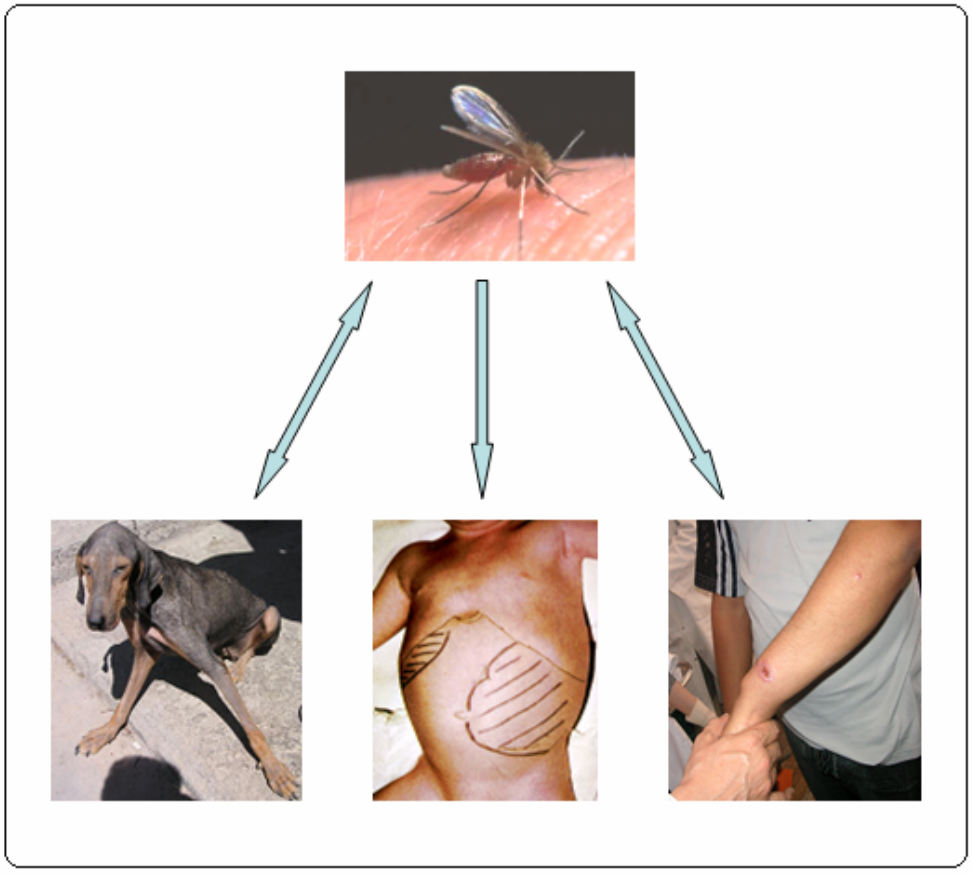
“ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ: ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ”

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ ΜΑΖΕΡΗ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΥ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΖΩΟΝΟΣΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 02/2010

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής (Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Παρασιτώσεων, Ζωονόσων, και Τροπικών Νόσων, WHO Collaborating Center for Research and Training in Mediterranean Zoonoses) με την οικονομική υποστήριξη του Ιδρύματος Προώθησης Έρευνας Κύπρου (ΙΠΕ) και των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών του Υπουργείου Γεωργίας Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος της Κύπρου.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επίκουρος Καθηγήτρια	Μαρία Αντωνίου	Επιβλέπουσα
Καθηγητής	Ιωάννης Τσελέντης	Μέλος 3μελούς
Αναπληρωτής Καθηγητής	Αχιλλέας Γκίκας	Μέλος 3μελούς
Καθηγητής	Ιωσήφ Παπαματθαιάκης	Μέλος 7μελούς
Καθηγητής	Γεώργιος Σαμώνης	Μέλος 7μελούς
Αναπληρωτής Καθηγητής	Εμμανουήλ Γαλανάκης	Μέλος 7μελούς
Επίκουρος Καθηγήτρια	Μοσχανδρέα Ιωάννα	Μέλος 7μελούς

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της λεϊσμανίασης στην Κύπρο, στο σκύλο και στον άνθρωπο, για την ανάπτυξη ενός ικανού συστήματος ενεργού επιτήρησης της ασθένειας με σκοπό το φραγμό μετάδοσης της στον άνθρωπο και την παρεμπόδιση της εξάπλωσης της στο σκύλο.

Στην σύζυγό μου Μόνικα

Στα παιδιά μου Γιώργο, Θωμαΐδα και Κυριάκο

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ..... - 7 -
ΠΡΟΛΟΓΟΣ ..... - 16 -
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ ..... - 20 -
1. ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ *LEISHMANIA* ..... - 20 -
1-1. Εισαγωγή ..... - 20 -
1-2. Βιολογικός κύκλος της Λεϊσμάνια ..... - 23 -
1-3. Ο φορέας του παράσιτου ..... - 26 -
1-4. Αποθήκη του παράσιτου και τρόποι μετάδοσης ..... - 27 -
2. ΟΙ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΕΙΣ ..... - 28 -
2-1. Ορισμός- Ανασκόπηση ..... - 28 -
2-2. Λεϊσμανίαση στον άνθρωπο ..... - 33 -
2-2-1. Επιδημιολογικά στοιχεία ..... - 33 -
2-2-2. Παθογένεια της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο ..... - 33 -
2-2-3. Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (ΣΛ) ..... - 34 -
2-2-4. Δερματική Λεϊσμανίαση (ΔΛ) ..... - 36 -
2-2-5. Άλλες μορφές λεϊσμανίασης ..... - 38 -
2-3. Λεϊσμανίαση στο σκύλο ..... - 39 -
2-3-1. Επιδημιολογικά στοιχεία ..... - 39 -
2-3-2. Παθογένεια της λεϊσμανίασης στο σκύλο ..... - 40 -
2-3-3. Κλινική εικόνα της λεϊσμανίασης στο σκύλο ..... - 42 -
2-3-4. Αιματολογικές και βιοχημικές διαταραχές της λεϊσμανίασης στο σκύλο ..... - 44 -
2-4. Η λεϊσμανίαση στη Μεσόγειο και στην Ευρώπη ..... - 47 -
2-5. Η λεϊσμανίαση στην Κύπρο ..... - 49 -
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ ..... - 50 -
1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ..... - 50 -
1-1. Περιοχή μελέτης ..... - 50 -
1-2. Ενημέρωση για τους στόχους της μελέτης ..... - 51 -
1-3. Δείγματα από σκυλιά ..... - 51 -
1-4. Δείγματα από ανθρώπους ..... - 52 -

1-5. Φλεβοτόμοι- σκνίπες, διαβιβαστές της νόσου ..... - 53 -
1-6. Ορολογικές εξετάσεις ..... - 54 -
1-7. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης ..... - 56 -
1-8. Απομόνωση του παράσιτου και ταυτοποίηση ..... - 56 -
1-9. Δημιουργία τράπεζας στελεχών. ..... - 57 -
1-10. Στατιστική ανάλυση και χαρτογράφηση των αποτελεσμάτων ..... - 57 -
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ..... - 59 -
2-1. Δείγματα από σκυλιά ..... - 59 -
2-2. Δείγματα από ανθρώπους ..... - 65 -
2-3. Φλεβοτόμοι ..... - 66 -
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ..... - 69 -
4. ΟΦΕΛΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ..... - 79 -
5. ΤΟΜΕΙΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ..... - 82 -
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... - 83 -
SUMMARY ..... - 93 -
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ ..... - 102 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ ..... - 102 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Ερωτηματολόγιο για τη μελέτη της λεϊσμανίασης στα σκυλιά ..... - 103 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Έντυπο ενημέρωσης των κτηνιάτρων για λήψη και αποστολή δειγμάτων στο Εργαστήριο: ..... - 105 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: Ερωτηματολόγιο για τη μελέτη της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο ..... - 106 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Έντυπο ενημέρωσης των ιατρών για λήψη και αποστολή δειγμάτων στο Εργαστήριο: ..... - 108 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5: Τεχνική ELISA ..... - 110 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6: Τεχνική Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (IFAT) ..... - 112 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7: Ηλεκτροσυναίρεση (ES) ..... - 113 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8: Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) ..... - 114 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: Απομόνωση και καλλιέργεια *Leishmania spp* ..... - 117 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10: Παραγωγή διαγνωστικών κιτς ..... - 119 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11: Περιοχές δειγματοληψιών. ..... - 122 -

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12: Ποσοστό οροθετικότητας, έναντι της Λεϊσμάνια στα σκυλιά, ανά τετράγωνο. ..... - 125 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13: Σχέση μεταξύ οροθετικότητας και 10 παραγόντων κινδύνου ..... - 126 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 14: Άρθρα που δημοσιεύτηκαν στον ημερήσιο τύπο και σε περιοδικά της Κύπρου. ..... - 129 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 15: Επιστημονικές ημερίδες. ..... - 141 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 16: Δημοσιότητα ..... - 147 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 17: Ενημερωτικό υλικό. ..... - 151 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 18: Νομοθεσία. ..... - 152 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 19: Πόστερς σε επιστημονικά συνέδρια. ..... - 154 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 20: Ευαισθητοποίηση ιατρών. ..... - 158 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 21: Πρόταση εγκατάστασης ενεργής επιδημιολογικής επιτήρησης. ..... - 160 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... - 163 -

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο:	Μαζέρης
Όνομα:	Απόστολος
Διεύθυνση επικοινωνίας:	Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος Κτηνιατρικές Υπηρεσίες 1417 Λευκωσία, Κύπρος
Υπηκοότητα:	Κυπριακή
Ημερομηνία γέννησης:	02/10/1966
Τηλ.:	+357 22 805200
E-mail:	amazeris@vs.moa.gov.cy

ΣΠΟΥΔΕΣ

2005 - 2009: Υποψήφιος διδάκτορας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

1987 - 1993: Πτυχίο Κτηνιατρικής
Κτηνιατρική Σχολή,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ)

ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ (ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ)

2007 - 2010: Κτηνιατρικός Λειτουργός Α΄
Εργαστήριο Ιολογίας, Κτηνιατρικές Υπηρεσίες

2006 - 2010: Υπεύθυνος Ποιότητας Εργαστηρίου Υγείας των Ζώων
Κτηνιατρικά Εργαστήρια, Κτηνιατρικές Υπηρεσίες

2002 - 2007: Κτηνιατρικός Λειτουργός
Εργαστήριο Ιολογίας, Κτηνιατρικές Υπηρεσίες

2001 - 2002: Έκτακτος Κτηνιατρικός Λειτουργός
Εργαστήριο Ιολογίας, Κτηνιατρικές Υπηρεσίες

2000 - 2001: Φάρμα Ρένος Χατζηωάννου (όρνιθες αναπαραγωγής)

1994 - 2000: Εταιρεία Σπύρος Σταυρινίδης Κέμικαλς (κτηνιατρικά φάρμακα)

1993 - 1994: Άσκηση Κτηνιατρικής, Κτηνιατρικές Υπηρεσίες

ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ (ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΙΣ- ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ- ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΜΠΕΙΡΙΑ)

Εκπαιδεύσεις

Φεβρουάριος 2008: Real Time PCR Workshop on “Molecular Diagnosis of Avian Influenza”.
E.U. Community Reference Laboratory, Surrey, England.
Διάρκεια: 5 ημέρες

Μάρτιος 2007: Training Workshop on Foot- and- Mouth Disease outbreak investigation.
FAO, Ankara, Turkey.
Διάρκεια: 4 ημέρες

Δεκέμβριος 2006: Διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση του ιού της λύσσας.
Εργαστήριο Ιολογίας, Κύπρος (TAIEX mission).
Διάρκεια: 2 ημέρες

Νοέμβριος 2006: Διεξαγωγή Εσωτερικών Επιθεωρήσεων Ποιότητας.
MKR ManSystems ltd, Λευκωσία, Κύπρος.
Διάρκεια: 8 ώρες

Νοέμβριος 2006: Εκπαίδευση στη μοριακή ανίχνευση του παράσιτου Λεϊσμάνια σε βιολογικά δείγματα και στην *in vitro* μελέτη της μολυσματικότητας και αντοχής του παράσιτου στα φάρμακα.
Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.
Διάρκεια: 5 ημέρες

Σεπτέμβριος 2006: Εκπαίδευση Υπεύθυνων Ποιότητας και Εσωτερικών Επιθεωρητών Εργαστηρίων Δοκιμών.
QUINTESSENCE ENTERPRISES LTD, Λευκωσία, Κύπρος.

Διάρκεια: 16 ώρες

Σεπτέμβριος 2005: Εκπαίδευση σε θέματα Μοριακής Επιδημιολογίας της λεϊσμανίασης.
Πανεπιστήμιο Επιστήμης και Τεχνολογίας της Ιορδανίας.
Διάρκεια: 10 ημέρες

Σεπτέμβριος 2005: Εκπαίδευση στη διάγνωση των Μεταδοτικών Σπογγιόμορφων Εγκεφαλοπαθειών.
BIO-RAD Laboratories S.r., Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, Κύπρος.
Διάρκεια: 5 ημέρες

Ιούνιος 2005: Εκπαίδευση στη χρήση της τεχνικής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης για τη διάγνωση της λεϊσμανίασης.
Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.
Διάρκεια: 6 ημέρες

Νοέμβριος 2004: Microsoft Access.
MMC/EDITC, Λευκωσία, Κύπρος.
Διάρκεια: 29 ώρες

Μάρτιος 2004: Εκπαίδευση στη χρήση της τεχνικής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης για τη διάγνωση της Κλασσικής Πανώλης των Χοίρων.
EU Reference Laboratory for Classical Swine Fever (Institute of Virology, School of Veterinary Medicine), Hannover, Germany.
Διάρκεια: 3 ημέρες

Οκτώβριος 2003: Εκπαίδευση στις Εργαστηριακές Τεχνικές για τη διάγνωση της Γρίπης των Ιπποειδών και την επιτήρηση της νόσου.
International Reference Centre for Equine Influenza (Animal Health Trust), Newmarket, England.
Διάρκεια: 5 ημέρες

Μάιος 2003: Εκπαίδευση στη χρήση μοριακών τεχνικών και κυτταροκαλλιεργειών για την απομόνωση, ανίχνευση και

τυποποίηση του Τοξοπλάσματος, της Λεϊσμάνιας, των Ρικετσιών και των Μπαρτονελλών.
Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.
Διάρκεια: 8 ημέρες

Νοέμβριος 2002: Εκπαίδευση στις Εργαστηριακές Τεχνικές για τη διάγνωση της Κλασσικής Πανώλης των Χοίρων.
MAMMALIAN DIAGNOSTIC UNIT, Veterinary Laboratories Agency, Surrey, England.
Διάρκεια: 10 ημέρες

Σεμινάρια

Οκτώβριος 2008: Συμμετοχή στην Επιμορφωτική Κτηνιατρική Ημερίδα με θέματα: α) Σωστή Χρήση Κτηνιατρικών Φαρμακευτικών Προϊόντων, β) Λεϊσμανίαση στην Κύπρο.
Κτηνιατρικές Υπηρεσίες- Παγκύπριος Κτηνιατρικός Σύλλογος.

Ιούνιος 2008: Προστασία από Χημικούς και Βιολογικούς Παράγοντες στην Εργασία.
Υπουργείο Εργασίας και Κοινωνικών Ασφαλίσεων, Κύπρος.

Φεβρουάριος 2008: Κοινή Αγροτική Πολιτική: Κτηνιατρικά Θέματα.
Κυπριακή Ακαδημία Δημόσιας Διοίκησης, Κύπρος.

