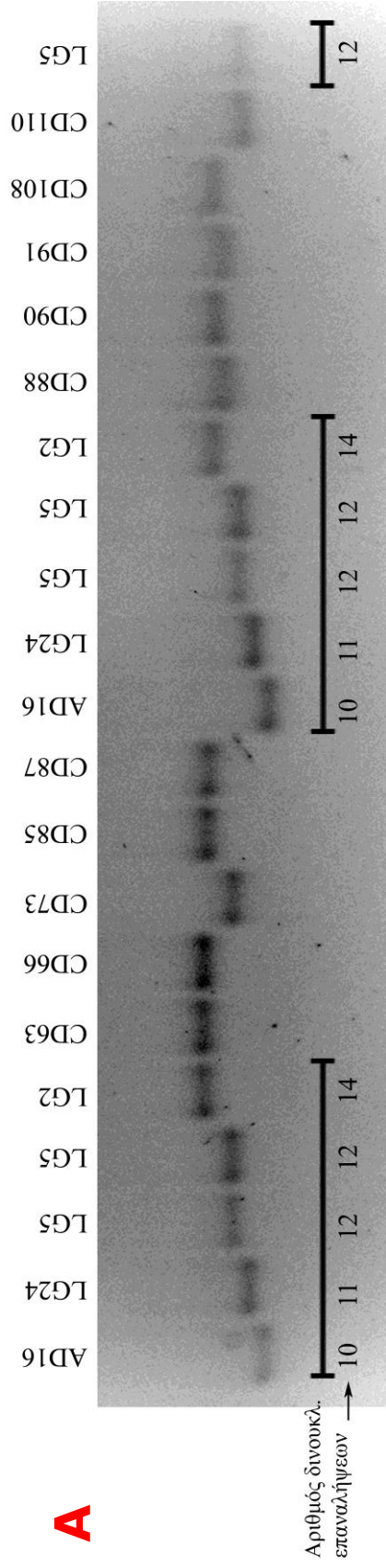
Εικόνα 17: **A.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Lm2TG με χρήση πηκτής MetaPhor **B.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Lm2TG με χρήση πηκτής MetaPhor



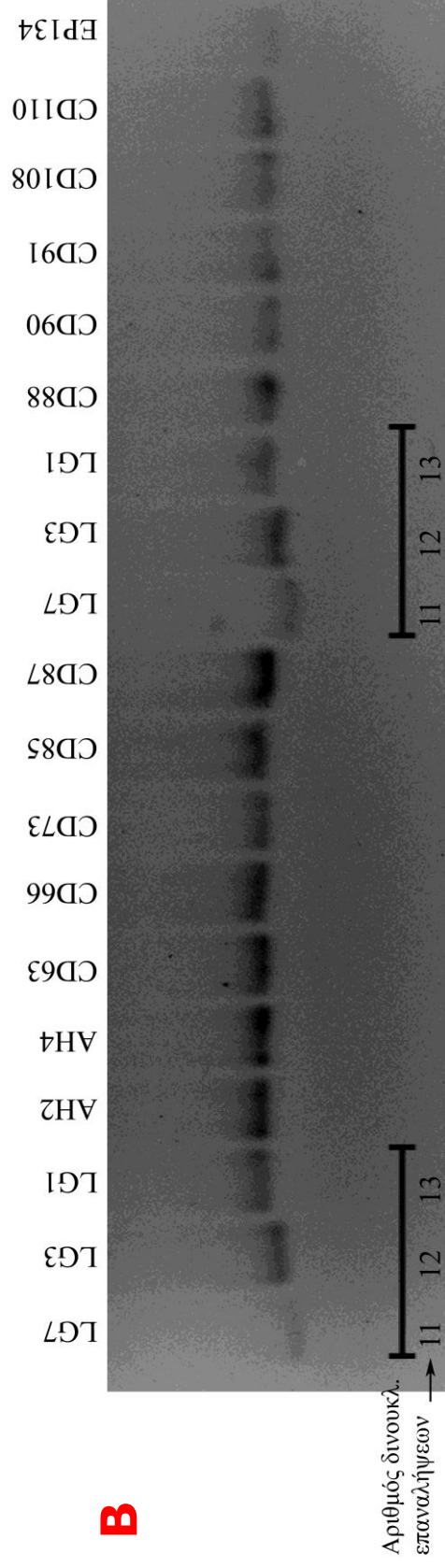
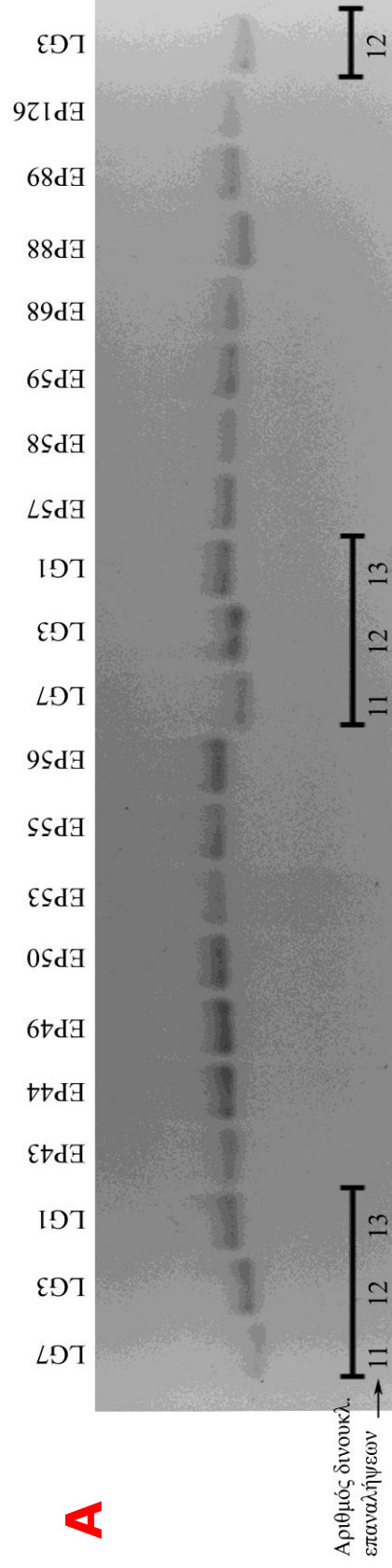
Εικόνα 18: **A.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Lm2TG με χρήση πηκτής MetaPhor
B.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Lm2TG με χρήση πηκτής MetaPhor



Εικόνα 19: **A**.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Lm4TA με χρήση πηκτής MetaPhor
B.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Lm4TA με χρήση πηκτής MetaPhor



Εικόνα 20: **A.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Lm4TA με χρήση πηκτής MetaPhor
B.Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Lm2TG με χρήση πηκτής MetaPhor



Εικόνα 21: **A.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li71-7 (R) με χρήση πηκτής MetaPhor **B.**Ανάλυση μεγέθους των PCR προϊόντων του δείκτη Li71-7 (R) με χρήση πηκτής MetaPhor

Στέλεχος	Ζυμόδεμα	Lm2TG (TG)	Lm4TA (TA)	E (CA)	G (AC)	F (GT)	R (CA)	B (CA)
Αλβανία (άνθρωπος)								
AH2	MON1	26	11	12	16		13	10
AH4	MON1	26	11	12	16		13	10
Κύπρος (σκύλος)								
CD66	MON1	24	14	16	16	16	13	10
CD73	MON1	25	12	13	15	17	13	10
CD85	MON1	25	14	16	16	16	13	10
CD87	MON1	25	14	16	16	16	12	10
CD88	MON1	24	13	16	17	16	13	
CD90	MON1	24	14	16	17	16	13	10
CD91	MON1	24	13	16	17	16	13	10
CD108	MON1	24	14	16	17	16	13	10
CD110	nd	22	12	18	15	16	13	10
Τουρκία (σκύλος)								
EP43	<i>L. infantum</i>	26	11	12	18	16	13	9
EP44		25	11	12	18	16	13	9
EP49	MON98	25	11	12	18	16	13	9
EP50	MON98	25	11	12	18	16	13	9
EP53	MON98		11	12	18	16	13	9
EP55		25	11	12	17	16	13	9
EP56		26	11	12	15	16	12	10
EP57		25/26	11	12	15	16	13	10
EP58		24/26	11	12	16	16	13	10
EP68	<i>L. infantum</i>	24/26	12	12	16	16	13	10
EP88		25/26	13	16	15	16	12	10
EP126	MON1	26	10	12	16	13	13	9
EP134	MON1	24	16	12	15	16	12	9
Τουρκία (άνθρωπος)								
EP59*	MON1							
EP89		26	10	16	17	16	13	9

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα 27 στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας και τους 7 μικροδορυφορικούς δείκτες.

*Η τυποποίηση του στελέχους EP59 περιγράφεται στις σελίδες 102-105.