Φεβρουάριος 2008: Επιστημονική Διημερίδα του Παγκύπριου Κτηνιατρικού Συλλόγου με θέματα Υγείας των Ζώων και Δημόσιας Υγείας.
Παγκύπριος Κτηνιατρικός Σύλλογος, Κύπρος.

Φεβρουάριος 2008: Επικύρωση/Επαλήθευση Αναλυτικών Μεθόδων και Υπολογισμός Αβεβαιότητας Μετρήσεων.
QUINTESSENCE ENTERPRISES LTD, Λευκωσία, Κύπρος.

Ιούλιος 2007: Συμμετοχή στο σεμινάριο «Η παραφυματίωση στα βοοειδή και αιγοπρόβατα, κατάσταση στην Κύπρο και σχέση με την Δημόσια Υγεία».
Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, Κύπρος.

Οκτώβριος 2006:	European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (EUFMD). FAO, Πάφος, Κύπρος.
Οκτώβριος 2006:	Εκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα «Ρικέτσιες- Παράσιτα». Μικροβιολογικό Εργαστήριο Γενικού Νοσοκομείου Λεμεσού. Λεμεσός, Κύπρος.
Σεπτέμβριος 2006:	Υλοποίηση συστήματος διαχείρισης της ποιότητας. MKR Mansystems ltd, Λευκωσία, Κύπρος.
Μάιος 2006:	Εισαγωγικό σεμινάριο στο ISO/IEC 17025:2005. MKR Mansystems ltd, Λευκωσία, Κύπρος.
Μάιος 2006:	Επιστημονική Εκδήλωση "ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ" με θέματα: α) Η Λεϊσμανίαση ή «Κάλα-Αζάρ» β) Τοξοπλάσμωση και εγκυμοσύνη. Ιατρικός Σύλλογος Λευκωσίας – Κερύνειας, Λευκωσία, Κύπρος.
Ιούνιος 2004:	Εκπαιδευτικό/επιμορφωτικό σεμινάριο με θέμα «Ενδοκοινοτικό Εμπόριο-Κανονισμοί Υγιεινής 1,2,3,4. Υποχρεώσεις Κτηνιατρικών Εργαστηρίων».
Δεκέμβριος 2004:	Συμμετοχή στο πρόγραμμα «ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ», τρίτη ενότητα (πακέτο επικύρωση μεθόδου, αβεβαιότητα μετρήσεων, διεργαστηριακοί έλεγχοι, εσωτερικός έλεγχος, επικύρωση τεχνικής, προληπτικές/ διορθωτικές ενέργειες). Γενικό Χημείο του Κράτους, Λευκωσία, Κύπρος.
Μάιος 2004:	Εκπαιδευτικό/επιμορφωτικό σεμινάριο με θέμα «Έκτακτα Σχέδια Καταπολέμησης του Καταρροϊκού Πυρετού». Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, Λευκωσία, Κύπρος.
Μάιος 2004:	Συμμετοχή στο πρόγραμμα «ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ», πρώτη ενότητα (γενική ανάλυση των προνοιών του EN ISO/IEC 17025, διαδικασία διαπίστευσης, σημασία συναίνεσης προσωπικού, ρόλος ομάδας διαπίστευσης, εγχειρίδιο ποιότητας, ΤΔΛ, έντυπα, διαχείριση εγγράφων, εσωτερικές- εξωτερικές επιθεωρήσεις). Γενικό Χημείο του Κράτους, Λευκωσία, Κύπρος.

Ιανουάριος 2004: Εκπαιδευτικό/Επιμορφωτικό σεμινάριο με θέμα «Νομοθεσία που διέπει την διακίνηση ζώων και ζωικών προϊόντων- Κτηνιατρικοί έλεγχοι στα συνοριακά κέντρα ελέγχου».
Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, Λευκωσία, Κύπρος.

Απρίλιος 2003: Εκπαιδευτικό/Επιμορφωτικό σεμινάριο με θέμα «Επικίνδυνες Ζωικές Ασθένειες- Παρούσα κατάσταση στην Κύπρο και μέτρα αντιμετώπισης».
Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, Λευκωσία, Κύπρος.

Συμμετοχή σε επιστημονικά συνέδρια

Μάιος 2009: 35° Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο.
Ελληνική Ιατρική Εταιρεία, Αθήνα, Ελλάδα.
Διάρκεια: 4 ημέρες

Μάρτιος 2009: 11° Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο.
Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία, Αθήνα, Ελλάδα.
Διάρκεια: 4 ημέρες

Φεβρουάριος 2009: 4th World Congress on Leishmaniasis.
Central Drug Research Institute, Lucknow, India.
Διάρκεια: 5 ημέρες

Απρίλιος 2005: 3rd World Congress on Leishmaniasis.
Palermo- Terrasini, Sicily, Italy.
Διάρκεια: 6 ημέρες

Ερευνητική δραστηριότητα/εμπειρία

2007 - 2010 Συμμετοχή στο Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα FLU-LAB-NET (enhancement and reinforcement of the CRL and NRL networks within the EU, improvements and harmonization of laboratory and diagnostic methods, coordination of research efforts, data exchange, development and sharing of expertise).

2004 - 2007: Συντονιστής Ερευνητικού Έργου ΙΠΕ, ΥΓΕΙΑ/0104/09 «Έλεγχος και Επιτήρηση της λεϊσμανίασης στην Κύπρο».

Κτηνιατρικές Υπηρεσίες-Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής (ΕΚΒΠΖΓΙ) του Πανεπιστημίου Κρήτης- Υπουργείο Υγείας-Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας.
Διάρκεια: 3 χρόνια

2004 - 2007: Συμμετοχή στο Ευρωπαϊκό πρόγραμμα LEISH-MED "Monitoring risk factors of spreading of Leishmaniasis around the Mediterranean Basin".
LEISH-MED Coordination Action.
Διάρκεια: 3 χρόνια

2002 – 2003: Μέλος της ερευνητικής ομάδας στο Ερευνητικό Έργο «Ο ρόλος της Ποντίκας στη Μετάδοση Ασθενειών». Κτηνιατρικές Υπηρεσίες-Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης-Υπουργείο Γεωργίας-Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας.
Διάρκεια: 2 χρόνια

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: GCE O' Level

ΓΝΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

Πολύ καλή γνώση όλων των εφαρμογών του Microsoft Office.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

1. Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, Tsatsaris A, Moschandreas J, Messaritakis I, Christodoulou V, Papadopoulos B, Ivović V, Pratlong F, Loucaides F and Antoniou M, in press. Leishmaniases and the Cyprus paradox. *Am J Trop Med Hyg*.
2. Antoniou M, Psaroulaki A, Toumazos P, Mazeris A, Ioannou I, Papaprodromou M, Georgiou K, Hristofi N, Patsias A, Loucaides F, Moschandreas J, Tsatsaris A and Tselentis Y, in press. Rats as indicators of the presence and dispersal of pathogens involved in zoonoses in Cyprus: Ectoparasites, Parasitic helminths, enteric bacteria and Encephalomyocarditis virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis*.
3. Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K, 2009. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis 9(2):* 76--7.
4. Koliou MG, Soteriades ES, Ephros M, Mazeris A, Antoniou M, Elia A, Novelli V, 2008. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with Epstein Barr virus and Leishmania donovani coinfection in a child from Cyprus. *J Pediatr Hematol Oncol. 30(9):* 704--7.
5. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbel Y, Boelaert M, 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis. 14(7):* 1013--8. Review.
6. Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K, 2008. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis. 8(1):* 6--7.

Περιλήψεις και παρουσιάσεις σε συνέδρια

1. Μαζέρης Α, Σωτηριάδου Κ, Dedet JP, Χαραλάμπους Χ, Τσάτσαρης Α, Μοσχανδρέα Ι, Μεσσαριτάκης Ι, Χριστοδούλου Β, Παπαδόπουλος Β, Ivovic V, Pratlong F, Λουκαΐδης Φ, Αντωνίου Μ. Λεϊσμανίαση του Σκύλου: Ένα επαναδυόμενο πρόβλημα στην Κύπρο. 11° Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2009.

2. Χριστοδούλου Β, Μαζέρης Α, Κουταλά Ε, Παπαδογιωργάκη Σ, Σβυρινάκη Ε, Αντωνίου Μ. Η μελέτη του φαινομένου της πολλαπλής αντοχής στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα του παράσιτου *Leishmania,* 11ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2009.

3. Μαζέρης Α, Σωτηριάδου Κ, Τσάτσαρης Α, Dedet JP, Μεσσαριτάκης Ι, Χριστοδούλου Β, Λουκαΐδης Φ, Αντωνίου Μ. *Leishmania donovani* MON-37: Ένα αναδυόμενο πρόβλημα στην Κύπρο και στην Ευρώπη. 35° Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2009.

4. Χριστοδούλου Β, Μαζέρης Α, Κουταλά Ε, Σβυρινάκη Ε, Αντωνίου Μ. Συγκριτική μελέτη δέκα στελεχών *Leishmania* ως προς την αντοχή τους στα φάρμακα: Εντοπισμός της P-γλυκοπρωτεΐνης 170 KDa. 35° Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2009.

5. Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, Tsatsaris A, Moschandrea J, Messaritakis I, Christodoulou V, Papadopoulos B, Ivovic V, Pratlong F, Loucaides P, Antoniou M. The emerging and re-emerging of leishmaniases in Cyprus. 4th Worldleish Congress on Leishmaniasis, Lucknow, India, 2009.

6. Antoniou M, Mazeris A, Christodoulou V, Messaritakis I, Tsatsaris A, Koutala E, Svirinaki E, Moschandreas J, Chrysoula A, Tselentis Y. Evaluation of drug resistance of *Leishmania infantum* isolates from Cyprus. 3rd COST B22 Annual Congress on “Drug Discovery and Development for Parasitic Diseases”, Αθήνα, 2006.

7. Αντωνίου Μ, Χριστοδούλου Β, Μεσσαριτάκης Ι, Μαζέρης Α, Τσάτσαρης Α, Ηλιοπούλου Π, Κουταλά Ε, Σβυρινάκη Ε, Τσελέντης Ι. Η γεωγραφική διασπορά της *L. infantum* στην Κύπρο και η αντοχή της στα φάρμακα. 32° Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2006.

8. Antoniou M, Mazeris A, Christodoulou V, Messaritakis I, Tsatsaris A, Koutala E, Svirinaki E, Moschandreas J, Chrysoula A, Dedet JP, Tselentis Y. *Leishmania infantum* in Cyprus. Geographical distribution of the disease and drug resistance in dogs and humans. 6th Workshop (“Control of Leishmaniasis with Drugs”) of the LEISH-MED Coordination Action, Larnaka, 2006.

9. Μαζέρης Α. Leishmaniasis in Cyprus, 2005. WORLDLEISH 3 – Third World Congress on Leishmaniosis, Palermo, Sicily.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι λεϊσμανιάσεις είναι μολυσματικές ασθένειες που μεταδίδονται μέσω αιματοφάγου διαβιβαστή ξενιστή, τη σκνίπα και είναι ανθρωπονόσοι ή ζωονόσοι. Παρόλο που αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για τη Δημόσια Υγεία σε 88 χώρες του κόσμου (συμπεριλαμβανομένων και όλων των χωρών της Μεσογείου, Ευρωπαϊκές και μη), οι λεϊσμανιάσεις μέχρι πρότινος κατατάσσονταν στις πλέον «παραμελημένες» νόσους και δεν θεωρούνταν απειλή για το Δυτικό Κόσμο.

Η Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (ΣΛ) του ανθρώπου στην Ευρώπη, η οποία είναι θανατηφόρος χωρίς φαρμακευτική αγωγή στο 95% των περιπτώσεων, προκαλείται από το είδος του παράσιτου *Leishmania infantum.* Οι ραγδαίες μεταβολές των περιβαλλοντολογικών και κλιματολογικών συνθηκών, τόσο σε παγκόσμιο όσο και σε περιφερειακό επίπεδο, επηρεάζουν τους ενδογενείς παράγοντες της νόσου (αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή-παράσιτου και εντόμου διαβιβαστή) με επιπτώσεις στην επιδημιολογία της. Τα κρούσματα τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί ραγδαία και η νόσος εξαπλώθηκε προς Βορρά σε νέες περιοχές ενδημικών χωρών, όπως η Ιταλία, και εισήχθη σε νέες χώρες, όπως η Ουγγαρία και η Γερμανία. Έτσι σήμερα, η εξάπλωση της ΣΛ αποτελεί απειλή για τη Δημόσια Υγεία και στο Δυτικό Κόσμο.

Αυτή τη στιγμή, η λεϊσμανίαση στο σκύλο από *L. infantum* είναι ίσως το συχνότερο λοιμώδες νόσημα στην Κύπρο και στις άλλες παραμεσόγειες χώρες της Ευρώπης και την Πορτογαλία. Ο σκύλος νοσεί από το παράσιτο και αποτελεί την κύρια αποθήκη/δεξαμενή του είδους αυτού, του μόνου σπλαχνοτροπικού είδους που ενδημεί στην Ευρώπη.

Στην Κύπρο, ένα νησί στο όριο της Ευρώπης με την Ασία και την Αφρική, η ΣΛ θεωρείτο μέχρι πρότινος ασθένεια των σκυλιών, καθώς δεν υπήρχε επίσημη αναφορά ανθρώπινων περιστατικών μέχρι και το 2005. Το γεγονός αυτό πιθανά να οφείλεται στη μη καταγραφή των περιστατικών, παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια η νόσος είναι υποχρεωτικής δήλωσης.

Σκοπός αυτής της διατριβής είναι η μελέτη της λεϊσμανίασης στην Κύπρο, που γίνεται για πρώτη φορά, με στόχο την επιτήρησή της. Πραγματοποιήθηκε με: α) την οροεπιδημιολογική μελέτη στα σκυλιά, με την εξέταση 900 ορών από 30 αντιπροσωπευτικές περιοχές της ελεύθερης Κύπρου και την χαρτογράφηση των αποτελεσμάτων με το σύστημα GIS, β) την οροεπιδημιολογική μελέτη στον

ανθρώπινο πληθυσμό με την εξέταση 600 ορών κατοίκων από δυο περιοχές με υψηλό ποσοστό κρουσμάτων στα σκυλιά (περιοχές υψηλού κινδύνου για τον άνθρωπο) και από μία περιοχή με μηδενικό ποσοστό (περιοχή μάρτυρας, περιοχή χαμηλού κινδύνου για τον άνθρωπο), γ) τη συλλογή, την ταυτοποίηση και σύγκριση των ειδών των Φλεβοτόμων-διαβιβαστών ξενιστών που απαντώνται στις ανωτέρω τρεις περιοχές δ) την απομόνωση, καλλιέργεια και τυποποίηση του πρωτόζωου παράσιτου *Leishmania* από σκυλιά, ανθρώπους και Φλεβοτόμους, ε) τη σύγκριση των ειδών/στελεχών του παράσιτου που απαντώνται σε σκυλιά και ανθρώπους και τη σύγκρισή τους με άλλα στελέχη που απαντώνται στη Μεσόγειο, ζ) τη δημιουργία τράπεζας στελεχών του παράσιτου και η) την κατάθεση προτάσεων για την οργάνωση Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Λεϊσμανίασης και για την επιτήρηση και τον έλεγχο της νόσου στην Κύπρο.