Δείκτης	Πληθυσμός	Δείκτης	Πληθυσμός
Lm2TG	Παγκοσμίως	F	Παγκοσμίως
22	3,66	13	1,23
23	4,88	15	20,37
24	15,85	16	77,16
25	28,66	17	1,23
26	46,95	R	Παγκοσμίως
Lm4TA	Παγκοσμίως	12	12,65
10	3,61	13	87,35
11	41,57	CS19	Παγκοσμίως
12	6,63	16	11,40
13	17,47	17	86,84
14	27,11	18	1,75
15	2,41	CS20	Παγκοσμίως
16	1,20	18	6,35
E	Παγκοσμίως	19	93,65
12	55,42	B	Παγκοσμίως
13	4,82	9	40,74
16	34,94	10	59,26
18	4,82		
G	Παγκοσμίως		
14	3,66		
15	13,41		
16	65,85		
17	9,76		
18	7,32		

Πίνακας 8: Συχνότητες παγκοσμίως για κάθε δείκτη ξεχωριστά

Γονότυπος 1	GH3	GD18							
Γονότυπος 2	GH5	GH10	GD23	GD24	GD25	GD26	GD31	GD32	GD33
Γονότυπος 3	GH6	GH8	GH11	GH12	GD7	GD8			
Γονότυπος 4	GH22	GD17							
Γονότυπος 5	GH28	GD34							
Γονότυπος 6	AH2	AH4							
Γονότυπος 7	CD1	CD13	CD68	CD74					
Γονότυπος 8	CD21	CD22							
Γονότυπος 9	CD37	CD40	CD43	CD48	CD51				
Γονότυπος 10	EP49	EP50							

Πίνακας 9: Τα στελέχη κάθε γραμμής έχουν τον ίδιο γονότυπο

Δείκτης	Πληθυσμοί			
Lm2TG	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
22	4,76		4,17	
23	4,76		8,33	
24	2,38		41,67	15,38
25	35,71		16,67	34,62
26	52,38	100,00	29,17	50,00
Lm4TA	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
10		33,33		14,29
11	55,95	66,67		64,29
12	5,95		8,33	7,14
13	27,38		8,33	7,14
14	5,95		83,33	
15	4,76			
16				7,14
E	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
12	73,81	100,00		85,71
13	7,14		4,17	
16	11,90		91,67	14,29
18	7,14		4,17	
G	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
14	7,32			
15	12,20		8,33	28,57
16	73,17	100,00	75,00	21,43
17	4,88		16,67	14,29
18	2,44			35,71
F	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
13				7,14
15	36,90		4,17	
16	63,10	100,00	91,67	92,86
17			4,17	
R	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
12	15,48		4,17	21,43
13	84,52	100,00	95,83	78,57
CS19	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
16	15,48			
17	82,14	100,00	100,00	
18	2,38			
CS20	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
18	7,14		5,88	
19	92,86	100,00	94,12	100,00
B	Ελλάδα	Αλβανία	Κύπρος	Τουρκία
9	43,90		26,09	64,29
10	56,10	100,00	73,91	35,71

Πίνακας 10: Ταξινόμηση σε επίπεδο δείκτη: συχνότητες αλληλόμορφων για όλους τους πληθυσμούς

Πληθυσμιακή δομή στελεχών

Για την πληθυσμιακή ανάλυση συμπεριλήφθηκαν τα δεδομένα από 56 επιπλέον *L.infantum* στελέχη (από Ελλάδα και Κύπρο). Η ανάλυση των επιπλέον στελεχών έγινε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ πριν την έναρξη της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Τα στελέχη αυτά φαίνονται στον πίνακα 11.

Για τον καθορισμό της πληθυσμιακής δομής των *L.infantum* στελεχών χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πρόγραμμα MICROSAT (Minch et al., 1995) για τον υπολογισμό 500 πινάκων αποστάσεως D_{dm} . Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος υπολογισμού γενετικών αποστάσεων, Neighbor-joining (NJ) του προγράμματος PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 2002) για τον υπολογισμό του τελικού κλαδογράμματος (σχήμα 7) από τους 500 πίνακες αποστάσεως.

Οι κύριοι κλάδοι δεν φαίνεται να στηρίζονται στατιστικά με υψηλές τιμές (bootstrap values), κάτι που πιθανόν να οφείλεται στην μικρή γενετική απόσταση των στελεχών *L. infantum* ή και σε πιθανή ομοπλασία στα δεδομένα των μικροδορυφορικών αλληλουχιών. Εντούτοις, μερικές υπο-ομάδες, εσωτερικά των κυρίων κλάδων, είχαν καλύτερη στατιστική στήριξη με τιμές μεγαλύτερες του 50.

Είναι ενδιαφέρον ότι υπάρχει ξεκάθαρη ομαδοποίηση των Κυπριακών στελεχών σε έναν από τους υποκλάδους.

Τα στελέχη από την Τουρκία αντίθετα, δεν φαίνεται να μπορούν να διαφοροποιηθούν από τα Ελληνικά στελέχη. Μερικά, όμως από τα Τουρκικά στελέχη σχηματίζουν ένα κλάδο με τα MON-98 στελέχη από την Ελλάδα. Συνολικά στον κλάδο αυτό περιλαμβάνονται 9 MON-98 στελέχη (3 Τουρκικά και 6 Ελληνικά).

Επιπρόσθετα μπορούμε να δούμε μια ομαδοποίηση των στελεχών από τον Νομό Λασιθίου της Κρήτης.

Για τον καθορισμό της πληθυσμιακής δομής χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ένας αλγόριθμος που βασίζεται στο Μπεϋζιανό μοντέλο (Bayesian model, πρόγραμμα STRUCTURE). Ο αλγόριθμος αυτός αναγνωρίζει αρχικά τον αριθμό των γενετικά διακριτών πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τις συχνότητες των αλληλόμορφων. Στην συνέχεια υπολογίζει για κάθε στέλεχος το ποσοστό του γονότυπου που ανήκει σε κάθε πληθυσμό και δημιουργεί τις γενετικές ομάδες. Αυτή η μέθοδος φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα από τις μεθόδους ομαδοποίησης γενετικών αποστάσεων, σε δεδομένα μικρής ποικιλομορφίας (στελέχη MON-1). Για τη δημιουργία του διαγράμματος Structure δοκιμάστηκε πλήθος πληθυσμών $K=1$ έως $K=7$. Τα δεδομένα φαίνεται να εφαρμόζονται καλύτερα για $K=4$, αυτός είναι ο αριθμός πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκε (σχήμα 8).

Οι πληθυσμοί κατατάσσονται ως εξής:

K1: περιλαμβάνει σχεδόν αποκλειστικά όλα τα στελέχη από το Λασίθι (10 στελέχη από τα συνολικά 14 στελέχη από τον νομό αυτό), 2 Αλβανικά και 2 Τουρκικά

K2: περιλαμβάνει τα 23 από τα 26 Κυπριακά στελέχη και 1 Ελληνικό

K3: περιλαμβάνει σχεδόν αποκλειστικά όλα τα MON-98 στελέχη (10 στελέχη από τα συνολικά 14 MON-98). 12 Ελληνικά (8 στελέχη MON-98 και 4 MON-1) και 8 Τουρκικά στελέχη (3 στελέχη MON-98 και 5 που δεν έχουν τυποποιηθεί με τη μέθοδο MLEE).

K4: περιλαμβάνει 12 Ελληνικά, 4 Τουρκικά και 3 Κυπριακά στελέχη.

Στο σχήμα 8, η γονιδιακή ροή μεταξύ των τεσσάρων πληθυσμών είναι εμφανής (μερικές γραμμές δεν αποτελούνται αποκλειστικά από ένα χρώμα), καθώς πολλοί γονότυποι δεν αποδίδονται αποκλειστικά σε ένα πληθυσμό αλλά σε περισσότερους. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι, ο καθορισμός των στελεχών κατά κύριο λόγο σε ένα πληθυσμό είναι πιο εμφανής.

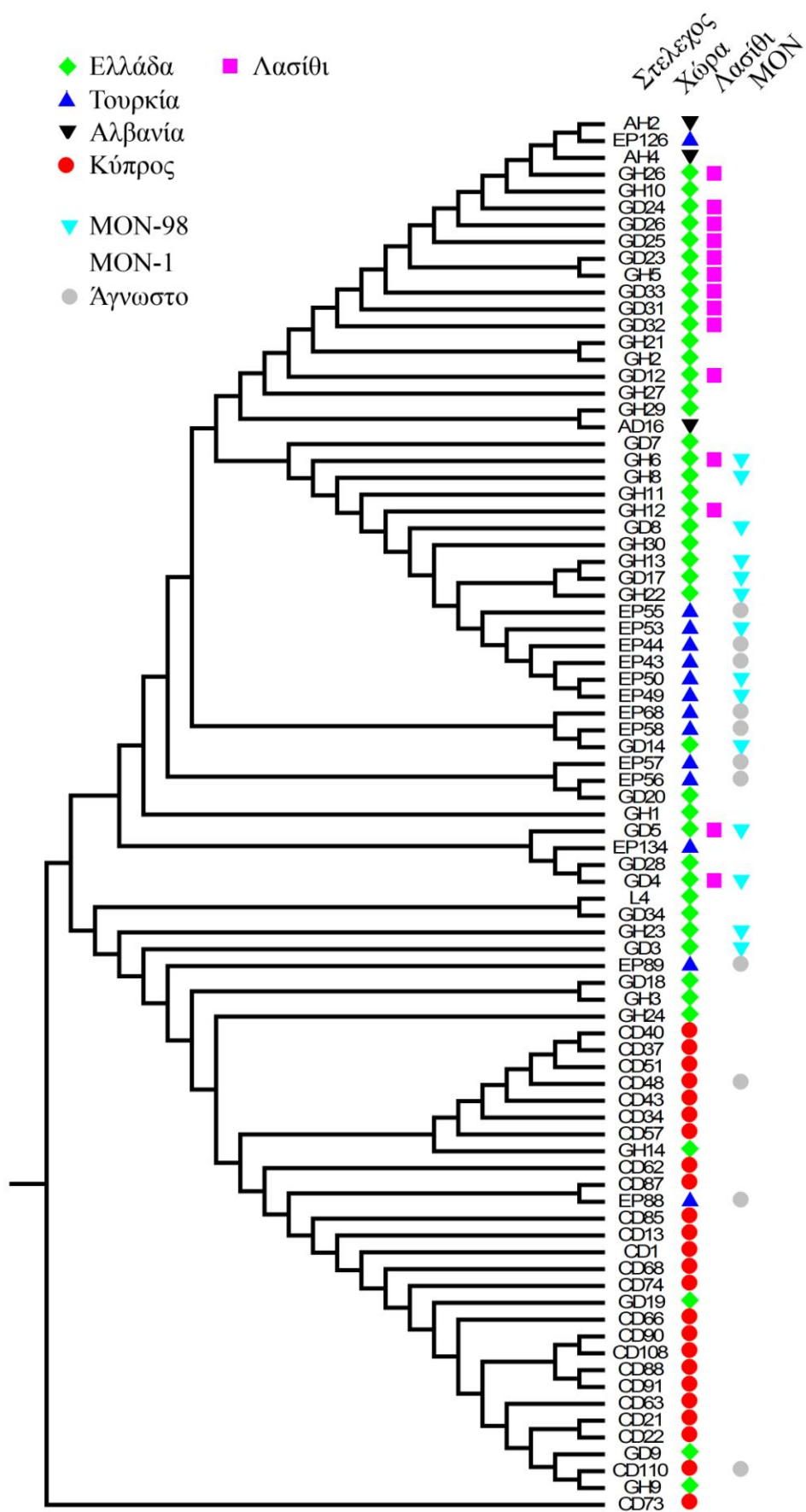
Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι όταν τέθηκε $K=3$ τότε φάνηκε ότι τα Κυπριακά στελέχη αποτελούν ένα πληθυσμό, οι δύο επιπλέον πληθυσμοί περιέχουν αναμιγμένα Ελληνικά και Τουρκικά στελέχη τα οποία διαχωρίζονται σε δυο πληθυσμούς.

	Lm2TG	Lm4TA	E	G	F	R	CS19	CS20	B
GH1	25	12	12	14	16	12	16	19	10
GH2	26	12	12	16	15	13	17	19	10
GH3	25	13	16	16	16	12	16	19	10
GH5	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH6	26	11	12	16	16	13	17	19	9
GH8	26	11	12	16	16	13	17	19	9
GH9	23	13	18	16	16	12/13	16/17	19	9
GH10	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH11	26	11	12	16	16	13	17	19	9
GH12	26	11	12	16	16	13	17	19	9
GH13	25	13	12	18	16	13	17	19	9
GH14	26	15	16	15	16	13	17	18	10
GH21	26	11/12	12	16	15	13	17	19	10
GH22	25	13	12	17	16	13	17	19	9
GH23	23/25	11/13	12/18	15	16	13	17	19	9
GH24	25	13	16	16	16/15	13	17	19	9
GH26	26	11	12	16	15	13	18	19	10
GH27	26	11	12	16	15	12	17	19	9
L4	25	13	13	15	16	13	17	18	10
GH29	26	11	12	16	16	13	17	19	10
GH30	26	11	12		16	13	17	19	9
GH3	25	15	12/18	14	15	13	17	19	9
GH4	22	13	12	14	16	13	16/17	19	9
GH5	25	14	12	16	16	13	16/17	19	10
GH7	26	11	12	16	16	13	17	19	9
GH8	26	11	12	16	16	13	17	19	9
GH9	23/25	11/14	18	16	16	13	17	19	9
GH12	25	11	12	16	15	13	17	19	10
GH14	25	11	12	16	16	13	16	19	9
GH17	25	13	12	17	16	13	17	19	9

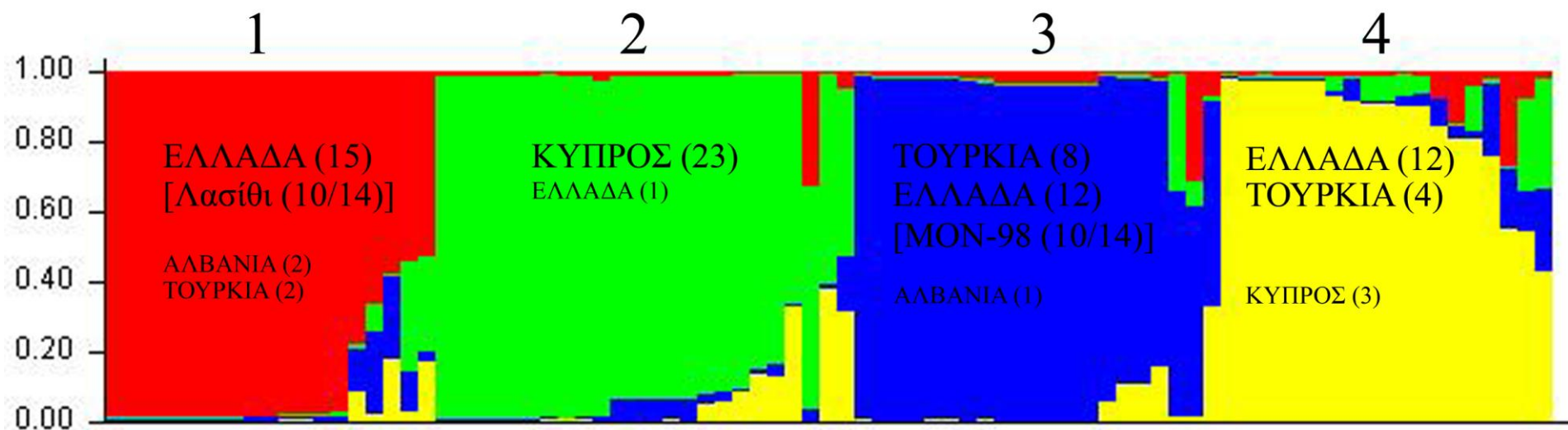
GH18	25	13	16	16	16	12	16	19	10
GH19	24	14	16	16	16	12	16	19	10
GH20	25	11	12	16	16	12	17	19	
GH23	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH24	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH25	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH26	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH28	22	13	13	15	16	13	17	19	10
GH31	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH32	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH33	26	11	12	16	15	13	17	19	10
GH34	25	13	13	15	16	13	17	18	10
AH2	26	11	12	16		13		19	10
AH4	26	11	12	16		13		19	10
AH16	26	10	12	16	16	13	17	19	10
CD1	24	14	16	16	16	13	17	19	10
CD13	24	14	16	16	16	13	17	19	10
CD21	23	14	16	16	16	13	17	19	10
CD22	23	14	16	16	16	13	17	19	10
CD34	26	14	16	16	15	13	17	19	9
CD37	26	14	16	16	16	13	17	19	9
CD40	26	14	16	16	16	13	17	19	9
CD43	26	14	16	16	16	13	17	19	9
CD48	26	14	16	16	16	13	17	19	9
CD51	26	14	16	16	16	13	17	19	9
CD57	26	14	16	16	16	13	17	19	10
CD62	25	14	16	16	16	13	17	19	10
CD68	24	14	16	16	16	13	17	19	10
CD74	24	14	16	16	16	13	17	19	10
CD63	24	14	16	16	16	13			10
CD66	24	14	16	16	16	13		19	10
CD73	25	12	13	15	17	13			10

CD85	25	14	16	16	16	13	19	10
CD87	25	14	16	16	16	12		10
CD88	24	13	16	17	16	13		
CD90	24	14	16	17	16	13		10
CD91	24	13	16	17	16	13		10
CD108	24	14	16	17	16	13	18	10
CD110	22	12	18	15	16	13		10
EP43	26	11	12	18	16	13		9
EP44	25	11	12	18	16	13		9
EP49	25/26	11	12	18	16	13		9
EP50	25/26	11	12	18	16	13		9
EP53		11	12	18	16	13	19	9
EP55	25/26	11	12	17	16	13		9
EP56	25	11	12	15	16	12		10
EP57	25/26	11	12	15	16	13		10
EP58	24/26	11	12	16	16	13		10
EP68	24/26	12	12	16	16	13		10
EP88	25/26	13	16	15	16	12		10
EP89	26	10	16	17	16	13		9
EP126	26	10	12	16	13	13		9
EP134	24	16	12	15	16	12		9

Πίνακας 11: Σε αυτό τον πίνακα συμπεριλήφθηκαν όλα τα *L.infantum* στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία του δενδρογράμματος.



Σχήμα 7: Κλαδόγραμμα Neighbor-joining (midpoint rooting), σύμφωνα με τον πίνακα γενετικών αποστάσεων Dps που έχει υπολογιστεί από δεδομένα 9 μικροδορυφορικών δεικτών.



Σχήμα 8: Πληθυσμιακή δομή των Μεσογειακών *L. infantum* στελεχών, όπως έχει υπολογιστεί με το πρόγραμμα STRUCTURE, σύμφωνα με δεδομένα από 14 μικροδορυφορικούς δείκτες για 141 στελέχη. Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των στελεχών. Κάθε στέλεχος αντιπροσωπεύεται με μια κάθετη γραμμή που έχει το χρώμα του πληθυσμού στον οποίο ανήκει ($K=4$). Το χρώμα κατά μήκος κάθε γραμμής δείχνει το υπολογισμένο ποσοστό συμμετοχής του στελέχους, σε κάθε πληθυσμό.