Στην μελέτη αυτή, που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής (Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Παρασιτώσεων, Ζωονόσων, και Τροπικών Νόσων, WHO Collaborating Center for Research and Training in Mediterranean Zoonoses) ανεκτίμητη υπήρξε η συμπαράσταση και καθοδήγηση που μου προσέφερε η Επίκουρος Καθηγήτρια κ. Μαρία Αντωνίου, στην οποία θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες.

Ευχαριστώ το Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής για τη συνεργασία και τη φιλοξενία που μου προσέφερε, ιδιαίτερα τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Καθηγητή κ. Ιωάννη Τσελέντη. Ευχαριστώ τους συνεργάτες του Εργαστηρίου κα Βασιλική Χριστοδούλου, κ. Ιπποκράτη Μεσσαριτάκη, Δρ Βύρωνα Παπαδόπουλο και Dr Vladimir Ivovic για την βοήθεια και τη συμπαράσταση τους, την κα Ελένη Σβηρινάκη και την κα Ελένη Κουταλά για την τεχνική υποστήριξη. Εκφράζω επίσης τις θερμές μου ευχαριστίες στον Δρ Αντρέα Τσάτσαρη για τη βοήθεια του στη χαρτογράφηση των αποτελεσμάτων του έργου και τον Διευθυντή του Τμήματος Κτηματολογίου και Χωρομετρίας για την παραχώρηση των ψηφιακών χαρτογραφικών δεδομένων της Κύπρου. Ευχαριστώ τη Δρ Ιωάννα Μοσχανδρέα, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοστατιστικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τη βοήθειά της στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ για τη συμπαράσταση και στήριξη τους Διευθυντές των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών Δρ Φειδία Λουκαΐδη, Δρ Γεώργιο Νεοφύτου και Δρ Χαράλαμπο Κακογιάννη. Τους Διευθυντές των Επαρχιακών Κτηνιατρικών Γραφείων Πάφου, Λεμεσού και Πόλεως Χρυσοχούς κ.κ. Ανδρέα Κυρατζή, Άθω Σαββίδη και Στέλιο Στυλιανού για την βοήθεια και τη συμπαράστασή τους. Τον προϊστάμενο του Κλάδου Κτηνιατρικών Εργαστηρίων Δρ Κυριάκο Γεωργίου για την στήριξή του, τη βοήθεια στις δειγματοληψίες και τις πάντοτε πολύ χρήσιμες παρατηρήσεις του. Τους τεχνικούς του Εργαστηρίου Ιολογίας και ιδιαίτερα την κα Μαρία Νικολάου για την τεχνική βοήθεια. Τους συναδέλφους κ.κ. Ιωάννη Ιωάννου και Νίκο Χριστοφή για τη βοήθειά τους στις δειγματοληψίες και την συμπαράσταση τους. Την Λογιστικό Λειτουργό των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών κα Ανδρούλλα Γεωργίου για την διαχείριση της χρηματοδότησης του Ιδρύματος Προώθησης Έρευνας (ΙΠΕ). Την Υπεύθυνη του Τμήματος Αγορών και Προμηθειών των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, κα Μαρία Λούη για τη βοήθειά της στους διαγωνισμούς για την προμήθεια αντιδραστηρίων και εξοπλισμού για την ομαλή εξέλιξη του έργου. Τις εταιρείες Medisell, Biotronics και Scientronics και ιδιαίτερα τους κ.κ. Άγγελο Σαρπέτσα και Μιχάλη Μαλακτό για το ψηλό επίπεδο των υπηρεσιών τους, την άμεση ανταπόκριση τους και την βοήθειά τους σε τεχνικά θέματα.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους κτηνίατρους (κρατικούς και ιδιώτες) για τη συνεργασία τους και την παροχή δειγμάτων από σκυλιά. Ιδιαίτερα νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ιδιώτες συναδέλφους κ.κ. Αντωνίου Γιαννάκη, Κωνσταντίνου Κωνσταντίνο, Σταυρούλα Νικολάου και τον επιθεωρητή των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών κ. Νίκο Μαυρονικόλα, οι οποίοι με προθυμία, εις βάρος της ιδιωτικής τους ζωής και εργασίας, προσέφεραν αφιλοκερδώς ουσιαστική βοήθεια, τόσο στις δειγματοληψίες όσο και στην ενημέρωση των πολιτών και έκαναν την συνεργασία μας μια ευχάριστη και παραγωγική εμπειρία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους ιδιοκτήτες των σκυλιών για την υπομονή που επέδειξαν κατά τις δειγματοληψίες, το ενδιαφέρον τους και την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην μελέτη.

Ευχαριστώ την Διευθύντρια Ιατρικών Υπηρεσιών και Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας του Υπουργείου Υγείας της Κύπρου Δρ Ανδρούλλα Αγρότου και τις Ανώτερες Ιατρικές Λειτουργούς Δρ Χρυστάλλα Χατζηαναστασίου και Δρ Όλγα Καλακούτα για τη βοήθειά τους. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την παιδίατρο- λοιμοξιολόγο στο Νοσοκομείο

Παίδων «Αρχιεπίσκοπος Μακάριος ΙΙΙ» Δρ Μαρία Κολιού για την βοήθεια και τη συμπαράστασή της και τους Γιατρούς Δρ Παναγιώτη Παπακυριακού και Δρ Αμαλία Βουνού για τη συνεργασία και το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που επέδειξαν. Επίσης ευχαριστώ θερμά το ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό του Νέου Γενικού Νοσοκομείου Λεμεσού, του Νοσοκομείου Αμμοχώστου και του Νοσοκομείου Πόλεως Χρυσοχούς που πραγματοποίησαν τις δειγματοληψίες στους ανθρώπους.

Ευχαριστώ ολόψυχα το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας και τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες του Υπουργείου Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος της Κύπρου που χρηματοδότησαν τη μελέτη.

Ευχαριστώ ολόψυχα όλους τους επιστήμονες από τις 22 χώρες που συμμετείχαν στο Ευρωπαϊκό πρόγραμμα «LEISHMED» (INCO- CT 2004-509086) για την εξαιρετική συνεργασία μας και ιδιαίτερα τον Dr Jean Claude Dujardin, τον Dr Bob Killick- Kendrick, την Dr Gabriele Schoenian, τον Dr Petr Volf, την Δρ Καίτη Σωτηριάδου, την Dr Carmen Canavate, τον Dr Luigi Gradoni και την Dr Lenea Campino, για τη συμπαράσταση και βοήθειά τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την απεριόριστη υπομονή που έδειξε και την ψυχολογική στήριξη που μου παρείχε στην προσπάθεια μου να ολοκληρώσω την παρούσα μελέτη.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

1. ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ *LEISHMANIA*

1-1. Εισαγωγή

Οι Λεϊσμάνιες ανήκουν στα πρωτόζωα: Φύλο Sarcomastigophora, Σειρά kinetoplastida και Οικογένεια Trypanosomatidae (Lainson και Shaw, 1987, Kassai *και συν.,* 1998). Βρίσκονται στην ίδια κατάταξη με τα παράσιτα του γένους Trypanosoma. Οι Λεϊσμάνιες είναι μονοκύτταροι επιμήκεις ή σφαιρικοί οργανισμοί που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός μαστίγιου (ενδο- ή εξωκυτταρικού) και ενός κινητοπλάστη που είναι ένα μιτοχόνδριο πλούσιο σε DNA (Lainson και Shaw, 1987, Molyneux και killick-Kendrick, 1987, Ferrer, 1992, Slappendel και Ferrer, 1998). Χαρακτηρίζονται από ασεξουαλικό και πάντα παρασιτικό πολλαπλασιασμό που πραγματοποιείται μεταξύ δύο ξενιστών, ενός σπονδυλωτού ξενιστή (άνθρωπος, σκυλιά, τρωκτικά, κ.α.) και ενός εντόμου-διαβιβαστή (σκνίπα) (Εικ. 2).

Από το 1903, που δόθηκε στο παράσιτο η ονομασία *Leishmania* από τον Ross, η κατάταξη και η ονοματολογία των ειδών και υποειδών παρέμεινε αντικείμενο για το οποίο υπάρχουν διϊστάμενες απόψεις. Την δεκαετία του 1980 έγιναν αξιοσημείωτες προσπάθειες με σκοπό η ταξινόμηση να βασιστεί σε επιστημονικά κριτήρια. Η τυποποίηση με Πολυεστιακή Ισοενζυμική Ηλεκτροφόρηση (MLEE, Rioux *και συν.,* 1990) εφαρμόστηκε για πάνω από 25 χρόνια σε αρκετές χιλιάδες στελέχη του παράσιτου και ακόμα αντιπροσωπεύει την χρυσή τεχνική (gold standard technique) για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση της Λεϊσμάνιας. Τα στελέχη Λεϊσμάνιας χαρακτηρίζονται σύμφωνα με το ενζυμικό τους προφίλ και κατατάσσονται σε ομοιογενείς μονάδες, τα ζυμοδέματα. Η φυλογενετική κατάταξη των σύμπλοκων ζυμοδεμάτων αποκαλύπτει στενή σχέση μεταξύ διαφορετικών “Leishmania taxa”. Μία απλοποιημένη κατάταξη των Λεϊσμανιών με βάση το ενζυμικό τους προφίλ φαίνεται στον πίνακα 1 (Rioux *και συν.,* 1990).

Τα τελευταία χρόνια, λόγω των περιορισμών στην εφαρμογή της Πολυεστιακής Ισοενζυμικής Ηλεκτροφόρησης (MLEE, Rioux *και συν.,* 1990) η οποία είναι

χρονοβόρα, ακριβή και στερείται διακριτικής ικανότητας συγκρινόμενη με τις μοριακές τεχνικές που δίνουν συμπληρωματικά στοιχεία γενετικού τύπου (Lukes *και συν.,* 2007), προωθήθηκαν σαν εναλλακτικές τεχνικές για σκοπούς κατάταξης οι τεχνικές της ανάλυσης των πολυμορφικών μικροδοριφορικών αλληλουχιών (ανάλυση MLMT, Ochsenreither *και συν.,* 2006) και της ανάλυσης ισοενζύμων και DNA με χρήση περιοριστικών ενζύμων (PCR- restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Schönian *και συν.,* 2008). Η φυλογένεια η οποία βασίζεται στους πολυμορφισμούς των νουκλεοτιδίων σε διαφορετικούς στόχους του γονιδιώματος, έχει επιβεβαιώσει την ταξινόμηση του γένους *Leishmania* με την τεχνική MLEE με μερικές μόνο εξαιρέσεις, όπως για παράδειγμα τους ενδο-ζυμοδεματικούς πολυμορφισμούς της *L. infantum* MON-1 ή της ταξινόμησης του συμπλέγματος της *L. donovani* στην Ανατολική Αφρική (Kuhls *και συν.*, 2007, Lukeš *και συν.*, 2007).

Υπάρχουν τουλάχιστον 30 ταυτοποιημένα είδη *Leishmania* και πολλά άλλα είδη που έχουν βρεθεί ότι μολύνουν τον άνθρωπο, αλλά δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί (World Health Organization, 1990).

Subgenus	World distribution	Species
Leishmania (Ross, 1903)	Old World	**L. donovani complex**
		L. donovani (Laveran & Mesnil, 1903)
		L. archibaldi (Castellani & Chalmers, 1919)
		L. infantum complex*
		L. infantum (Nicolle, 1908 (syn. L. chagasy Cunha& Chagas, 1937))
		L. tropica complex
		L. tropica (Wright, 1903)
		L. killicki complex
		L. killicki (Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986)
		L. aethiopica complex
		L. aethiopica (Bray, Ashford & Bray, 1973)
		L. major complex
		L. major (Yakimoff & Shokhor, 1914)
	New World	**L. mexicana complex**
		L. mexicana (Biagi, 1953 (syn. L.pifanoi Medina & Romero, 1959))
		L. amazonensis coplex
		L. amazonensis (Lainson & Shaw, 1972 (syn. L. Garnhami Scorza *και συν.,* 1979))
		L. aristidesi (Lainson & Shaw, 1979)
Viannia Lainson & Shaw, 1987	New World	**L. brazilliensis complex**
		L. brazilliensis (Viannia, 1911)
		L. peruviana (Velez, 1913)
		L. guyanensis complex
		L. guyanensis (Floch, 1954)
		L. panamensis (Lainson & Shaw, 1972)
		L. shawi (Lainson *και συν.,* 1989)
		L. naiffi complex
		L. naiffi (Lainson & Shaw, 1989)
		L. lainsoni complex
		L. lainsoni (Silveira *και συν.,* 1987)

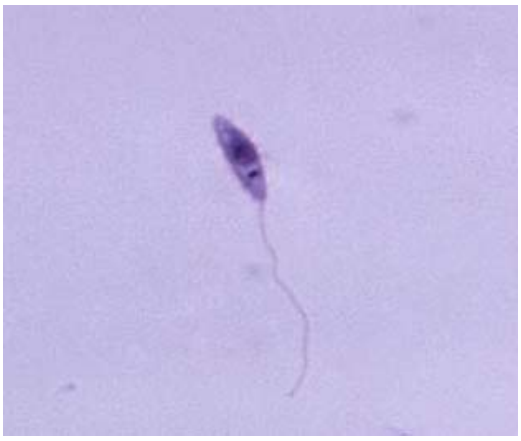
*Στον νέο κόσμο το σύμπλεγμα αναφέρεται σαν σύμπλεγμα *L. chagasi*. Πιστεύεται ότι η *L. infantum* της μεσογείου εισήχθη στην Νότια Αμερική από τους Ισπανούς κατακτητές (Lukeš *και συν.,* 2007)

Πίνακας 1: Κατάταξη των Λεϊσμανιών με βάση το ενζυμικό τους προφίλ

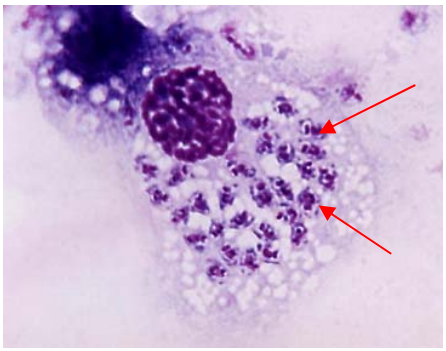
1-2. Βιολογικός κύκλος της Λεϊσμάνια

Οι Λεϊσμάνιες είναι διγενετικά παράσιτα που στη φύση μεταδίδονται από έντομα διαβιβαστές (Φλεβοτόμους) σε σπονδυλωτούς ξενιστές (θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου). Κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής τους μεταξύ των δύο ξενιστών, αλλάζουν μορφολογία και προσαρμόζονται στις διαφορετικές συνθήκες που πρέπει να αντιμετωπίσουν. Παρουσιάζουν δύο κύρια μορφολογικά στάδια (Εικ. 1): α) το αμαστιγωτό, με χαρακτηριστικά σφαιρικό ή οβάλ σώμα διαμέτρου 2.5-6.8 μ, που βρίσκεται στα φαγολυσσοσώματα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων των θηλαστικών ξενιστών και χαρακτηρίζεται από την ενδοκυττάρια παρουσία του κινητοπλάστη, ένα δίχτυο από μεγάλους και μικρούς κύκλους μιτοχονδριακού DNA το οποίο βρίσκεται κοντά στη βάση του μαστιγίου, β) το προμαστιγωτό που φέρει μακρύ μαστίγιο και αποτελεί την εξωκυττάρια διαιρούμενη μορφή του παράσιτου με μήκος 15-30 μ και απαντάται στο έντερο των Φλεβοτόμων-ξενιστών (Diptera: Psychodidae). Τα μικρά σε μέγεθος προμαστιγωτά με τις πολύ γρήγορες κινήσεις, που βρίσκονται στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου του εντόμου ξενιστή αποτελούν τις μετακυκλικές μορφές του παράσιτου οι οποίες μολύνουν τα θηλαστικά (μολυσματικό στάδιο) (Sacks και Perkins, 1984).