Το στέλεχος EP59

Στην ανάλυση του μεγέθους των προϊόντων PCR των διάφορων δεικτών με πηκτή MetaPhor το δείγμα EP59 συμπεριφέρθηκε διαφορετικά από το αναμενόμενο (εικόνα 23). Στο εργαστήριο, στο οποίο τυποποιήθηκε με τη μέθοδο MLEE, ορίστηκε ως MON-1. Στα πειράματα που έγιναν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας φάνηκε πως το στέλεχος EP59 όχι μόνο δεν ανήκει στο MON-1 ζυμόδεμα (*L.infantum*), αλλά ανήκει σε διαφορετικό είδος, στο είδος *L.donovani*.

Αυτό αποδείχτηκε με τους εξής τρόπους:

1α: ανάλυση μεγέθους αμπλικονίων σε πηκτή MetaPhor με θετικούς μάρτυρες για τον *L.infantum* πληθυσμό (εικόνα 23)

1β: ανάλυση μεγέθους αμπλικονίων σε πηκτή MetaPhor με θετικούς μάρτυρες για τον *L. donovani* πληθυσμό (εικόνα 24)

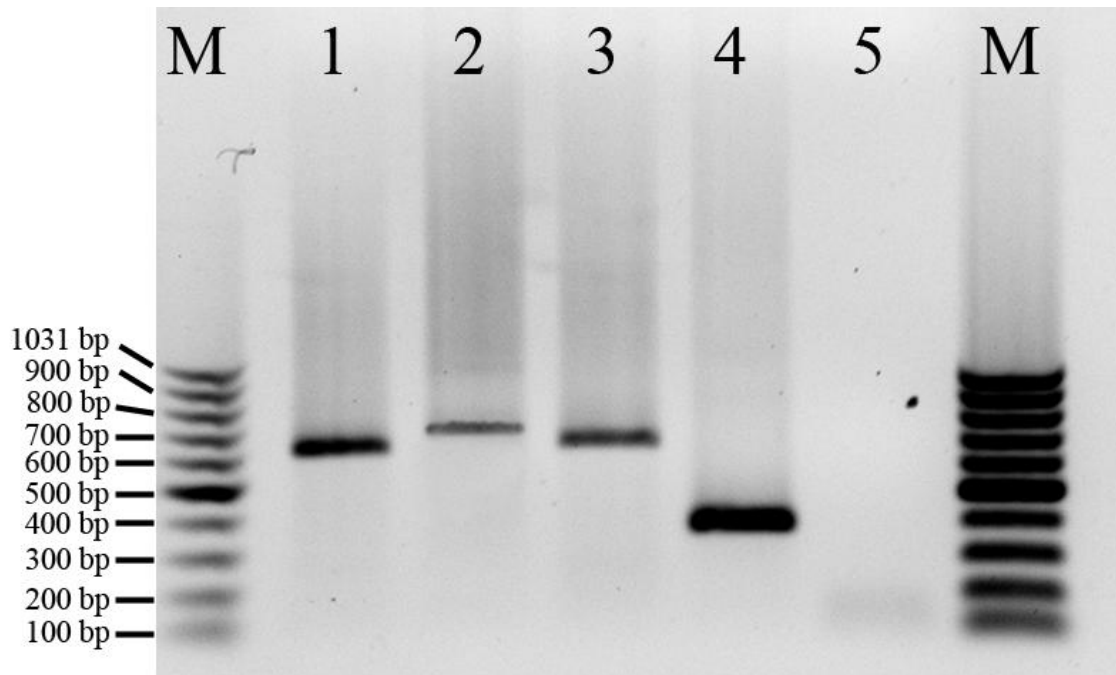
2: K26-PCR (εικόνα 22)

1: Ανάλυση με μικροδορυφορικούς δείκτες. Συγκεκριμένα για τον δείκτη G το στέλεχος εμφανίζει αμπλικώνιο με μέγεθος που παρατηρείται στα *L.donovani* στελέχη (13-18 επαναλήψεις για MON-1, 8-10 επαναλήψεις για *L.donovani*) (εικόνα 23α). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στον δείκτη Lm2TG όπου βρέθηκε αμπλικώνιο με χαμηλό μοριακό βάρος που δε συμβαδίζει με αυτό των MON-1 στελεχών (23-27 επαναλήψεις) αλλά ομοιάζει περισσότερο με αυτό των *L.donovani* στελεχών (~9 επαναλήψεις), (εικόνα 23γ). Για τον δείκτη E αλληλόμορφα με 15 και 17 επαναλήψεις ανευρίσκονται στα *L.donovani* καθώς και στα *L.infantum* στελέχη.

Τέλος είναι ενδιαφέρον ότι η ανάλυση του στελέχους αυτού δίνει και στους τρεις δείκτες πολλαπλά αλληλόμορφα, ενώ συγκεκριμένα στον δείκτη E δίνει 3 αλληλόμορφα.

Στην συνέχεια έγινε ανάλυση του στελέχους αυτού με την χρήση θετικών μαρτύρων του είδους *L.donovani*. Αυτό επιβεβαίωσε ότι πραγματικά το στέλεχος αυτό έχει αμπλικώνια με μεγέθη που είναι συνήθη στα *L.donovani* στελέχη (εικόνα 24). Επιπρόσθετα έγινε σύγκριση του με 5 MON-37 (*L.donovani*) στελέχη που είχαν πρόσφατα απομονωθεί στην Κύπρο (Αντωνίου et al., 2008). Καθώς, η Κύπρος είναι γειτονική με την Τουρκία θεωρήθηκε ότι είναι πιθανό το στέλεχος EP59 να έχει παρόμοιο γονότυπο με τα 5 Κυπριακά στελέχη. Όπως φάνηκε όμως από την ανάλυση, το στέλεχος αυτό φαίνεται να είναι διαφορετικό. Αυτό επιβεβαιώθηκε και με την χρήση της μεθόδου K26-PCR που περιγράφεται στην συνέχεια.

2: K26-PCR τυποποίηση. Η K26-PCR είναι ειδική για το σύμπλεγμα *L.donovani*. Παρά το γεγονός ότι το στελέχος EP59 τυποποιήθηκε ως MON-1 στο εργαστήριο που απομονώθηκε, δεν δίνει το χαρακτηριστικό αμπλικώνιο των 626 bp, αλλά αμπλικώνιο με μέγεθος 430 bp. (εικόνα 22). Το αμπλικώνιο αυτό συναντάται στα Αφρικανικά στελέχη *L.donovani* (Haralambous C. et al., 2008).



Εικόνα 22: Ανάλυση της K26-PCR του στελέχους EP59

Διαδρομές:

M: θετικός μαρτυράς 100 bp

1: LG 3 MON-1, μέγεθος αμπλικωνίου K26 626 bp

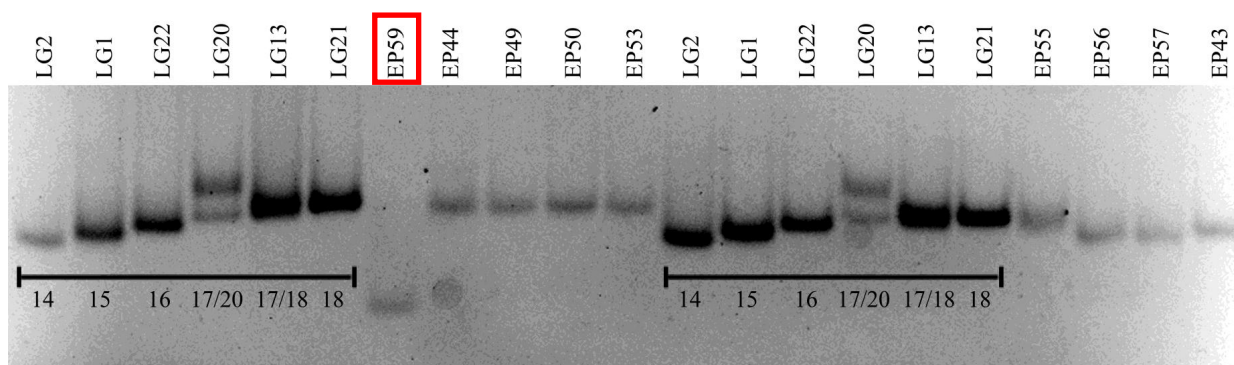
2: CH36 MON-37, μέγεθος αμπλικωνίου K26 700 bp

3: LG10 MON-2, μέγεθος αμπλικωνίου K26 660 bp

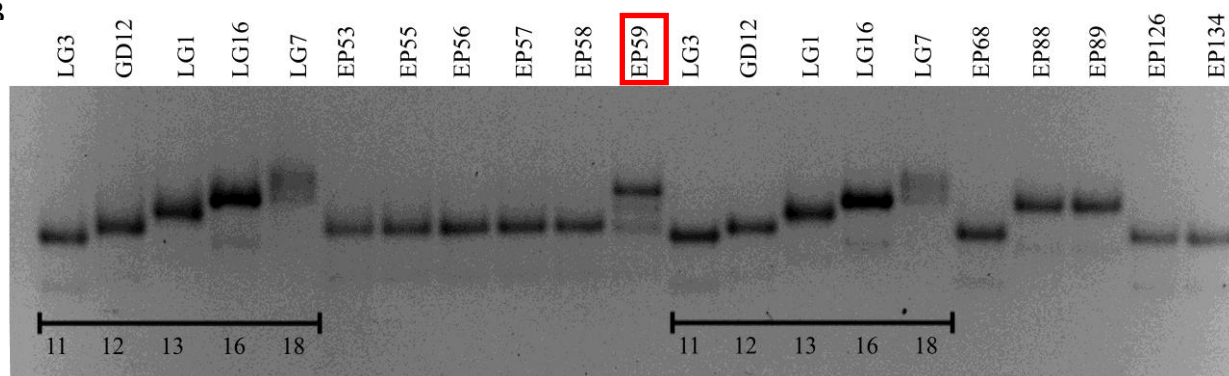
4: **EP59** μέγεθος αμπλικωνίου K26 430 bp