A



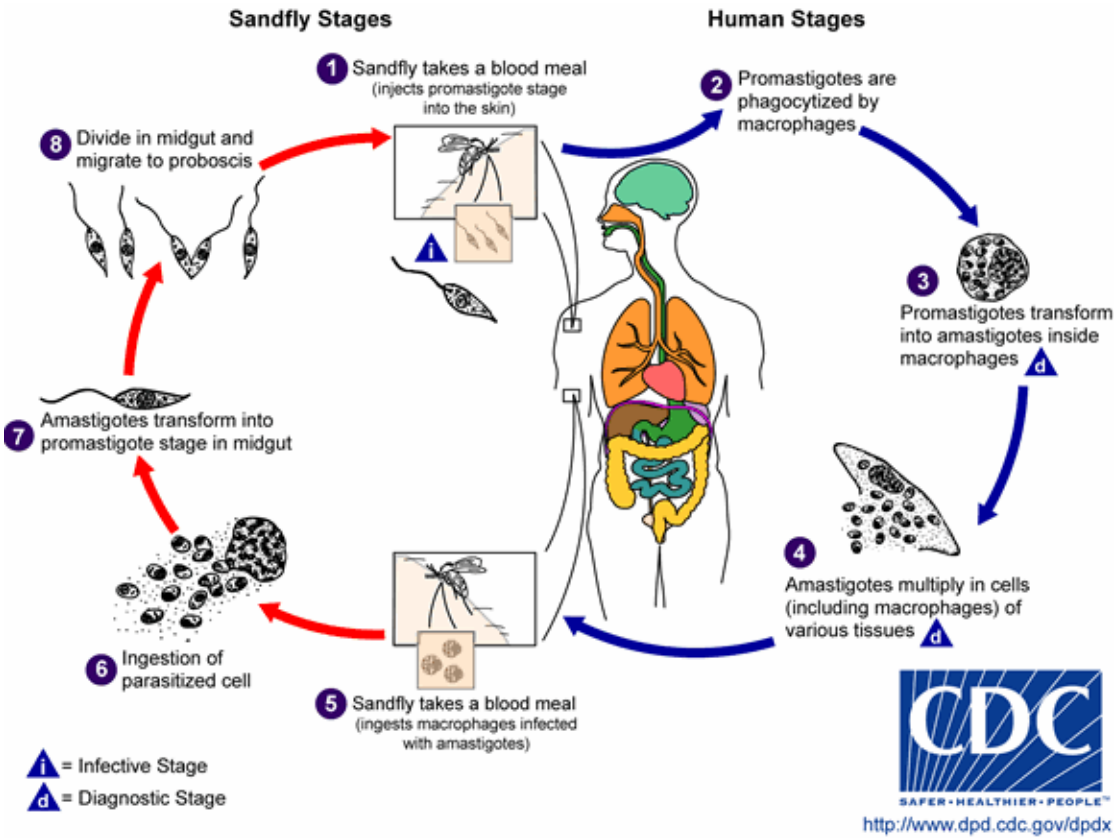
B



Εικόνα 1: (Α) Προμαστιγωτή μορφή της Λεϊσμάνια και (Β) Ενδοκυττάρια αμαστιγωτή μορφή της Λεϊσμάνια. Αρχείο CDC (Centers for Disease Control and Prevention)**.**

Όταν ο θηλυκός Φλεβοτόμος, στην προσπάθεια του να τραφεί από ένα μολυσμένο με Λεϊσμάνια ξενιστή-αποθήκη, πάρει μαζί με το αίμα και αμαστιγωτές μορφές, αυτές θα ελευθερωθούν μετά την πέψη των μακροφάγων και ακολουθώντας το ελάχιστο ένα κύκλο δυαδικής διαίρεσης μετατρέπονται σε κινητά προμαστιγωτά. Τα προμαστιγωτά πολλαπλασιάζονται (ασεξουαλικά με διχοτόμηση) με πολύ έντονο ρυθμό στον εντερικό σωλήνα των Φλεβοτόμων. Ο πολλαπλασιασμός αυτός συμβαίνει στο μέσο τμήμα του έντερου (*Leishmania* subgenus) ή στο οπίσθιο και μέσο τμήμα του έντερου (*Viannia* subgenus). Στην συνέχεια τα παράσιτα μεταναστεύουν στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου και/ή στο φάρυγγα και στην προβοσκίδα, όπου και μεταμορφώνονται στην μετακυκλική μορφή. Ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ο κύκλος του παράσιτου μέσα στο έντομο-ξενιστή ποικίλει και εξαρτάται από το είδος της Λεϊσμάνια, το είδος του Φλεβοτόμου και τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και διαρκεί κατά μέσο όρο 5 μέρες.

Όταν τα μετακυκλικά προμαστιγωτά ενοφθαλμιστούν στην επιδερμίδα των θηλαστικών με το νύγμα μολυσμένων Φλεβοτόμων, τότε φαγοκυτταρώνονται ταχύτατα από τα μονοπύρηνα κύτταρα του δυχτιοενδοθηλιακού συστήματος και μετατρέπονται σε μη κινητά αμαστιγωτά. Τα αμαστιγωτά που επιβιώνουν διαιρούνται με μίτωση μέσα στα φαγολυσσοσώματα των μακροφάγων. Η μόλυνση μπορεί να διασπαρθεί στο θηλαστικό-ξενιστή όταν μακροφάγα με μεγάλο παρασιτικό φορτίο σπάσουν και τα αμαστιγωτά φαγοκυτταρωθούν από άλλα μακροφάγα. Αφού εγκατασταθεί το παράσιτο στο σημείο ενοφθαλμισμού διασπείρεται στο σώμα του ξενιστή ανάλογα με το είδος και τον τροπισμό του παράσιτου. Ο βιολογικός κύκλος της Λεϊσμάνια ολοκληρώνεται όταν ο θηλυκός Φλεβοτόμος πάρει γεύμα αίματος από ξενιστή παρακαταθήκη το οποίο περιέχει μολυσμένα κύτταρα (Εικ. 2). Ο ενοφθαλμισμός μετακυκλικών προμαστιγωτών δια μέσου του τσιμπήματος των Φλεβοτόμων αποτελεί τη συνηθέστερη οδό μετάδοσης της λεϊσμανίασης και οποιοσδήποτε άλλος τρόπος (π.χ. μετάγγιση, μέσω συριγγών, εκ γενετής) αποτελεί εξαίρεση.



Εικόνα 2: Ο Βιολογικός Κύκλος της *Leishmania.* Αρχείο CDC.

1-3. Ο φορέας του παράσιτου

Οι αιματοφάγοι θηλυκοί Φλεβοτόμοι (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) αποτελούν τους μόνους γνωστούς φυσικούς φορείς της *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1990). Είναι γνωστά περισσότερα από 1000 είδη Φλεβοτόμων, όμως μόνο περίπου 70 από αυτά έχουν αναγνωριστεί σαν φορείς της *Leishmania*. Δύο γένη είναι υπεύθυνα για την μετάδοση της *Leishmania* στον άνθρωπο: *Phlebotomus,* στον παλαιό κόσμο, και *Lutzomyia* στον νέο κόσμο (Murray *και συν.,* 2005).

Οι Φλεβοτόμοι (Εικ. 3) μπορούν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται σε διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος, από τις ερήμους μέχρι και τα τροπικά δάση. Οι Φλεβοτόμοι συνήθως τρέφονται και αναπαύονται στο ίδιο μικροπεριβάλλον, όπως είναι το χώμα που συσσωρεύετε σε ρωγμές σε τοίχους, βράχους, κουφάλες δένδρων που αποτελούν καταφύγιο και φωλιές ζώων, σε οικιακά σκουπίδια και σε υγρό στρώμα από φύλλα στα δάση. Αυτές οι συνθήκες περιβάλλοντος εξασφαλίζουν οργανική ύλη, θερμότητα και υγρασία που αποτελούν απαραίτητους παράγοντες για την ανάπτυξη των προνυμφικών σταδίων του εντόμου.

Οι ενήλικοι Φλεβοτόμοι δεν είναι ενεργοί κατά τη διάρκεια της ημέρας και αναπαύονται σε υγρές και σκοτεινές τρύπες που τους εξασφαλίζουν συνθήκες επιβίωσης σε ζεστά και ξηρά κλίματα. Γίνονται ενεργοί κατά το σούρουπο, όπου η θερμοκρασία περιβάλλοντος πέφτει και αυξάνει η υγρασία. Τότε οι θηλυκοί Φλεβοτόμοι αρχίζουν να αναζητούν ξενιστή για να τραφούν με αίμα και για το λόγο αυτό ταξιδεύουν σε μια ακτίνα που κυμαίνεται από μερικά έως και μερικές εκατοντάδες μέτρα από το περιβάλλον που ζουν (Lewis και Ward, 1987).

Εικόνα 3: Φλεβοτόμοι. Ο ενδιάμεσος ξενιστής της Λεϊσμάνια. Αρχείο CDC.

1-4. Αποθήκη του παράσιτου και τρόποι μετάδοσης

Οι Λεϊσμάνιες διατηρούνται σε θηλαστικά ξενιστές-παρακαταθήκη, που αποτελούν την αποθήκη του παράσιτου στη φύση, από τα οποία ξεκινά ο κύκλος μετάδοσης. Το είδος του θηλαστικού ξενιστή-παρακαταθήκη και το περιβάλλον στο οποίο ζει καθορίζουν τον τρόπο μετάδοσης της ασθένειας στους ανθρώπους. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τρόποι μετάδοσης της λεϊσμανίασης:

1) **Ζωονοτική μετάδοση:** τα παράσιτα κυκλοφορούν κυρίως μεταξύ άγριων ζώων και Φλεβοτόμων σε ένα πρωτογενές περιβάλλον, με τον άνθρωπο να μολύνεται τυχαία, όπως για παράδειγμα μολύνσεις με *L. (V.) braziliensis* στα δάση του Αμαζονίου.

2) **Άνθρωπο- Ζωονοτική μετάδοση:** τα παράσιτα κυκλοφορούν μεταξύ ζώων (άγριων και κατοικίδιων) και του ανθρώπου. Αυτός ο τρόπος μετάδοσης τυπικά συμβαίνει σε δευτερογενές περιβάλλον, όπως για παράδειγμα μολύνσεις με *L. infantum* στην περιοχή της Μεσογείου, με αποθήκη του παράσιτου τα αδέσποτα και τα δεσποτιζόμενα σκυλιά.

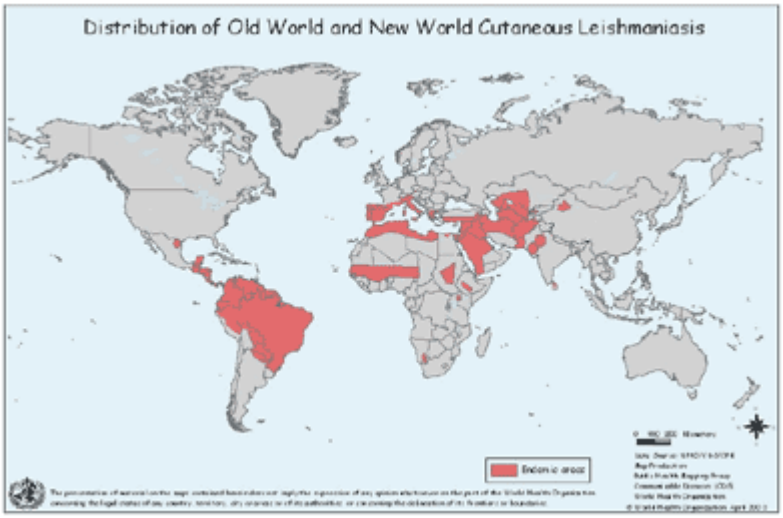
3) **Αθρωπονοτική μετάδοση:** τα παράσιτα κυκλοφορούν μεταξύ των ανθρώπων σε κατοικημένες περιοχές, όπως για παράδειγμα μολύνσεις με *L. donovani* στην Ινδία και στην ανατολική Αφρική.

2. ΟΙ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΕΙΣ

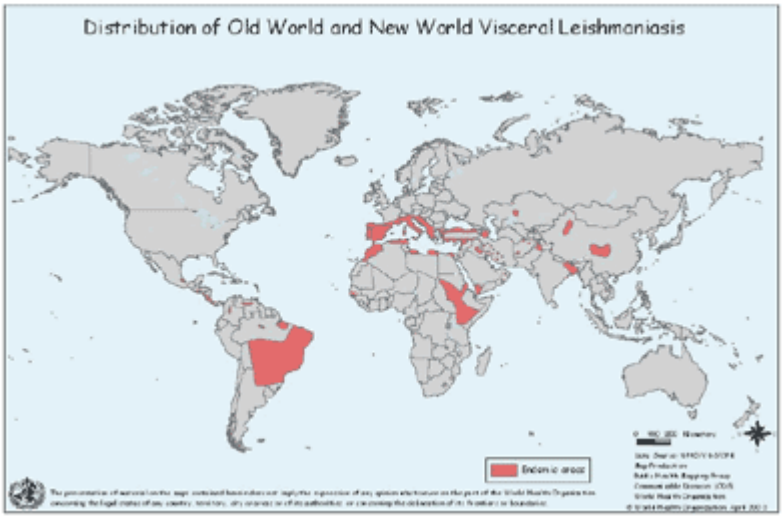
2-1. Ορισμός- Ανασκόπηση

Οι **λεϊσμανιάσεις** (**leishmaniases**) είναι μολυσματικές ασθένειες οι οποίες προκαλούνται από το πρωτόζωο παράσιτο του γένους *Leishmania,* το οποίο μπορεί να μολύνει πολλά είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, και μεταδίδονται μέσω ενδιάμεσου ξενιστή/ φορέα, το Φλεβοτόμο (σκνίπα).

Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία, 66 χώρες του Παλαιού Κόσμου και 22 του Νέου Κόσμου είναι ενδημικές όσον αφορά στη λεϊσμανίαση στον άνθρωπο, με αριθμό κρουσμάτων που εκτιμάται ότι κυμαίνεται στα 1-1.5 εκατομμύρια κρούσματα Δερματικής Λεϊσμανίασης και 500,000 Σπλαχνικής Λεϊσμανίασης ανά έτος (Desjeux, 1996). Υπολογίζεται ότι 12 εκατομμύρια άνθρωποι στον Κόσμο είναι μολυσμένοι με Λεϊσμάνια με σοβαρές επιπτώσεις για την υγεία τους, με το προσδόκιμο ζωής να μειώνεται σε 860,000 άνδρες και σε 1.2 εκατομμύρια γυναίκες (http://www.who.int/tdr/diseases/leish/) (Εικ. 4, 5).