5: αρνητικός μαρτυράς

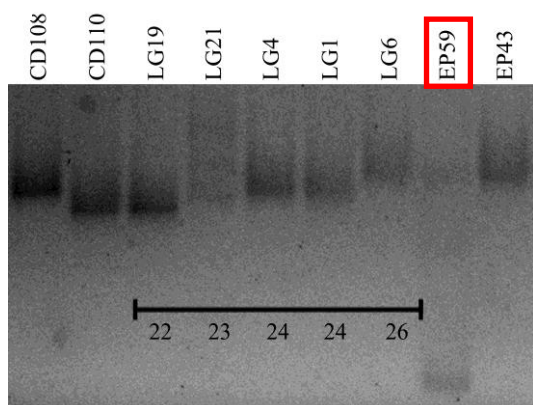
A



B



Γ



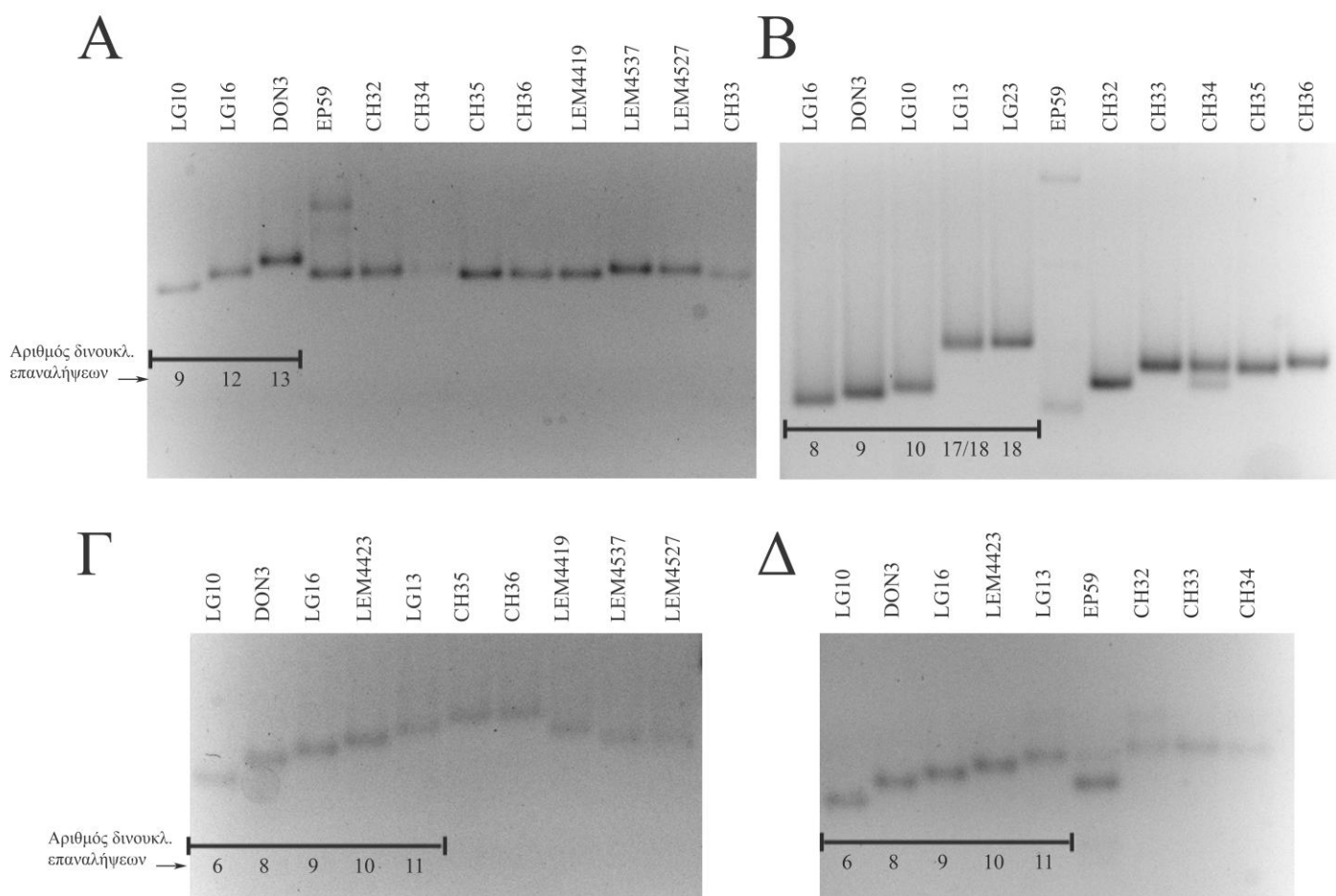
Εικόνα 23: Ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών των στελεχών από την Τουρκία με δείκτες *L. infantum*.

Οι αριθμοί κάτω από τις γραμμές δείχνουν τον αριθμό των επαναλήψεων.

A Δείκτης G,

B Δείκτης E,

Γ Δείκτης Lm2TG



Εικόνα 24: Ανάλυση του μεγέθους του στελέχους EP59 σε πηκτή MetaPhor με δείκτες *L. donovani*.

Οι αριθμοί κάτω από τις γραμμές δείχνουν των αριθμό των επαναλήψεων.

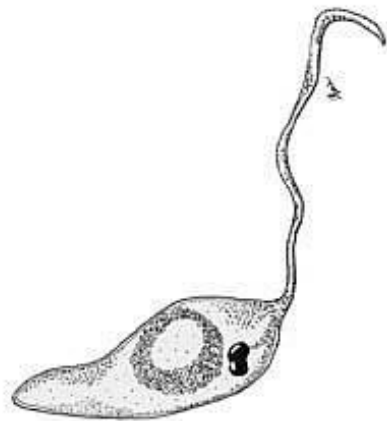
A. δείκτης Lm2TG

B. δείκτης G

Γ. δείκτης Lm4TA

Δ. δείκτης Lm4TA

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Αποτελέσματα που προκύπτουν από την πληθυσμιακή ανάλυση

Η πληθυσμιακή δομή των στελεχών *L. infantum* από την Μεσόγειο είναι ελάχιστα κατανοητή. Το κύριο πρόβλημα είναι ότι η πλειονότητα των στελεχών της περιοχής ανήκουν σε ένα ζυμόδεμα, το ζυμόδεμα MON-1. Η πρόσφατη ανάπτυξη μικροδορυφορικών δεικτών με διακριτική ικανότητα ικανή για την διαφοροποίηση των πληθυσμών MON-1 (Ochsenreither et al., 2006; Kuhls et al., 2007), επιτρέπει για πρώτη φορά την διερεύνηση διαφόρων σημαντικών επιδημιολογικών ερωτημάτων όπως:

- α) η ύπαρξη γεωγραφικών υποπληθυσμών και η έκταση της γενετικής ροής μεταξύ τους,
- β) η επίδραση του ξενιστή-δεξαμενή (σκύλος) στην επιδημιολογία της ανθρώπινης σπλαχνικής λεισμανίασης,
- γ) η ικανότητα αναγνώρισης της αναζωπύρωσης από την επαναμόλυνση σε ασθενείς στους οποίους έχει δοθεί θεραπεία.

Για πρώτη φορά έγινε ανάλυση στελεχών MON-1 από την Κύπρο. Τα στελέχη αυτά ομαδοποιούνται σε διαφορετικό πληθυσμό από αυτόν των Ελληνικών και Τουρκικών στελεχών. Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τις συχνότητες αλληλομόρφων του Κυπριακού πληθυσμού με αυτές των δύο πληθυσμών που βρέθηκαν από τους Kuhls et al. (Kuhls et al., υπό κρίση) (Πορτογαλίας και ηπειρωτικής Ισπανίας, νησιών Μαγιόρκας και Ίμπιζας), φαίνεται ότι διαφέρουν κατά πολύ στους δείκτες E και Lm4TA. Οπότε, αν και δεν έγινε πλήρης ανάλυση των δεδομένων, θα μπορούσε κάποιος να πει ότι τα Κυπριακά στελέχη διαφοροποιούνται από τους υπόλοιπους MON-1 πληθυσμούς στελεχών που έχουν βρεθεί μέχρι τώρα.