Εικόνα 4: Παγκόσμια κατανομή της Δερματικής Λεϊσμανίασης. Αρχείο WHO (World Health Organization)**.**

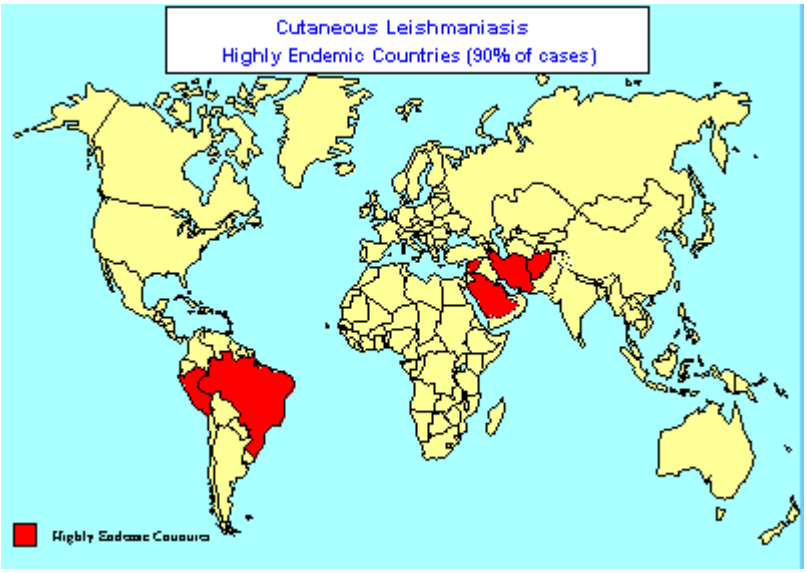


Εικόνα 5: Παγκόσμια κατανομή της Σπλαχνικής Λεϊσμανίασης. Αρχείο WHO.

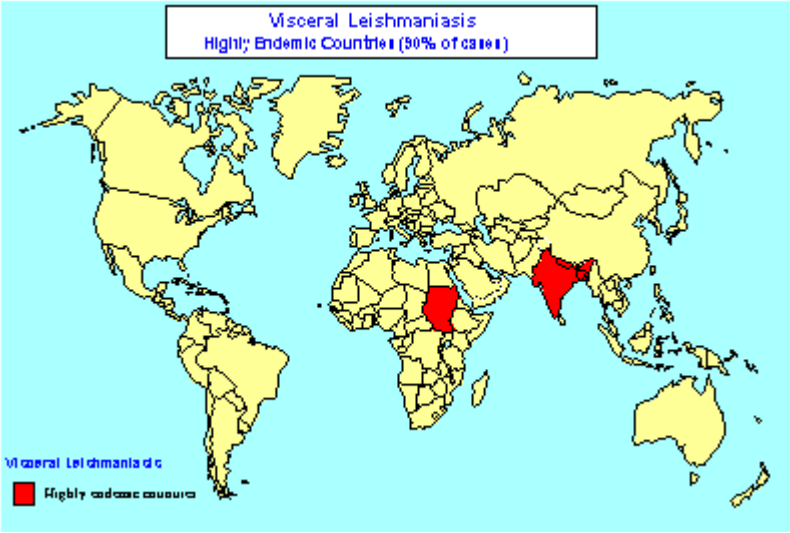
Η νόσος προσβάλλει τους φτωχότερους ανθρώπους στις φτωχότερες χώρες (Alvar *και συν.,* 2006): σε 72 αναπτυσσόμενες χώρες και σε 13 οι οποίες περιλαμβάνονται στις λιγότερο αναπτυγμένες. Τα περιστατικά λεϊσμανίασης δεν έχουν ομοιόμορφη κατανομή στις ενδημικές περιοχές: περίπου 90% των περιστατικών Δερματικής Λεϊσμανίασης παρουσιάζονται σε 7 μόνο χώρες (Αφχανιστάν, Αλγερία, Βραζιλία, Ιράν, Περού, Σαουδική Αραβία και Συρία)(Εικ. 6) και περίπου 90% των περιστατικών Σπλαχνικής Λεϊσμανίασης παρουσιάζονται στις αγροτικές και περιαστικές περιοχές 5 χωρών (Μπαγκλαντές, Ινδία, Νεπάλ, Σουδάν και Βραζιλία) (Εικ. 7).

Τα στοιχεία αυτά είναι κατά προσέγγιση και πολύ πιθανόν υποτιμημένα. Νεότερα στοιχεία δείχνουν ότι τα κρούσματα λεϊσμανίασης στον άνθρωπο έχουν αυξηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο. Περιβαλλοντολογικοί και άλλοι παράγοντες που έχουν να κάνουν με την ανθρώπινη δραστηριότητα συνεισφέρουν σε αλλαγές στην επιδημιολογία της νόσου, η οποία παρουσιάζεται να έχει μεγαλύτερη γεωγραφική διασπορά από ότι ήταν γνωστό μέχρι σήμερα. Αυτόχθονα κρούσματα λεϊσμανίασης καταγράφηκαν τα τελευταία χρόνια σε μη ενδημικές περιοχές, όπως για παράδειγμα σε αρκετές Πολιτείες της Αμερικής και επαρχίες του Καναδά (Duprey *και συν.,* 2006), σε περιοχές της Βόρειας Αυστραλίας (Rose *και συν.* 2004) και σε κάποιες

Ευρωπαϊκές χώρες (Ουγγαρία, Γερμανία) (Koehler *και συν.,* 2002, Antoniou *και συν.,* 2008, Maroli *και συν., 2008*).



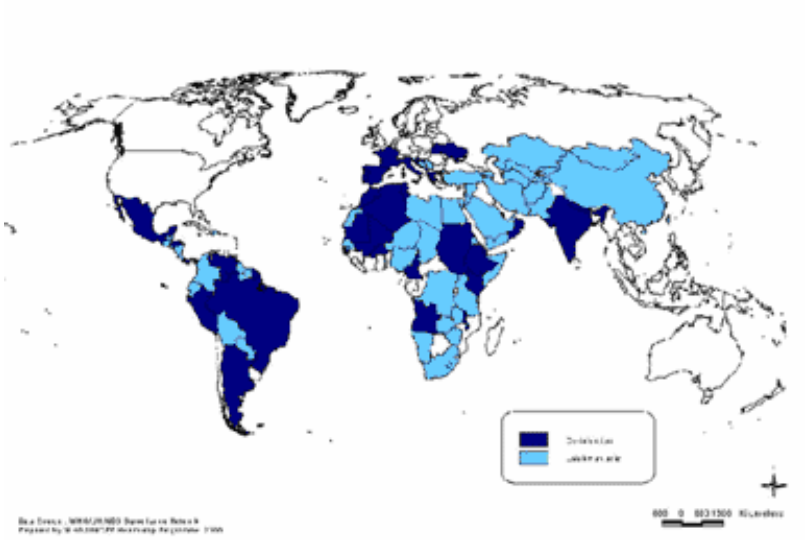
Εικόνα 6: Οι χώρες (Αφχανιστάν, Αλγερία, Βραζιλία, Ιράν, Περού, Σαουδική Αραβία, Συρία) στις οποίες παρουσιάζεται το 90 % των περιστατικών Δερματικής Λεϊσμανίασης. Αρχείο WHO.



Εικόνα 7: Οι χώρες (Μπαγκλαντές, Ινδία, Νεπάλ, Σουδάν, Βραζιλία) στις οποίες παρουσιάζεται το 90 % των περιστατικών Σπλαχνικής Λεϊσμανίασης. Αρχείο WHO.

Σε ανοσοϊκανά άτομα η μόλυνση από είδη *Leishmania* που μπορούν να προκαλέσουν **Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (ΣΛ)** δεν ακολουθείται πάντοτε από εκδήλωση της ασθένειας. Κάποια άτομα παραμένουν ασυμπτωματικά, πολλά άλλα παρουσιάζουν ολιγοσυμπτωματική μόλυνση που αυτοθεραπεύεται και πιθανόν μόνο ένα στα πέντε με 10 άτομα αναπτύσσουν ΣΛ (Desjeux, 1992, Badaro *και συν.,* 1996). Αυτό οφείλεται στην ικανότητα ανοσολογικής απάντησης του ασθενή. Η πανδημία από τον ιό HIV έχει αλλάξει την επιδημιολογία της λεϊσμανίασης. Η προσβολή από τον ιό HIV αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΛ κατά 100 έως 2,320 φορές σε ενδημικές περιοχές, μειώνει την πιθανότητα ανταπόκρισης στην θεραπεία και αυξάνει δραματικά την πιθανότητα αναζωπυρώσεων (Alvar *και συν.,* 2008). Παράλληλα, η ΣΛ προάγει την κλινική εξέλιξη της ασθένειας από HIV και την ανάπτυξη συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν το AIDS. Οι δύο ασθένειες παρουσιάζουν συνεργική επίδραση η οποία είναι επιβλαβής για την κυτταρική ανοσία επειδή έχουν σαν στόχο παρόμοια κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Olivier *και συν.,* 2003, Tremblay *και συν.,* 1996). Οι συν-λοιμώξεις *Leishmania*-HIV αυτή τη στιγμή αναφέρονται ως το 2 έως το 9% όλων των περιστατικών ΣΛ στις ενδημικές χώρες, όμως το ποσοστό αυτό είναι πιθανό να αυξηθεί δραματικά (Alvar *και συν.,* 2008). Σε κάποιες χώρες όπως στην Αιθιοπία το ποσοστό συν-λοιμώξεων σε ασθενείς με ΣΛ κυμαίνεται από 15 έως 30% (Lyons *και συν.,* 2003).

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περιστατικά συν-λοιμώξεων *Leishmania*-HIV σε 35 χώρες παγκοσμίως (Εικ. 8). Τα περισσότερα περιστατικά, τα οποία δηλώθηκαν στην Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) προέρχονται από τέσσερεις χώρες της νότιο-δυτικής Ευρώπης (Γαλλία, Ιταλία, Πορτογαλία, Ισπανία).



Εικόνα 8: Παγκόσμια κατανομή της λεϊσμανίασης ( ) και οι χώρες που δηλώνουν συν-λοιμώξεις *Leishmania*/HIV ( ). Αρχείο WHO.

2-2. Λεϊσμανίαση στον άνθρωπο

2-2-1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Στον άνθρωπο η λεϊσμανιάση εκδηλώνεται κλινικά με διάφορες μορφές (WHO, 2000). Τη **Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (ΣΛ)**, η οποία προκαλείται από τη *Leishmania donovani* στον παλαιό κόσμο και τη *Leishmania infantum* (synonym: *L. chagasi*) σε παλαιό και νέο κόσμο, που αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της νόσου η οποία είναι θανατηφόρα στο 95% των περιπτώσεων αν δεν δοθεί θεραπεία (Daher *και συν.,* 2008). Ένας αριθμός ειδών Λεϊσμάνια είναι υπεύθυνα για την πρόκληση της **Δερματικής Λεϊσμανίασης (ΔΛ)** ή της **Βλεννογονοδερματικής Λεϊσμανίασης (ΒΛ)** οι οποίες αν και όχι θανατηφόρες είναι υπεύθυνες για αξιοσημείωτη θνητότητα μεταξύ της μεγάλης πλειοψηφίας ατόμων από ενδημικές περιοχές.

2-2-2. Παθογένεια της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο

Η εγκατάσταση των μετακυκλικών παρασίτων στην επιδερμίδα των θηλαστικών διευκολύνεται από το σάλιο των Φλεβοτόμων, το οποίο αυξάνει την μολυσματικότητα της *Leishmania.* Μετά την φαγοκυττάρωση τους από τα μακροφάγα, τα αμαστιγωτά έχουν την ικανότητα να αντιστέκονται στην ενδοκυτταρική πέψη σαν συνέπεια διαφόρων παραγόντων που οφείλονται στα παράσιτα και στον ξενιστή (Takken και Knols, 2007).

Όταν η ενδοκυτταρική ανάπτυξη των αμαστιγωτών παραμένει εντοπισμένη στο σημείο ενοφθαλμισμού τότε ελευθερώνονται διάφορες κυτοκίνες και η αντίδραση των κυττάρων ξεκινά έχοντας σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη τοπικής αλλοίωσης ΔΛ. (Takken και Knols, 2007) Σε άλλες περιπτώσεις τα παράσιτα εξαπλώνονται σε όργανα τα οποία είναι πλούσια σε μονοπύρηνα φαγοκύτταρα προκαλώντας έτσι ΣΛ (Takken και Knols, 2007). Τα αμαστιγωτά μπορεί να εξαπλωθούν και σε άλλες περιοχές του δέρματος όπως συμβαίνει στην Διάχυτη Δερματική Λεϊσμανίαση (ΔΔΛ) ή στους βλεννογόνους του προσώπου στην περίπτωση της ΒΛ (Takken και Knols, 2007). Ο εντοπισμός των παρασίτων στους διάφορους ιστούς και όργανα εξαρτάται ταυτόχρονα από τον φυσικό τροπισμό που έχουν τα διάφορα στελέχη *Leishmania* και την ανοσολογική ικανότητα του ξενιστή και επηρεάζουν την κλινική έκφραση της ασθένειας (Gradoni και Gramiccia, 1994).

2-2-3. Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (ΣΛ)

Η ΣΛ, γνωστή και ως **Kala azar** ή **Dum-Dum Fever**, προκαλείται ως επί το πλείστον από: α) τη *L. donovani* στην Ινδία, στην Ανατολική Αφρική και στην Αραβική χερσόνησο, β) τη *L. infantum* στη Μεσόγειο, στη Μέση Ανατολή, στην Κεντρική Ασία και στην Αμερική.

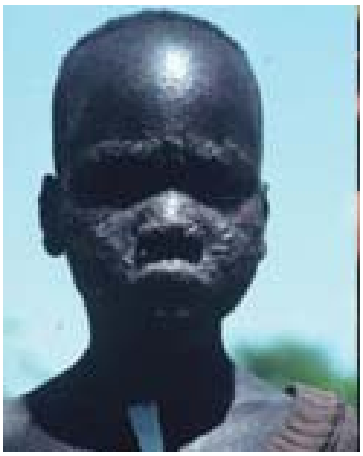
Η περίοδος επώασης στον άνθρωπο είναι 2-6 μήνες, όμως μπορεί να κυμαίνεται από 10 μέρες (σε εξαιρετικές περιπτώσεις) έως και πολλά χρόνια (συνηθέστερα). Η κλασσική κλινική εικόνα της ΣΛ περιλαμβάνει πυρετό, κατάπτωση, απώλεια βάρους, αναιμία, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία και σε μερικές περιπτώσεις αδενοπάθεια (Berman, 1997, Prasad *και συν.,* 2009, Al-Jurayyan *και συν.*,1995) (Εικ. 9Α, Πίνακας 2). Το συνηθέστερο σύμπτωμα είναι διαλείπων, επιμένων και παρατεινόμενος πυρετός που δεν υποχωρεί με αντιβιοθεραπεία. Η σπληνομεγαλία εμφανίζεται νωρίς και παρουσιάζεται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Η αναιμία είναι υπεύθυνη για τον αποχρωματισμό του δέρματος και των βλεννογόνων (Daher *και συν.,* 2008, Berman, 1997). Στην Ινδία το δέρμα των αρρώστων παίρνει ένα υπόγκριζο χρώμα στο οποίο οφείλεται η ονομασία της ασθένειας (**Kala azar)** που δόθηκε στη συγκεκριμένη περιοχή. Η ΣΛ χωρίς θεραπεία είναι θανατηφόρα σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% των ασθενών. Οι επιλογές που παρέχονται αυτή τη στιγμή για την θεραπεία της ασθένειας βασίζονται στα πεντασθενή άλατα του αντιμονίου, στη συμβατική ή τη λιποσωματική αμφοτερικίνη Β και τη μιλτεφοσίνη οι οποίες δείχνουν μεγάλα ποσοστά επιτυχίας της θεραπείας σε διάφορες ενδημικές περιοχές (Croft *και συν.*, 2006, Sundar και Rai, 2005, Den Boer και Davinson, 2006). Η ΣΛ που οφείλεται στην *L. donovani* συχνά συνδέεται με εκδήλωση δερματικών αλλοιώσεων (post kala-azar dermal leishmaniasis) (PKDL) οι οποίες παρουσιάζονται αμέσως μετά την αποθεραπεία από την ασθένεια ή σε χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 1- 20 χρόνια από την αποθεραπεία (Salotra *και συν.,* 2003, Musa *και συν.*, 2002). Η PKDL στην Ινδία παρουσιάζεται σχεδόν στο 10- 20% των ασθενών και στο Σουδάν στο 50% των ασθενών που αποθεραπεύονται από ΣΛ (Ramesh και Mukherjee, 1995, Zijlstra *και συν.*, 1994, Zijlstra *και συν.*, 2003). Η PKDL εμφανίζεται αρχικά με αποχρωματισμό του δέρματος εντοπισμένου σε μερικά σημεία του δέρματος, μπορεί όμως να εξαπλωθεί σε ολόκληρο το σώμα παίζοντας σημαντικό ρόλο στην μετάδοση των παρασίτων στους Φλεβοτόμους (Εικ. 9Β).