Μέσω τον πειραμάτων που έγιναν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα της μελέτης των Kuhls et al. (Kuhls et al., υπό κρίση) ότι τα Τουρκικά και τα Ελληνικά στελέχη δε διαφοροποιούνται σε διαφορετικούς πληθυσμούς (σχήμα 7 και 8). Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι στη δημοσίευση που αναφέρεται πιο πάνω χρησιμοποιήθηκαν μόνο 2 Τουρκικά στελέχη, ενώ στο πλαίσιο της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν 15 Τουρκικά στελέχη. Τα Τουρκικά στελέχη μαζί με άλλα Ελληνικά στελέχη βρέθηκαν κατά κύριο λόγο στους πληθυσμούς 3 και 4 του διαγράμματος structure (σχήμα 8). Η διαφοροποίηση των στελεχών στους δύο αυτούς πληθυσμούς φαίνεται να συσχετίζεται με την MLEE τυποποίηση των στελεχών. Ο πληθυσμός 3 του διαγράμματος structure (σχήμα 8), περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο MON-98 στελέχη. Ο πληθυσμός αυτός περιλαμβάνει 7 Ελληνικά MOM-98 στελέχη και 3 Τουρκικά MON-98

στελέχη. Τα υπόλοιπα Τουρκικά στελέχη που ομαδοποιούνται στο πληθυσμό αυτό δεν έχουν τυποποιηθεί με την MLEE τεχνική, κάτι που θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει, καθώς τότε θα ήταν δυνατό να πούμε ότι ο πληθυσμός $K=3$ αντιστοιχεί κατά κύριο λόγο στο ζυμόδεμα αυτό. Τα MON-98 στελέχη ομαδοποιήθηκαν και με την ανάλυση με την N-J μέθοδο των γενετικών αποστάσεων, όπως φαίνεται στο κλαδόγραμμα (σχήμα 7).

Το ζυμόδεμα MON-98, καθώς και τα ζυμοδέματα MON-77 και MON-108 διαφέρουν στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μόνο ενζύμου σε σχέση με το ζυμόδεμα MON-1. Οι Kuhls et al. (Kuhls et al., υπό κρίση) αναφέρανε ότι τα πιο πάνω ζυμοδέματα δεν μπορούσαν να διαφοροποιηθούν από τα υπόλοιπα MON-1 στελέχη. Επίσης η ανάλυση δεν έδειξε κάποια ομαδοποίηση των πιο πάνω στελεχών. Καθώς όμως τα στελέχη των ζυμοδεμάτων αυτών που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση αυτή ήταν λίγα, δεν είναι περίεργο το ότι δεν μπορέσανε να βρουν υποπληθυσμούς με τα στελέχη αυτά.

Τέλος η ανάλυση έδειξε την ύπαρξη ενός επιπλέον πληθυσμού Ελληνικών στελεχών που έχουν απομονωθεί από ασθενείς και σκύλους στο Νομό του Λασιθίου, κυρίως από την Σητεία (πληθυσμός 1 του διαγράμματος structure, σχήμα 8 και κλαδόγραμμα, σχήμα 73). Είναι πιθανό το εύρημα αυτό να σχετίζεται με την γεωγραφική απομόνωση της περιοχής του Λασιθίου, καθώς η περιοχή περιτριγυρίζεται από βουνά και θάλασσα. Διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών μιας χώρας, έχει βρεθεί και στην Ισπανία μεταξύ των στελεχών της ηπειρωτικής Ισπανίας και αυτών από τα νησιά Μαγιόρκα και Ίμπιζα (Kuhls et al., υπό κρίση).

Και οι δυο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία (δενδρόγραμμα, και διάγραμμα structure) φαίνεται να δίνουν παρόμοια αποτελέσματα, κάτι που ενισχύει την αξιοπιστία της ανάλυσης.

Θα ήταν ενδιαφέρον να αναλυθούν τα στελέχη με τους επιπλέον 6 δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω δημοσίευση (Kuhls et al., υπό κρίση) έτσι ώστε να μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματά της εργασίας αυτής με τα δικά τους. Αυτό θα οδηγούσε σε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της πληθυσμιακής δομής των *L.infantum* στελεχών στην Ευρώπη.

Η εύκολη μεταφορά των δεδομένων μεταξύ των εργαστηρίων είναι ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που έχει η ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών σε αντίθεση με άλλες μεθόδους όπως Fingerprinting και περιοριστική πέψη προϊόντων PCR-kDNA).

Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του διαγράμματος structure (σχήμα 8) είναι ότι μερικά στελέχη δεν ανήκουν αποκλειστικά σε ένα πληθυσμό, αλλά μέρος του γονότυπού τους φαίνεται να ανήκει σε άλλο πληθυσμό. Αυτό δείχνει την ύπαρξη γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών. Διάφορες άλλες μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι ο γενετικός ανασυνδυασμός είναι η πιο πιθανή εξήγηση των δεδομένων τους και ότι η σημασία του ανασυνδυασμού στο παράσιτο *Leishmania* έχει υποεκτιμηθεί μέχρι στιγμής (Mauricio et al., 2006; Lukes et al., 2007).

Ένα άλλο σημαντικό ερώτημα είναι η επίδραση του ξενιστή-δεξαμενή (σκύλος) στην επιδημιολογία της ανθρώπινης σπλαχνικής λεισμανίασης. Στελέχη απομονωμένα από ανθρώπους καθώς και από σκύλους έχουν βρεθεί και στους τρεις MON-1 πληθυσμούς (εκτός του πληθυσμού της Κύπρου, γιατί τα στελέχη αυτά είναι όλα απομονωμένα από σκύλους). Επιπλέον, στις τρεις ομάδες MON-1 βρέθηκαν στελέχη από ανθρώπους και σκύλους με ταυτόσημο γονότυπο. Αυτό δείχνει την μετάδοση του ίδιου παρασίτου μεταξύ ανθρώπων και σκύλων.

Εμφάνιση του είδους *L.donovani* στη Μεσόγειο

Το στέλεχος EP59

Στις χώρες της Μεσογείου, στην Μέση Ανατολή, στην Ασία και στην Νότια Αμερική είναι ενδημικό το παράσιτο *L. infantum*, που προκαλεί λεισμανίαση ζωνοτοκικού τύπου (ZVL). Κύριος ξενιστής-δεξαμενή του παρασίτου είναι οι σκύλοι, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση και εμφάνιση της ασθένειας. Παράσιτα του είδους *L.donovani* μπορούν επίσης να προκαλέσουν VL ενώ είναι υπεύθυνα και για post Kala-Azar δερματική λεισμανίαση (PKDL) καθώς και για τις επιδημίες στην Ινδική χερσόνησο (σπλαχνική λεισμανίαση ανθρωπονοτοκικού τύπου, AVL) και στην Ανατολική Αφρική (σπλαχνική λεισμανίαση ανθρωποζωνοτοκικού τύπου).

Αν και το είδος *L.donovani* δεν είναι ενδημικό στην Ευρώπη, το 2008 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η εύρεση στελεχών *L.donovani* MON-37 στην Κύπρο (Antonίου et al., 2008).

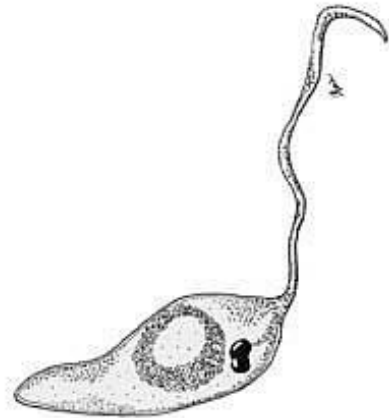
Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας αποκαλύφτηκε με δυο τρόπους ότι το στέλεχος EP59 ανήκει στο είδος *L. donovani*. Αυτή είναι η δεύτερη αναφορά ύπαρξης στελεχών *L. donovani* στην Ευρώπη, κάτι που έχει σημαντικές επιδημιολογικές επεκτάσεις.

Η τυποποίηση που έγινε στο στέλεχος αυτό, δείχνει ότι δεν ανήκει στο ζυμόδεμα MON-37, όπως το Κυπριακό στέλεχος, αυτό φαίνεται από την τυποποίηση με τη χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών, αλλά κυρίως με τη μέθοδο K26-PCR. Με τη μέθοδο αυτή αποδεικνύεται ότι μοιάζει με άλλα Αφρικανικά στελέχη (εικόνα 22). Το πρώτο στέλεχος που αναφέρθηκε ανήκει στα Ινδικά MON-37, ενώ το EP59 στα Αφρικανικά. Το γεγονός ότι τα στελέχη που έχουν απομονωθεί στην Κύπρο δεν έχουν ίδιο γονότυπο με το στέλεχος EP59, δείχνει ότι η εύρεση του στελεχών στην Τουρκία δεν είναι αποτέλεσμα της γειτνίασης της με την Κύπρο.

Η εξάπλωση του είδους αυτού σε μη ενδημικές περιοχές (Τουρκία, Ευρώπη) θα μπορούσε να αποτελέσει κίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

Η ανάλυση με μικροδορυφορικές αλληλουχίες για κάθε δείκτη έδωσε ένα αλληλόμορφο με μέγεθος που είναι σύνηθες για στελέχη *L.infantum* καθώς και ένα που είναι σύνηθες για *L.donovani* στελέχη. Συγκεκριμένα η εικόνα 24β έδωσε τρία αλληλόμορφα. Καθώς το παράσιτο είναι διπλοειδής οργανισμός αυτό δείχνει ότι έχουμε ταυτόχρονη μόλυνση με *L.infantum* και *L.donovani* στέλεχος. Αυτός πιθανόν είναι και ο λόγος που το στέλεχος αυτό είχε τυποποιηθεί λανθασμένα αρχικά ότι ανήκει στο ζυμόδεμα MON-1.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allahverdiyev, A.M., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M., Memisoglu, H.R., 2004. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 70, 294-297.
- Allison, M.J., 1993. *Leishmaniasis*. Cambridge University Press.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., Moreno, J., 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical microbiology reviews* 10, 298-319.
- Andresen, K.I., M.E; Theander, T.G. & Kharazmi, A., 1996. Random amplified polymorphic DNA for the differentiation of *Leishmania donovani* isolates from Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 204-205.
- Angelici, M.C., Gramiccia, M., Gradoni, L., 1989. Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology* 99 Pt 3, 301-309.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pratlong, F., Dedet, J.P., Soteriadou, K., 2008. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis* 8, 6-7.
- Arias, J.R., Naif, R.D., Miles, M.A., de Souza, A.A., 1981. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis* guyanensis in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75, 537-541.
- Ashford, D.A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J.C., Sherlock, I., Eulalio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degraeve, W., Barker, R.H., Jr., et al., 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53, 251-255.
- Banuls, A.L., Guerrini, F., Le Pont, F., Barrera, C., Espinel, I., Guderian, R., Echeverria, R., Tibayrenc, M., 1997. Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *J Eukaryot Microbiol* 44, 408-411.