Σύμπτωμα ή παθολογική κατάσταση	**Αναλογία εμφάνισης συμπτωμάτων σε ανθρώπους με ΣΛ. %**
Σπληνομεγαλία	100
Πυρετός	94
Ηπατομεγαλία	94
Ωχρότητα του δέρματος	91
Μολύνσεις από το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα	70
Φούσκωμα της κοιλιάς	60
Απώλεια βάρους	53

Πίνακας 2 : Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις της ΣΛ στον άνθρωπο σε φθίνουσα συχνότητα (Al-Jurayyan *και συν.*,1995).

A

B



Εικόνα 9: (A) Ασθενής με Σπλαχνική Λεϊσμανίαση. Σημειώνονται τα όρια του ήπατος και της σπλήνας που διογκώθηκαν λόγω της νόσου. Αρχείο ITM (Institute of Tropical Medicine)**. Φωτογραφία PID, (B) Ασθενής με post kala-azar dermal leishmaniasis. Αρχείο WHO.**

Η ΣΛ συνοδεύεται από σοβαρές αιματολογικές διαταραχές (Πίνακας 3) στις οποίες περιλαμβάνονται πάντοτε η αναιμία και η ουδετεροπενία (Al-Jurayyan *και συν.*,1995). Η αναιμία συνήθως είναι υπόχρωμη, μικροκυτταρικού τύπου. Επίσης τυπική διαταραχή είναι η μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων που οδηγεί στην προοδευτική ανάπτυξη παγκυτοπενίας.

Εργαστηριακό εύρημα	**Αναλογία εμφάνισης συμπτωμάτων σε ανθρώπους με ΣΛ. %**
Διαταραχές στην μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ανισοπικοιλοκυττάρωση)	100
Ουδετεροπενία	73
Ηπατικές διαταραχές	69
Θρομβοκυτταροπενία	56
Αναιμία	25
Διαταραχές πήξης του αίματος	11

Πίνακας 3: Οι κυριότερες αιματολογικές διαταραχές στη Σπλαχνική Λεϊσμανίαση του ανθρώπου σε φθίνουσα συχνότητα (Al-Jurayyan *και συν.*,1995).

2-2-4. Δερματική Λεϊσμανίαση (ΔΛ)

Η ΔΛ είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μορφή της ασθένειας, γνωστή από την αρχαιότητα (Oumeish, 1999). Συνδέεται με μία ή περισσότερες εντοπισμένες αλλοιώσεις του δέρματος, ανάλογα με τον αριθμό των τσιμπημάτων που δέχεται ο ξενιστής, χωρίς την εμπλοκή των βλεννογόνων και χωρίς τάση για επέκταση. Οι αλλοιώσεις παρουσιάζονται στα σημεία του σώματος που είναι εκτεθειμένα στα τσιμπήματα των Φλεβοτόμων (Εικ. 10). Όλα τα αθρωπόφιλα είδη *Leishmania,* συμπεριλαμβανομένων αυτών με τροπισμό στα εσωτερικά όργανα, μπορούν να είναι υπεύθυνα για την εντοπισμένη ΔΛ η οποία παρουσιάζεται σαν μια ελαφριά αυτό-ιάσιμη λοίμωξη. Η περίοδος επώασης ποικίλει και κυμαίνεται μεταξύ μιας εβδομάδας και αρκετών μηνών. Η ώριμη αλλοίωση είναι καλά περιγραμμένη, γενικά κυκλική ή

οβάλ με ποικίλες διαστάσεις διαμέτρου που κυμαίνονται μεταξύ 0.5-10 cm. Το πιο κοινό κλινικό χαρακτηριστικό είναι η ελκώδης αλλοίωση με επικλινή τοιχώματα και κεντρική άλω. Ο υγρός τύπος της αλλοίωσης αποτελεί τυπική μορφή που παρουσιάζεται στη ζωονοτική μορφή της ΔΛ, που προκαλείται από τη *L. major,* τη *L. mexicana,* τη *L. peruviana* και τη *L. brazilliensis*. Ο ξηρός τύπος, που παρουσιάζεται με τη μορφή μικρών οζιδίων τα οποία είναι καλυμμένα με λέπια ξηρής επιδερμίδας, αποτελεί τη μορφή που παρατηρείται στην αθρωπονοτική ΔΛ που προκαλείται από τη *L. tropica* (Reithinger *και συν.,* 2007). Η *L. tropica* εντοπίζεται στην Αιθιοπία, στην Κένυα, στη Μέση Ανατολή, στην Ευρωπαϊκή Μεσόγειο και στην Ινδία, όπου κυρίως περιορίζεται στις πυκνά κατοικημένες περιοχές. Η μετάδοση του παράσιτου φυσιολογικά πραγματοποιείται από το έντομο-διαβιβαστή στον άνθρωπο. Αντίθετα η *L. major* εντοπίζεται σε αραιά κατοικημένες περιοχές της Μέσης Ανατολής, στη δυτική Ινδία και στο Σουδάν, όπου το παράσιτο μεταφέρεται μεταξύ μικρών τρωκτικών, με τον άνθρωπο να αποτελεί έναν τυχαίο ξενιστή. Η κλινική εξέλιξη της ΔΛ είναι χρόνια και αυτοϊάσιμη σε χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από μερικούς μήνες (*L. major, L. mexicana, L. peruviana)* έως μερικά χρόνια (*L. aethiopica, L. infantum, L. tropica, L. guyanensis, L. panamensis*). Η αυτοΐαση οδηγεί πάντα στην παραμονή, στην περιοχή της αλλοίωσης, ουλής η οποία είναι δυνατό να αποφευχθεί στις περιπτώσεις που εφαρμοστεί θεραπεία με πεντασθενή άλατα του αντιμονίου κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης.

A

B

Εικόνα 10: Δερματική Λεϊσμανίαση: (A) σε Κύπριο ασθενή, (B) σε Μαροκινό ασθενή.

2-2-5. Άλλες μορφές λεϊσμανίασης

Η **Διάχυτη Δερματική Λεϊσμανίαση (Diffuse Cutaneous Leishmaniasis) (ΔΔΛ)** είναι σοβαρή μορφή λεϊσμανίασης η οποία παρουσιάζεται σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή και προκαλείται από ορισμένα είδη *Leishmania:* τη *L. aethiopica* στο παλαιό κόσμο και τη *L. amazonensis* (σπανίως τη *L. mexicana*) στο νέο κόσμο. Η πρώτη αλλοίωση συνίσταται στην ανάπτυξη μη ελκώδους οζιδίου, πλούσιου σε παράσιτα. Τα οζίδια γίνονται πολλά, διασπείρονται σε όλο το σώμα και δίνουν την εικόνα που μοιάζει με αυτήν της λέπρας (Εικ. 11Α). Η σοβαρότητα της μορφής αυτής (ΔΔΛ) σχετίζεται με την αντοχή στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα και στο γεγονός ότι δεν μπορεί να υπάρξει ποτέ αυτοΐαση (Takken και Knols, 2007).

Η **Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση (mucocutaneous leishmaniasis) (ΒΛ)** η οποία είναι γνωστή και σαν "espundia", αποτελεί σοβαρή κλινική οντότητα που οφείλεται στη *L. braziliensis* και περιστασιακά στη *L. paramensis*. Η αρχική δερματική αλλοίωση ακολουθείται από δευτερογενή εμπλοκή των βλεννογόνων μέσα σε διάστημα που κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες έως αρκετά χρόνια. Η προσβολή των βλεννογόνων ξεκινά συνήθως από τον χόνδρινο ιστό του ρινικού διαφράγματος, ο οποίος καταστρέφεται πολύ γρήγορα. Οι βλεννογόνοι του στόματος και των χειλιών προσβάλλονται σε μεταγενέστερο στάδιο και οδηγούν σε σοβαρής μορφής νέκρωση και παραμόρφωση (Εικ. 11Β). Ο θάνατος μπορεί να επέλθει μετά από πολύ σοβαρή μόλυνση των πνευμόνων. Στις περιπτώσεις που γίνει θεραπεία και επέλθει ίαση, οι ασθενείς με ΒΛ παρουσιάζουν παραμορφώσεις και κάποτε συνελκόμενες ουλές (Takken και Knols, 2007).

A

B

Εικόνα 11: Ασθενείς με: (Α) Διάχυτη Δερματική Λεϊσμανίαση, (Β) Βλεννογονοδερματική Λεϊσμανίαση. Αρχείο WHO.

2-3. Λεϊσμανίαση στο σκύλο

2-3-1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Η **Λεϊσμανίαση του Σκύλου (ΛΣ)** είναι ενζωοτικού χαρακτήρα λοιμώδες νόσημα, το οποίο προκαλεί πολυσυστηματική νόσο και οφείλεται στη *L. infantum* (Πορτογαλλία και παραμεσόγειες χώρες) και στη γενετικά ταυτόσημη *L. chagasi* (Κεντρική και Νότια Αμερική) (Slappendel και Ferrer, 1998, Mauricio *και συν.*, 1999, Baneth, 2005). Αν και η λεϊσμανίαση του ανθρώπου, που οφείλεται στη *L. Infantum,* εμφανίζεται πολύ σπανιότερα από ότι στο σκύλο, το γεγονός ότι πολλοί ασθενείς εξακολουθούν να μη δηλώνονται στις υπηρεσίες υγείας, παρά τη σχετική νομοθεσία, φαίνεται να υποβαθμίζει τη συχνότητά της. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι ο σκύλος, που είναι η κύρια πηγή της *L. infantum,* υπεισέρχεται άμεσα στην επιδημιολογία της αντίστοιχης νόσου του ανθρώπου (ζωοανθρωπονόσος) σε πολλές περιοχές του πλανήτη (WHO, 1990). Σε εκτεταμένες οροεπιζωοτιολογικές έρευνες που έγιναν στην Ισπανία, τη Γαλλία, την Ιταλία και την Πορτογαλλία υπολογίστηκε ότι ο αριθμός των μολυσμένων σκυλιών ανέρχεται στα 2.5 περίπου εκατομμύρια (Moreno και Alvar, 2002). Επίσης, υπάρχουν πολλά εκατομμύρια μολυσμένων σκυλιών στη Νότια Αμερική και έχουν αναφερθεί υψηλά ποσοστά μόλυνσης σε ορισμένες περιοχές της Βραζιλίας (Baneth, 2005).

Η ΛΣ από *L. infantum* είναι ίσως το συχνότερο πρωτοζωικό νόσημα στις παραμεσόγειες χώρες, στις οποίες το ποσοστό των ορολογικά ή/και PCR θετικών ζώων στο συνολικό πληθυσμό ενδέχεται να προσεγγίζει το 80% (Berrahal *και συν.*, 1996, Zaffarini *και συν.*, 1999, Dereure *και συν.*, 1999, Sideris *και συν.,* 1999, Solano-Gallego *και συν.*, 2001, Leontidis *και συν.*, 2002). Τα σχετικά χαμηλά ποσοστά μόλυνσης που είχαν αναφερθεί στο παρελθόν (1-42%) (Pozio *και συν.*, 1981, Mancianti *και συν.*, 1986, Bettini και Gradoni, 1986, WHO, 1990, Nieto *και συν.*, 1992, Amela *και συν.*, 1995, Acedo Sanchez C και συν., 1996, Deplazes *και συν.*, 1998, Ozensoy *και συν.*, 1998, Fisa *και συν.*, 1999, Zaffaroni *και συν.*, 1999, Dereure *και συν.*, 1999) πιθανόν να οφείλονταν στην αδυναμία των ορολογικών δοκιμασιών να ανιχνεύσουν τα μολυσμένα αλλά όχι οροθετικά ζώα (Leontides *και συν.,* 2002, Baneth, 2005).

Σε χώρες όπου δεν υπάρχουν τα είδη σκνίπας που μπορούν να μεταδώσουν το παράσιτο, η ΛΣ εμφανίζεται κυρίως σε ζώα που έχουν γεννηθεί ή παραμείνει για κάποιο χρονικό διάστημα σε περιοχές στις οποίες ενδημεί η νόσος (Longstaffe *και συν.*, 1983, Slappendel, 1988, Slappendel και Ferrer, 1998, Trees και Shaw, 1999). Τα τελευταία όμως χρόνια αυξάνονται ολοένα και περισσότερο οι αναφορές αυτόχθονων περιστατικών της νόσου στις χώρες αυτές (Anderson *και συν.,* 1980, Swenson *και συν.,* 1988, Slappendel, 1988, Sellon *και συν.,* 1993, Bravo *και συν.*, 1993, Diaz-Espineira και Slappendel, 1997). Εκτός από τις σκνίπες δεν αποκλείεται η μετάδοση του παράσιτου μέσω τραυμάτων, δερματικών ελκών και άλλων αιματοφάγων παρασίτων (π.χ. *Rhipicephalous sanguineus*), ή με τη μετάγγιση αίματος (Ferrer, 1992, Kontos και Koutinas, 1993, Bravo *και συν.,* 1993, Slappendel και Ferrer, 1998, Owens *και συν.*, 2001).