- Banuls, A.L., Dujardin, J.C., Guerrini, F., De Doncker, S., Jacquet, D., Arevalo, J., Noel, S., Le Ray, D., Tibayrenc, M., 2000. Is *Leishmania (Viannia) peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. *J Eukaryot Microbiol* 47, 197-207.
- Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., 1992. Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. *Subcell Biochem* 18, 131-187.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S., 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55, 273-277.
- Besteiro, S., Williams, R.A., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37, 1063-1075.
- Blum, B., Simpson, L., 1990. Guide RNAs in kinetoplastid mitochondria have a nonencoded 3' oligo(U) tail involved in recognition of the preedited region. *Cell* 62, 391-397.
- Botilde, Y., Laurent, T., Quispe Tintaya, W., Chicharro, C., Canavate, C., Cruz, I., Kuhls, K., Schonian, G., Dujardin, J.C., 2006. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol* 6, 440-446.
- Bray, R.S., 1974. *Leishmania*. *Annual review of microbiology* 28, 189-217.
- Bryceson, A.D., 1970. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. 3. Immunological studies. IV. Pathogenesis of diffuse cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 64, 380-393.
- Bulle, B., Millon, L., Bart, J.M., Gallego, M., Gambarelli, F., Portus, M., Schnur, L., Jaffe, C.L., Fernandez-Barredo, S., Alunda, J.M., Piarroux, R., 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of clinical microbiology* 40, 3391-3397.

- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovao, J.M., Afonso, M.O., Dedet, J.P., 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical medicine & international health* 11, 1708-1714.
- Cavaliero, T., Arnold, P., Mathis, A., Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Deplazes, P., 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med* 13, 330-334.
- Chicharro, C., Morales, M.A., Serra, T., Ares, M., Salas, A., Alvar, J., 2002. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1, S93-99.
- Cortes, S., Rolao, N., Ramada, J., Campino, L., 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98, 12-17.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H., 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19, 111-126.
- Cruz, A.K., Titus, R., Beverley, S.M., 1993. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1599-1603.
- Cruz, I., Morales, M.A., Noguer, I., Rodriguez, A., Alvar, J., 2002b. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 359, 1124-1125.
- Cupolillo, E., Grimaldi Junior, G., Momen, H., Beverley, S.M., 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology* 73, 145-155.
- Dawson, K.J., Belkhir, K., 2001. A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. *Genet Res* 78, 59-77.

- de la Loma, A., Alvar, J., Martinez Galiano, E., Blazquez, J., Alcala Munoz, A., Najera, R., 1985. Leishmaniasis or AIDS? Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 79, 421-422.
- Deplazes, P., Grimm, F., Papaprodromou, M., Cavaliero, T., Gramiccia, M., Christofi, G., Christofi, N., Economides, P., Eckert, J., 1998. Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1. Acta Trop 71, 169-178.
- Dereure, J., Rioux, J.A., Gallego, M., Perieres, J., Pratlong, F., Mahjour, J., Saddiki, H., 1991. *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. Trans R Soc Trop Med Hyg 85, 595.
- Desjeux, P., 1999a. Global control and *Leishmania* HIV co-infection. Clin Dermatol 17, 317-325.
- Desjeux, P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 95, 239-243.
- Desjeux, P., 2004a. Leishmaniasis. Nature reviews 2, 692.
- Desjeux, P., 2004b. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27, 305-318.
- Dujardin, J.C., Banuls, A.L., Llanos-Cuentas, A., Alvarez, E., DeDoncker, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Arevalo, J., Tibayrenc, M., 1995. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. Acta Trop 59, 293-307.
- El Tai, N.O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M.A., Oskam, L., El Safi, S.H., Presber, W.H., Schonian, G., 2001. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. Exp Parasitol 97, 35-44.
- El Tai, N.O., O. F. , Osman, M., El Fari, W., Presber, a., Schönián, G., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter papers as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94:575-579.

- Ellegren, H., 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet* 16:551–558.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-2620.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J., 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). In, Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Felsenstein, J., 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Distributed by the author. In, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C., Moore, S.S., 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular biology and evolution* 12, 432-440.
- Gallego, M., Pratlong, F., Fisa, R., Riera, C., Rioux, J.A., Dedet, J.P., Portus, M., 2001. The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95, 269-271.
- Garifallou, A., Schnur, L.F., Stratigos, J.D., Hadziandoniou, M., Savigos, M., Stavrianeas, N., Serie, C., 1984. Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. *Ann Trop Med Parasitol* 78, 369-375.
- Germenis, A.E., 2000. Ιατρική Ανοσολογία. Παπαζήση, Αθήνα.
- Gillis, D., Klaus, S., Schnur, L.F., Piscopos, P., Maayan, S., Okon, E., Engelhard, D., 1995. Diffusely disseminated cutaneous *Leishmania major* infection in a child with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 14, 247-249.

- Gramiccia, M., 2003. The identification and variability of the parasites causing leishmaniasis in HIV-positive patients in Italy. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1, 65-73.
- Grimaldi, G., Jr., David, J.R., McMahon-Pratt, D., 1987. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 36, 270-287.
- Guerbouj, S., I. , Guizani, N., Speybroeck, D., Le Ray, a.J.C.D., 2001c. Genomic polymorphism of *Leishmania infantum*: a relationship with clinical pleomorphism. *Infect. Genet. Evol.* 1:49-59.
- Gutierrez-Solar, B., Smyth, A.J., Alvar, J., Barker, D.C., 1995. *Leishmania infantum*: sequence homology within minicircle classes regardless of geographical distance. *Experimental parasitology* 81, 416-419.
- Haralambous C., . 2007. Γονοτυπικός Προσδιορισμός ειδών και υποειδών του παρασίτου *Leishmania*. . Αθήνα 2007.
- Haralambous C., Antoniou M., Pratlong F., Dedet J.P., Soteriadou K., 2008. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60(1): 33-42.
- Haralampidis, S.T., 2001. Κτηνιατρική Παρασιτολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Haralampidis, S.T., Fridas, S., 1992. Ανίχνευση IgG-, IgM, IgE-*Leishmania infantum* στους κατοίκους της Μακεδονίας. In, 15^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας, Θεσσαλονίκη.
- Hide, M., Banuls, A.L., Tibayrenc, M., 2001. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology* 123, 425-432.
- Hommel, M., 1999. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *J Infect* 39, 101-111.

- Ibrahim, M.E., Barker, D.C., 2001. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. *Infect Genet Evol* 1, 61-68.
- Ikonomopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoitsiou, M., Gorgoulis, V.G., 2003. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 113, 99-113.
- Jamjoom, M.B., Ashford, R.W., Bates, P.A., Kemp, S.J., Noyes, H.A., 2002. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Ann Trop Med Parasitol* 96, 265-270.
- Kamhawi, S., 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22, 439-445.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 187, 409-419.
- Killick-Kendrick, R., 1979 *Biology of Leishmania in phlebotomine sandflies*. Academic Press, London.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., 2002. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia* 44, 67-71.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.P., Mauricio, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O., Schönan, G., Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania Infantum* MON-1 under review.
- Kuhls, K., Mauricio, I.L., Pratlong, F., Presber, W., Schonian, G., 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect* 7, 1224-1234.

- Kuhls, K., Keilonat, L., Ochsenreither, S., Schaar, M., Schweynoch, C., Presber, W., Schonian, G., 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect* 9, 334-343.
- Kyriakou, D.S., Alexandrakis, M.G., Passam, F.H., Kourelis, T.V., Foundouli, P., Matalliotakis, E., Maniatis, A.N., 2003. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? *Transfus Med* 13, 59-62.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Reynes, J., Lamothe, J., Bastien, P., 2001. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol* 39, 613-617.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40, 210-215.
- le Fichoux, Y., Quaranta, J.F., Aufeuvre, J.P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., Rousseau, D., Kubar, J., 1999. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 37, 1953-1957.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Mylonakis, M.E., 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 109, 19-27.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G., 1980. A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of protozoology* 27, 37-58.
- Lewin, S., Schonian, G., El Tai, N., Oskam, L., Bastien, P., Presber, W., 2002. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *Int J Parasitol* 32, 1267-1276.

- Lighthall, G.K.G., S. H., 1992. The chromosomes of *Leishmania*. Parasitol. Today 8, P192-198.
- Lukes, J., Mauricio, I.L., Schonian, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Obornik, M., Horak, A., Ayala, F.J., Miles, M.A., 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 9375-9380.
- Macedo, A.M., J. R. Pimenta, R. S. de Aguiar, A. I. R. Melo, E. Chiari, B. Zingales, S. D. J. Pena, a., Oliveira, R.P., 2001. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96:407-413.
- Mallinson, D.J., Coombs, G.H., 1989. Interaction of *leishmania* metacyclics with macrophages. Int J Parasitol 19, 647-656.
- Marfurt, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C.L., Beck, H.P., Felger, I., 2003a. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of clinical microbiology 41, 3147-3153.
- Martin-Sanchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Marquez, F., 2004. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. Trans R Soc Trop Med Hyg 98, 228-232.
- Mathis, A., Deplazes, P., 1995. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. J Clin Microbiol 33, 1145-1149.
- Mauricio, I.L., Gaunt, M.W., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2001. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. Parasitology 122, 393-403.
- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2004. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. Parasitology 128, 263-267.

- Mauricio, I.L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, F., Zemanova, E., Dedet, J.P., Lukes, J., Miles, M.A., 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol* 36, 757-769.
- Mauridou-Tsoha, E., 2001. Επίτομη γενική μικροβιολογία. Λύχνος, Αθήνα.
- Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L., 1995. MICROSAT, The Microsatellite Distance Program. Stanford Univ. Press, Stanford, CA.
- Molyneux, D.H., Killick-Kendrick, R., 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. Academic Press, London.
- Morales, M.A., Chicharro, C., Ares, M., Canavate, C., Barker, D.C., Alvar, J., 2001. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95, 104-107.
- Morales, M.A., Cruz, I., Rubio, J.M., Chicharro, C., Canavate, C., Laguna, F., Alvar, J., 2002. Relapses versus reinfections in patients coinfectd with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of infectious diseases* 185, 1533-1537.
- Motadezian, H., H. Noyes, Maingoon, a.R., 1996. *Leishmania* and *Sauroleishmania*: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrated and invertebrates. *Exp. Parasitol.* 83: 150-154.
- Murray, P.R., Traynor, P., Hopson, D., 1992. Critical assessment of blood culture techniques: analysis of recovery of obligate and facultative anaerobes, strict aerobic bacteria, and fungi in aerobic and anaerobic blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 30, 1462-1468.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 40, 1666-1669.

- Ochsenreither, S., Kuhls, K., Schaar, M., Presber, W., Schonian, G., 2006. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of clinical microbiology* 44, 495-503.
- Pandey, K., Yanagi, T., Pandey, B.D., Mallik, A.K., Sherchand, J.B., Kanbara, H., 2007. Characterization of *Leishmania* isolates from Nepalese patients with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 100, 1361-1369.
- Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C., Antoniadis, G., 2005. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect* 50, 53-60.
- Paulatou, M., 2004. Ανοσολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα.
- Pearson, R.D., Hargis, J.L., Roberts, D., Donowitz, G.R., 1983a. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J Immunol* 131, 1994-1999.
- Pearson, R.D., Wheeler, D.A., Harrison, L.H., Kay, H.D., 1983b. The immunology of Leishmaniasis. *Rev. Inf. Dis.* 5, 907-927
- Pratlong, F., Dedet, J.P., Marty, P., Portus, M., Deniau, M., Dereure, J., Abranches, P., Reynes, J., Martini, A., Lefebvre, M., et al., 1995. *Leishmania*-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J Infect Dis* 172, 323-326.
- Pratlong, F., Dereure, J., Bucheton, B., El-Saf, S., Dessein, A., Lanotte, G., Dedet, J.P., 2001. Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitology* 122, 599-605.
- Pratlong, F., Dereure, J., Deniau, M., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dedet, J.P., 2003. Enzymatic polymorphism during *Leishmania*/HIV co-infection: a study of 381 *Leishmania* strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. *Annals of tropical medicine and parasitology* 97 Suppl 1, 47-56.

- Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.P., 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol* 42, 4077-4082.
- Pispinis, I., 1997a. Εργαστηριακά μαθήματα παρασιτολογίας. Αθήνα.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Quispe Tintaya, K.W., Ying, X., Dedet, J.P., Rijal, S., De Bolle, X., Dujardin, J.C., 2004. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *The Journal of infectious diseases* 189, 1035-1043.
- Ravel, C., Wincker, P., Blaineau, C., Britto, C., Bastien, P., Pages, M., 1996. Medium-range restriction maps of five chromosomes of *Leishmania infantum* and localization of size-variable regions. *Genomics* 35, 509-516.
- Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J.P., Campino, L., 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol* 36, 1383-1388.
- Ravel, S., Cuny, G., Reynes, J., Veas, F., 1995. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop* 59, 187-196.
- Reithinger, R., Davies, C.R., 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg* 61, 530-541.
- Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C., Davies, C.R., 2000. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol* 38, 748-751.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., 1993. Contribution of cladistics to analysis of the *Leishmania* genus Ross, 1903 (Kinetoplastida-Trypanosomatidae). *Biosystema* 8, 79-90.

- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71, 267-275.
- Rossi, V., Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Bastien, P., 1994. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol Biochem Parasitol* 65, 271-282.
- Roura, X., Fondevila, D., Sanchez, A., Ferrer, L., 1999a. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 11, 385-387.
- Roura, X., Sanchez, A., Ferrer, L., 1999b. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec* 144, 262-264.
- Russell, R., Iribar, M.P., Lambson, B., Brewster, S., Blackwell, J.M., Dye, C., Ajioka, J.W., 1999. Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus Viannia. *Mol Biochem Parasitol* 103, 71-77.
- Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55, 453-483.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., Shlomai, J., 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc Biol Sci* 245, 121-126.
- Schonian, G.S., C.; Zlateva, K.; Oskam, L.; Kroon, N.; Gr?ser, Y. & Presber, W., 1996. Identification and determination of the relationship of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 19-29.
- Schulz, A., Mellenthin, K., Schonian, G., Fleischer, B., Drosten, C., 2003. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 41, 1529-1535.

- Schwenkenbecher, J.M., Frohlich, C., Gehre, F., Schnur, L.F., Schonian, G., 2004. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Infect Genet Evol* 4, 99-105.
- Sideris, V., Karagouni, E., Papadopoulou, G., Garifallou, A., Dotsika, E., 1996. Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. *Parasite* 3, 125-130.
- Simpson, L., 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual review of microbiology* 41, 363-382.
- Simpson, L., Shaw, J., 1989. RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell* 57, 355-366.
- Smyth, A.J., Ghosh, A., Hassan, M.Q., Basu, D., De Bruijn, M.H., Adhya, S., Mallik, K.K., Barker, D.C., 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology* 105 (Pt 2), 183-192.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 39, 560-563.
- Solbach, W., Laskay, T., 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Advances in immunology* 74, 275-317.
- Stoney-Archer, G.J., 1907. A case of kala-azar in Crete. *J.Roy.Army Med. Cps.* 9, 287-290.
- Sundar, S., 2001a. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6, 849-854.
- Sundar, S., Rai, M., 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 951-958.
- Thakur, C.P., Kanyok, T.P., Pandey, A.K., Sinha, G.P., Messick, C., Olliaro, P., 2000a. Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine). An open-label randomized phase-II clinical study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 432-433.

- Thakur, C.P., Kanyok, T.P., Pandey, A.K., Sinha, G.P., Zaniewski, A.E., Houlihan, H.H., Olliaro, P., 2000b. A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 429-431.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J., 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2414-2418.
- Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research* 10, 967-981.
- Tselentis, Y., Gikas, A., Chaniotis, B., 1994. Kala-azar in Athens basin. *Lancet* 343, 1635.
- Tzamouranis, N., Schnur, L.F., Garifallou, A., Pateraki, E., Serie, C., 1984. Leishmaniasis in Greece I. Isolation and identification of the parasite causing human and canine visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 78, 363-368.
- Vogiatzaki, H., 1999. Μελέτη της παθογόνου δράσης των αντιγόνων μεμβράνης του πρωτοζώου *L.donovani*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- WHO, 1993b. The Leishmaniasis Control of Tropical Diseases. In, World Health Organisation, Geneva.
- WHO, 1996. The leishmaniasis and *leishmania*/HIV co-infections. *Inf. Circ.-WHO Mediterr. Zoon. Control Cent.* 40:11-13.
- WHO, 2000. *Leishmania*/HIV co-infections in south-western Europe 1990-1998. Retrospective analysis of 965 cases. World Health Organization, WHO/LEISH/2000.42.
- WHO, 2002. The World Health Report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life.
- WHO, 2006a. Control of leishmaniasis. Geneva, World Health Organization, agenda item 5.1, document EB118/4.

WHO, 2006b. Control of Neglected Tropical Diseases. Geneva, World Health Organization, WHO/CDS/NTD/2006.2.

Zemanova, E., Jirku, M., Mauricio, I.L., Miles, M.A., Lukes, J., 2004. Genetic polymorphism within the *leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. Am J Trop Med Hyg 70, 613-617.

Zemanova, E., Jirku, M., Mauricio, I.L., Horak, A., Miles, M.A., Lukes, J., 2007. The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. Int J Parasitol 37, 149-160.

Web sites:

http://kpekastor.kas.sch.gr/ergastiriakos_odigos/microkosmos.htm/protozoa.htm

<http://www.bvt.fr/francais/speedleish.htm>

www.mh-hannover.de/3548.html

<http://www.who.int/ctd/html/leis.html>

<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>

http://www.eof.gr/E_S_2004/dra1150.htm

<http://www.kalonbio.co.uk/html/leishmania.html>

<http://www.kalonbio.co.uk/html/leishmania.html>

http://www.lonzabioscience.com/Lonza_CatNav.asp?oid=700&prodoid=Metaphor