2-3-2. Παθογένεια της λεϊσμανίασης στο σκύλο

Το 10% ως 50% των μολυσμένων σκυλιών παραμένουν ασυμπτωματικοί φορείς, μερικοί από τους οποίους ενδέχεται κάποια στιγμή να απαλλαγούν τελείως από το παράσιτο ή να εκδηλώσουν αργότερα τη νόσο (Abranches *και συν.,* 1991, Cabral *και συν.,* 1992, Pinelli *και συν.,* 1994, Pinelli *και συν.*, 1995, Slappendel και Ferrer, 1998). Καθοριστική σημασία στην εκδήλωση της ΛΣ έχει η ανοσολογική απάντηση του συγκεκριμένου ζώου και συγκεκριμένα η ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας που μπορεί να περιορίσει ή να εξουδετερώσει τη *L. infantum* (Cabral *και συν.,* 1998, Slappendel και Ferrer, 1998, Ferrer, 1999). Αντίθετα, η ενεργοποίηση της χημικής ανοσίας, όχι μόνο δεν προστατεύει το ζώο αλλά ευθύνεται για πολλές από τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (Slappendel και Ferrer, 1998). Εφόσον ενεργοποιηθούν τα Th1 λεμφοκύτταρα παράγονται οι κυτταροκίνες IL-2, IFN-γ και TNF-α που φαίνεται να προλαμβάνουν την εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου στο σκύλο, όπως έχει διαπιστωθεί στα ποντίκια και στον άνθρωπο (Pinelli *και συν.,* 1994, Pinelli *και συν.,* 1995, Cabral *και συν.,* 1998, Pinelli *και συν.,* 1999, Andrade *και συν.,* 1999). Στα παραπάνω ζωικά είδη η ενεργοποίηση των Th-2 λεμφοκυττάρων, που παράγουν IL-4, IL5, IL-6, IL-10 και IL-13 έχει βρεθεί ότι συνδέεται με τη συμπωματική μορφή της νόσου (Scott, 1989, Liew και O΄Donnell, 1993, Reiner, 1994, Kemp *και συν.*, 1996, Lehmann και Alber, 1998, Pinelli *και συν.*, 1999). Σε σκυλιά που νοσούν, χωρίς να έχει εξακριβωθεί απόλυτα η ενεργοποίηση των Th-2

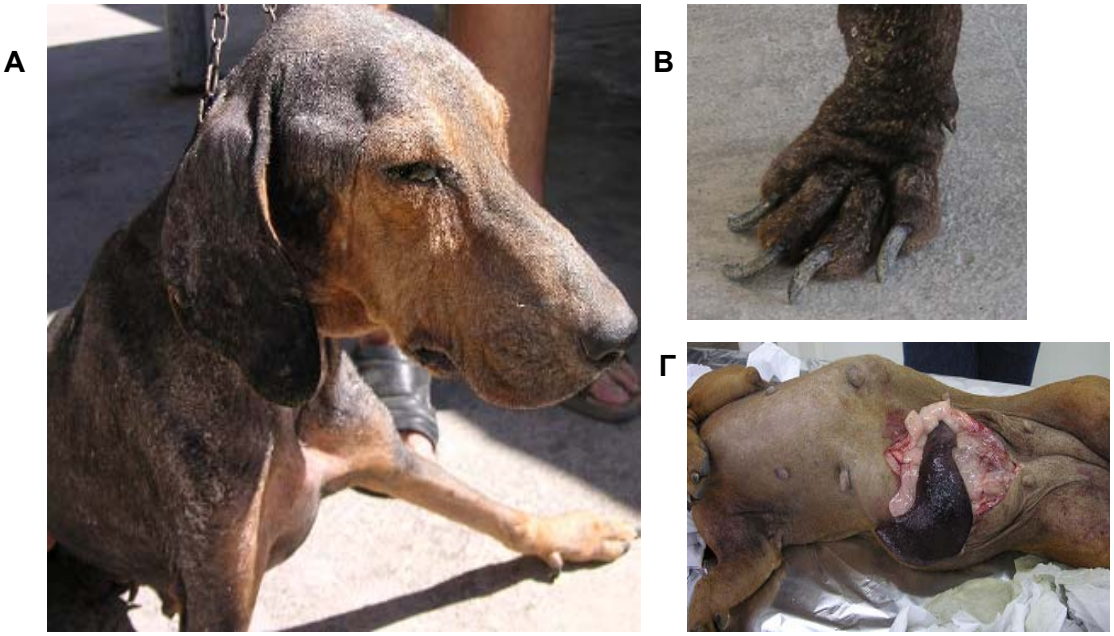
λεμφοκυττάρων, είναι γνωστό ότι οι IL-2, INF-γ, και TNF παράγονται σε πολύ μικρότερη ποσότητα, ενώ παράλληλα παρατηρείται δραματική μείωση των CD4+ λεμφοκυττάρων σε σύγκριση με τα ασυμπτωματικά ζώα (Pinelli *και συν.,* 1994, Bourdoiseau *και συν.*, 1997a, Bourdoiseau *και συν.,* 1997b, Cabral *και συν.,* 1998, Moreno *και συν.,* 1999, Pinelli *και συν.,* 1999). Η ανοσολογική απάντηση εξαρτάται, ή καλύτερα επηρεάζεται, από κληρονομικούς παράγοντες και ενδεχομένως από ουσίες που ενοφθαλμίζονται στο δέρμα από τις σκνίπες τη στιγμή της αιμομύζησης. Με τον τρόπο αυτό καθορίζεται αν η *L. infantum* θα εξουδετερωθεί, θα παραμείνει σε λανθάνουσα μορφή ή θα προκαλέσει κλινική νόσο σε κάποια στιγμή της ζωής του σκύλου (Ribeiro, 1989, Pinelli *και συν.,* 1999, Solano-Gallego *και συν.,* 2000, Day, 2005).

Στα συμπτωματικά ζώα η καταστολή της κυτταρικής ανοσίας επιτρέπει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του πρωτόζωου, ιδιαίτερα στα κύτταρα του συστήματος των μονοπύρηνων-μακροφάγων κυττάρων (Ferrer, 1992, Slappendel και Ferrer, 1998). Στα όργανα του λεμφοποιητικού συστήματος οι περιοχές των Τ-λεμφοκυττάρων υποπλάσσονται, σε αντίθεση με εκείνες των Β-λεμφοκυττάρων και των αντιγονοπαρουσιαστικών ιστιοκυττάρων και των μακροφάγων που υπερπλάσσονται, γεγονός που εξηγεί τη γενικευμένη λεμφογαγγλιομεγαλία και την ηπατοσπληνομεγαλία (Guarga *και συν.,* 2000). Μετά τη διασπορά της *L.infantum* στους περισσότερους ιστούς και όργανα προκαλείται κοκκιωματώδης φλεγμονή στην οποία ο αριθμός των παράσιτων ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό (Buracco *και συν.,* 1988, Engwerda και Kaye, 2000). Παράλληλα, η διέγερση της χημικής ανοσίας, με την παραγωγή κυρίως ειδικών IgG αντισωμάτων, οδηγεί στο σχηματισμό ανοσοσυμπλόκων που κυκλοφορούν στο αίμα και μπορούν να προκαλέσουν αγγειίτιδα, δερματίτιδα, σμηγματαδενίτιδα, πολυαρθρίτιδα, πολυμυΐτιδα, ραγοειδίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα κ.α. (Poli *και συν.*, 1991, Ferrer, 1992, Koutinas *και συν.,* 1993, Molleda *και συν.,* 1993, Koutinas *και συν.,* 1995, Slappendel και Ferrer, 1998, Vamvakidis *και συν.*, 2000). Το αίτιο για αυτές τις νοσολογικές οντότητες είναι η εναπόθεση των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλόκων στα αντίστοιχα όργανα-στόχους (Ferrer, 1992).

2-3-3. Κλινική εικόνα της λεϊσμανίασης στο σκύλο

Η ΛΣ είναι πολυσυστηματικό νόσημα που έχει χρόνια εξέλιξη και εκδηλώνεται με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων και κλινικών συνδρόμων. Τα μολυσμένα σκυλιά που τελικά νοσούν μπορεί να εμφανίσουν ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, σε διάφορους συνδυασμούς και βαθμό έντασης, ύστερα από περίοδο επώασης που διαρκεί από 3 μήνες μέχρι 7 χρόνια (Εικ. 12, Πίνακας 4) (Ciaramella *και συν.*, 1997, Slappendel και Ferrer, 1998, Koutinas *και συν.,* 1999). Η νόσος έχει παρατηρηθεί σε σκυλιά πολλών και διαφόρων φυλών, ανεξάρτητα από το φύλο ή την ηλικία, αλλά σπάνια σε ζώα κάτω των 6 μηνών, πιθανότατα εξαιτίας του μεγάλου χρόνου επώασης (Abranches *και συν.,* 1991b, Ferrer, 1992). Το παράσιτο έχει βρεθεί σε όλα τα όργανα και συστήματα του οργανισμού, ακόμα και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Ferrer *και συν.,* 1988b, Nieto *και συν.,* 1996, Slappendel και Ferrer, 1998, Cortese *και συν.*, 1999, Vinuelas *και συν.*, 2001).

Τα συχνότερα αίτια προσκόμισης στον κτηνίατρο σκυλιών με λεϊσμανίαση είναι η προοδευτική απώλεια σωματικού βάρους, παρά τη φυσιολογική ή αυξημένη όρεξη, η εύκολη κόπωση, η μείωση της όρεξης, οι αλλοιώσεις στο δέρμα και τους οφθαλμούς και η επίσταξη (Ciaramella *και συν.,* 1997, Koutinas *και συν.,* 1999). Τα προσβεβλημένα ζώα συνήθως εμφανίζουν κακή θρεπτική κατάσταση και όψη του τριχώματος καθώς και μυϊκή ατροφία, που είναι ιδιαίτερα εμφανής στους μασητήριους μυς (Ciaramella *και συν.,* 1997, Koutinas *και συν.,* 1999, Vamvakidis *και συν.,* 2000).



Εικόνα 12: Σκυλιά με συμπτώματα λεϊσμανίασης: (Α) καχεξία, ξηρή σμηγματόρροια, ατροφία κροταφιτών μυών, πυώδεις εκκρίσεις από τα μάτια, Β) υπέρμετρη ανάπτυξη και παραμόρφωση των νυχιών, (Γ) διόγκωση της σπλήνας.

Τέλος, μπορεί να εμφανιστεί, αν και σχετικά σπάνια, και η οξεία μορφή της νόσου που εκδηλώνεται με πυρετό και έντονη περιφερική λεμφαδενοπάθεια, όπως συμβαίνει στην οξεία μονοκυτταρική ερλιχίωση (*Ehrlichia canis*) και την πιροπλάσμωση (*Babesia canis*) με τις οποίες συγχέεται διαγνωστικά ή ενδέχεται να συνυπάρχει (Ciaramella *και συν.*, 1997, Koutinas *και συν.,* 1999, Mylonakis *και συν.*, 2003).

Η αντιλεϊσμανιακή θεραπεία τις περισσότερες φορές βελτιώνει σε μεγάλο βαθμό την κλινική εικόνα και περιορίζει ή αναστέλλει την εξέλιξη της νόσου. Επειδή όμως δεν επιτυγχάνεται μόνιμη παρασιτολογική ίαση, η διακοπή της θεραπείας αυτής συχνά προκαλεί αναζωπυρώσεις (Baneth *και συν.,* 2005).

Σύμπτωμα ή παθολογική κατάσταση	**Αναλογία εμφάνισης συμπτωμάτων σε σκυλιά με ΛΣ. %**
Περιφερική λεμφαδενοπάθεια	*65-96*
Δερματικές αλλοιώσεις	75-89
Εύκολη κόπωση	10-67
Απώλεια σωματικού βάρους	25-64
Κατάπτωση	8-60
Σπληνομεγαλία	9-53
Πολυουρία-πολυδιψία	4-40
Χωλότητα	1-37
Ανορεξία	16-36
Πυρετός	4-36
Οφθαλμικές αλλοιώσεις	16-32
Πολυφαγία	15-30
Έμετοι-διάρροια	4-30
Ατροφία των μασητήριων μυών	24
Επίσταξη	6-15
Ελκώδης στοματίτιδα	6
Ασκίτης-υποδόρια οιδήματα	2

Πίνακας 4: Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις της λεϊσμανίασης στα σκυλιά σε φθίνουσα συχνότητα (Slappedel, 1988, Ciaramella *και συν.*, 1997, Koutinas *και συν.*,1999).

2-3-4. Αιματολογικές και βιοχημικές διαταραχές της λεϊσμανίασης στο σκύλο

Το συχνότερο εργαστηριακό εύρημα στη ΛΣ είναι η πολυκλωνική και αρκετά σπανιότερα η μονοκλωνική β και γ υπερσφαιριναιμία που συνήθως συνοδεύεται από υπολευκωματιναιμία εξαιτίας της απώλειας λευκωματινών με τα ούρα (σπειραματονεφρίτιδα), της προσβολής του ήπατος ή/και της μειωμένης όρεξης (Groulade και Person, 1987, Slappendel, 1988, Ciaramella *και συν.*, 1997, Koutinas *και συν.*, 1999).

Η συχνά παρατηρούμενη ορθόχρωμη-ορθοκυτταρική αναιμία, που δεν είναι αναγεννητική (Slappendel, 1988, Ciaramella *και συν.*, 1997, Koutinas *και συν.*, 1999)

πιθανότατα οφείλεται στη χρόνια φλεγμονή, τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, την απώλεια αίματος (επίσταξη, αιμορραγίες από τον πεπτικό σωλήνα) και πολύ σπανιότερα στη μυελοκαταστολή (Ferrer, 1992, Koutinas *και συν.*, 1999, Lobetti, 2002). Στην παθογένειά της είναι πιθανό να υπεισέρχονται και ανοσολογικοί μηχανισμοί αφού σε μεγάλο αριθμό περιστατικών ανιχνεύτηκαν αντιπυρηνικά αντισώματα στο αίμα και η δοκιμή Coombs ήταν θετική (Slappendel, 1988, Koutinas *και συν.*, 1993, Koutinas *και συν.*, 1999).

Η θρομβοκυτταροπενία, που διαπιστώνεται σε αρκετά περιστατικά, πιθανότατα οφείλεται στα κυκλοφορούντα ανοσοσύμπλοκα, τα αντιαιμοπεταλιακά αντισώματα, τον εγκλωβισμό των αιμοπεταλίων στο σπλήνα ή ενδεχομένως την μυελοκαταστολή (Slappendel και Ferrer, 1998). Σπανιότερα δε μπορεί να εμφανιστεί λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία (Ciaramella *και συν.*, 1997, Slappendel και Ferrer, 1998).

Η σπειραματική πρωτεϊνουρία, που είναι συχνό εύρημα της ανάλυσης των ούρων προέρχεται από τη σπειραματονεφρίτιδα. Στα ζώα αυτά, η αύξηση της συγκέντρωσης των μη πρωτεϊνικών αζωτούχων ουσιών στο αίμα, οι ηλεκτρολυτικές διαταραχές και το χαμηλό ειδικό βάρος των ούρων υποδηλώνουν την εγκατάσταση χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (Ciaramella *και συν.,* 1997, Slappendel και Ferrer, 1998, Koutinas *και συν.*, 1999). Αντίθετα, αύξηση της δραστηριότητας των ηπατικών ενζύμων στον ορό του αίματος παρατηρείται σπανιότερα (Ciaramella *και συν.,* 1997) (Πίνακας 5).

Εργαστηριακό εύρημα	**Αναλογία εμφάνισης συμπτωμάτων σε σκυλιά με ΛΣ. %**
Υπερσφαιριναιμία	100
Μη αναγεννητική αναιμία	60-94,2
Υπολευκωματιναιμία	68-94
Πρωτεϊνουρία	67,7-85
Θετική δοκιμή Coombs	10-84
Αυξημένη δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων	16-61
Θρομβοκυτταροπενία	29,3-50
Αυξημένος τίτλος των αντιπυρηνικών αντισωμάτων στο αίμα (ANA Test)	31-47
Αζωθαιμία	16-45
Λευκοκυττάρωση	8-24
Λευκοπενία	5,7-22

Πίνακας 5: Οι κυριότερες αιματολογικές και βιοχημικές διαταραχές στη λεϊσμανίαση στα σκυλιά σε φθίνουσα συχνότητα (Slappendel, 1988, Ciaramella *και συν.,* 1997, Slappendel και Ferrer, 1998, Koutinas *και συν.*, 1999).

2-4. Η λεϊσμανίαση στη Μεσόγειο και στην Ευρώπη

Ιστορικά, αλλοιώσεις που έμοιαζαν με ΔΛ είναι γνωστές στη λεκάνη της Μεσογείου από το 2000 π.Χ. στην Αίγυπτο (Oumeish, 1999) και στην Ασσυρία από το 650 π.Χ. (Bray και Alexander,1987). Καταγράφηκαν δε και σε άλλες περιοχές, στην Κρήτη και την Αλγερία, κατά τη διάρκεια του 18^{ου} αιώνα (Bray και Alexander, 1987). Πρόσφατα βρέθηκαν μαρτυρίες για ΣΛ στις αρχαίες Αιγυπτιακές μούμιες από την περίοδο του μέσου βασιλείου (2050- 1650 π.Χ.) (Zink *και συν.,* 2006).

Σήμερα οι δύο μορφές της ασθένειας (ΣΛ, ΔΛ) είναι ενδημικές στις χώρες της Μεσογείου και βασικά οφείλονται σε τρία είδη του παράσιτου *Leishmania*: τη *L. infantum* (ζωονοτική ΣΛ και ΔΛ), τη *L. tropica* (ανθρωπονοτική και ζωονοτική ΔΛ) και τη *L. major* (ζωονοτική ΔΛ) (Schönian *και συν.,* 2008). Τα σκυλιά (κατοικίδια, αδέσποτα και άγρια κυνοειδή) αποτελούν την κύρια αποθήκη/δεξαμενή του είδους *L. infantum,* του μόνου σπλαχνοτροπικού είδους που ενδημεί στην Ευρώπη. Το δε ποσοστό των περιστατικών λεϊσμανίασης στα σκυλιά είναι αρκετά ψηλό (μέχρι και 30%) σε όλες τις Ευρωπαϊκές Μεσογειακές χώρες (Sideris *και συν.,* 1999, Moreno και Alvar, 2002).

Η λεϊσμανίαση εξαπλώνεται γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου, όπως και σε άλλα μέρη του κόσμου, εξαιτίας τριών κύριων παραγόντων κινδύνου που είναι: α) οι κλιματολογικές αλλαγές, β) η ανοσοκαταστολή στον άνθρωπο, και γ) η αποτυχία στη θεραπεία (Dujardin, 2006). Στην Ευρώπη η επιδημιολογία της λεϊσμανίασης μεταβάλλεται ραγδαία, τα κρούσματα αυξάνονται και η νόσος εξαπλώνεται προς Βορρά στις ενδημικές χώρες όπως την Ιταλία (Gradoni *και συν.,* 2003, Gramiccia και Gradoni, 2005, Ferroglio *και συν.,* 2006). Επίσης εμφανίζεται ηλικιακή μετατόπιση των περιστατικών, από τα παιδιά στους ενήλικες (WHO, 2002) γεγονός που εν μέρει οφείλεται στην ύπαρξη συν-λοιμώξεων Leishmania/HIV στη νότιο Ευρώπη, όπου έως και το 9% των ασθενών με AIDS αναπτύσσει ΣΛ (WHO, 2002, Desjeux και Alvar, 2003).

Στη Μεσόγειο η μετάδοση της λεϊσμανίασης πέρα από τον κλασσικό τρόπο μετάδοσης της νόσου, μέσω των σκνιπών του γένους *Phlebotomous* και υπογένους *Laroussius* (Killick- Kendrick, 1999) μπορεί να γίνει και με ένα νέο ανθρωπονοτικού τύπου κύκλο, μέσω της χρήσης κοινής σύριγγας (η βελόνα αντικαθιστά το τσίμπημα

της σκνίπας) μεταξύ ατόμων που κάνουν ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών (Cruz *και συν.,* 2002).

Περίπου 4,700 περιπτώσεις κρουσμάτων λεϊσμανίασης έχουν καταγραφεί στην Ευρώπη την περίοδο 1996 - 2005, με τον μεγαλύτερο αριθμό να έχει παρουσιαστεί στην Ιταλία (1,677), στην Αλβανία (1,148) και στην Ισπανία (945). Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι σε ορισμένες χώρες, όπως για παράδειγμα στη Γαλλία, η λεϊσμανίαση έγινε υποχρεωτικής δήλωσης νόσημα μόλις πρόσφατα. Περαιτέρω η νόσος είναι συχνά ανεπαρκώς καταγεγραμμένη ακόμα και σε χώρες που είναι υποχρεωτικής δήλωσης (Takken και Knols, 2007). Ειδικότερα η ανεπαρκής καταγραφή παρουσιάζεται στη ΔΛ, όπου ο ασθενής δεν χρειάζεται να μείνει για θεραπεία στα νοσοκομεία αλλά θεραπεύεται σε ιδιωτικές δερματολογικές κλινικές (Velo *και συν.,* 2003).

Υπάρχουν χώρες στις οποίες δηλώθηκαν περιστατικά κατά το παρελθόν, όμως η παρούσα επιδημιολογική κατάσταση δεν είναι διευκρινισμένη, όπως για παράδειγμα στη Σερβία και τη Σλοβενία. Επίσης στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη διαγνώστηκαν αρκετά περιστατικά εισαγόμενων λεϊσμανιάσεων που δεν αποτελούσαν περιστατικά ενδημικής μόλυνσης. Τα περισσότερα από αυτά τα περιστατικά αφορούσαν ασθενείς που πέρασαν τις διακοπές του καλοκαιριού σε ενδημικές στην νόσο Ευρωπαϊκές χώρες. Κατά τη διάρκεια της πιο πάνω περιόδου, καταγράφηκαν 80 περιπτώσεις λεϊσμανίασης στην Αγγλία, 16 στην Τσεχία, 12 στο Βέλγιο και 3 στη Φινλανδία (Takken και Knols, 2007).

Από τα περιστατικά λεϊσμανίασης που καταγράφηκαν στην Ευρώπη, ένα μεγάλο ποσοστό αφορούσε παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε ετών (30% στη Νότιο Γαλλία έως και 60% στην Αλβανία) (Takken και Knols, 2007). Γενικά, όσο ψηλότερο είναι το βιοτικό επίπεδο των κατοίκων μιας ενδημικής περιοχής τόσο λιγότερα είναι τα κρούσματα στα παιδιά, γεγονός που μαρτυρά τη σημασία της καλής διατροφής μέσω της επίδρασης που έχει στο ανοσοποιητικό σύστημα (Takken και Knols, 2007).

Στους ανοσοϊκανούς ασθενείς το ζυμόδεμα του παράσιτου που απομονώνεται συνήθως είναι το *L. infantum* MON-1. Όμως σε μερικές γεωγραφικές περιοχές απομονώθηκαν και άλλα ζυμοδέματα όπως το MON-72 στην περιοχή της Campania της Ιταλίας (Gramiccia *και συν.,* 1992), το MON-77 στην Καταλονία της Ισπανίας (Gallego *και συν.,* 2001) και το MON-98 στην Ελλάδα (Antoniou *και συν.,* 2004).

2-5. Η λεϊσμανίαση στην Κύπρο

Η λεϊσμανίαση στο παρελθόν ήταν ευρέως διαδεδομένη στην Κύπρο, στα σκυλιά, στις παράκτιες περιοχές του νησιού (Adler, 1945, Steele JH *και συν.,* 1976). Το πρώτο ανθρώπινο κρούσμα ΣΛ αναφέρθηκε το 1935. Το 1985 και το 1987 εμφανίστηκαν δύο κρούσματα ΣΛ σε παιδιά (Minter και Eitrem, 1989) ενώ το 1990 καταγράφηκαν σποραδικές περιπτώσεις κρουσμάτων ΔΛ σε κατοίκους των χωριών που βρίσκονται στους πρόποδες των βουνών της Κερύνειας (Desjeux, 1991).

Η νόσος σχεδόν εξαφανίστηκε λόγω της μείωσης του αριθμού των Φλεβοτόμων κατά την διάρκεια της εκστρατείας για τον έλεγχο της ελονοσίας το 1940-1950 (Constantinou, 1998) και της ελάττωσης του πληθυσμού των σκυλιών στο νησί από 46,000 σε 6,000 κατά την προσπάθεια ελέγχου της Εχινοκοκκίασης το 1970-1975 (Polydorou, 1984). Οι ενέργειες αυτές είχαν σαν αποτέλεσμα να παραμείνουν ελεύθερες από τη νόσο οι περιοχές που ελέγχονται από την Κυπριακή Δημοκρατία για πάνω από 20 χρόνια (Deplazes *και συν.,* 1998, Leger *και συν.,* 2000, Leger και Depaquit, 2008). Η Κύπρος κατέστη μια λανθάνουσα εστία λεϊσμανίασης η οποία όμως τώρα επανενεργοποιείται λόγω της ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού των σκυλιών (100,000) και των Φλεβοτόμων. Σαν επακόλουθο, το 1996 καταγράφηκαν ξανά κρούσματα στα σκυλιά στις παράκτιες περιοχές με μολυσματικό παράγοντα την *L. infantum* MON-1 (Deplazes *και συν.,* 1998, Leger *και συν.,* 2000). Παρά τα ψηλά ποσοστά κρουσμάτων στα σκυλιά που καταγράφηκαν, (Adler, 1945, Minter και Eitrem, 1989, Leger *και συν.,* 2000) δεν διενεργήθηκε στο παρελθόν καμία έρευνα σχετικά με την λεϊσμανίαση του ανθρώπου και μόνο δύο ανθρώπινα κρούσματα είναι γνωστά από το 1935 (Minter και Eitrem, 1989, Deplazes *και συν.,* 1998).

Όσον αφορά στο έντομο διαβιβαστή του παράσιτου, τα κυριότερα είδη που έχουν αναφερθεί στην Κύπρο είναι: *Phlebotomus tobbi, P. papatasi, P. sergenti, P. galilaeus, P. alexandri, P. mascitti, P. jacusieli, P. economidesi, Sergentomyia fallax, S. minuta, S. azizi* (Adler, 1945, Minter και Eitrem, 1989, Eresh, 1990, Leger *και συν.,* 2000) ενώ ο κύριος διαβιβαστής της *L. infantum* στην Κύπρο πιστεύεται ότι είναι ο *P. tobbi* (Leger *και συν.,*2000).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1-1. Περιοχή μελέτης

Οι ελεύθερες περιοχές της Κύπρου, που αποτελούν το νότιο τμήμα του νησιού και καλύπτουν έκταση 5,896 τετραγωνικών χιλιόμετρων, χωρίστηκαν σε χάρτη σε 82 ίσα τετράγωνα. Στο κάθε τετράγωνο δόθηκε αριθμός 1-82 και με κλήρωση επιλέχθηκαν τυχαία τα 30 τετράγωνα (Χάρτης 1). Μια περιοχή-τετράγωνο μπορούσε να περιλαμβάνει 1,2,3 ή και περισσότερα χωριά ή πόλεις. Από αυτά επιλέχθηκαν, με κλήρωση, τα χωριά στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες στα σκυλιά και η επιλογή των χωριών ήταν ανάλογη του πληθυσμού των σκυλιών, έτσι ώστε να περιλαμβάνει τουλάχιστο 200 σκυλιά ανά τετράγωνο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11).

Χάρτης 1: Χάρτης της Κύπρου. Χωρίστηκε σε 82 ίσα τετράγωνα στα οποία δόθηκαν αριθμοί 1-82 και επιλέγηκαν με κλήρωση 30 τετράγωνα που αποτέλεσαν τις περιοχές μελέτης.

1-2. Ενημέρωση για τους στόχους της μελέτης

Οι δύο εμπλεκόμενες Υπηρεσίες (Κτηνιατρικές Υπηρεσίες του Υπουργείου Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος και οι Ιατρικές Υπηρεσίες και Υπηρεσίες Δημόσιας Υγείας του Υπουργείου Υγείας) ενημερώθηκαν προφορικά και γραπτά **για τους στόχους της μελέτης** και με τη βοήθειά τους δημιουργήθηκε δίκτυο συνεργασίας με ιατρούς και κτηνίατρους, για ανταλλαγή πληροφοριών σχετικά με κρούσματα λεϊσμανίασης σε ανθρώπους και σκυλιά. Μέσα από ενημερωτικές ημερίδες (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 15) που διοργανώθηκαν για το σκοπό αυτό, έγινε κατορθωτή η ενημέρωση των γιατρών και των κτηνίατρων του ιδιωτικού και του δημόσιου τομέα: α) για τη λεϊσμανίαση, β) για τους στόχους της έρευνας και γ) για τις διαδικασίες που πρέπει να ακολουθούνται κατά τις δειγματοληψίες και την αποστολή των δειγμάτων στο Εργαστήριο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4). Επιπλέον για ενημέρωση και ευαισθητοποίηση του κοινού για την ασθένεια, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα σκυλιά, δημοσιεύτηκαν στον ημερήσιο τύπο της Κύπρου και σε περιοδικά ευρείας κυκλοφορίας άρθρα με περιεχόμενο σχετικό με τη νόσο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 14). Παράλληλα, για τον ίδιο σκοπό, έγιναν ζωντανές και μαγνητοσκοπημένες τηλεοπτικές και ραδιοφωνικές συνεντεύξεις.

1-3. Δείγματα από σκυλιά

Κατά την διάρκεια των ετών 2005-2006, ελήφθησαν συνολικά 900 δείγματα από σκυλιά (379 αρσενικά και 521 θηλυκά, 719 κυνηγετικά, 87 φύλακες, 94 συντροφιάς) που ζούσαν στα 30 τετράγωνα (30 σκυλιά ανά τετράγωνο). Τα σκυλιά που θα λάμβαναν μέρος στη μελέτη επιλέγηκαν τυχαία μετά από κλήρωση στην οποία συμπεριλήφθηκαν τα νοικοκυριά από τα χωριά των 30 τετραγώνων. Η προσέγγιση των ιδιοκτητών των σκυλιών έγινε με τη βοήθεια κρατικών και ιδιωτών κτηνιάτρων. Οι ιδιοκτήτες των ζώων ενημερώθηκαν για τη λεϊσμανίαση και ζητήθηκε η άδειά τους για να συμμετάσχουν τα ζώα τους στην έρευνα. Κανείς δεν αρνήθηκε να πάρει μέρος στην έρευνα. Τα σκυλιά εξετάστηκαν κλινικά και ελήφθησαν δείγματα περιφερικού αίματος (900 δείγματα) και πολφός λεμφογαγγλοίων στις περιπτώσεις που διαπιστώθηκε διόγκωση των λεμφαδένων (22 δείγματα). Για κάθε σκύλο συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο με όλα τα προσωπικά, επιδημιολογικά και κλινικά του στοιχεία (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1). Επιπρόσθετα εξετάστηκαν 2056 δείγματα ορών αίματος από σκυλιά από όλες τις ελεύθερες περιοχές της Κύπρου, που ελήφθησαν

από ιδιώτες κτηνίατρους από ζώα με ύποπτα για λεϊσμανίαση κλινικά συμπτώματα (περιφερική λεμφαδενοπάθεια, δερματικές αλλοιώσεις, εύκολη κόπωση, απώλεια σωματικού βάρους, οφθαλμικές αλλοιώσεις) αλλά και για σκοπούς ελέγχου ρουτίνας των ζώων.

Η ζήτηση από τους ιδιοκτήτες των σκυλιών για εξέταση για λεϊσμανίαση ήταν μεγάλη μετά την ευαισθητοποίηση του πληθυσμού που ακολούθησε την ενημέρωση για τη νόσο μέσω των ΜΜΕ.

1-4. Δείγματα από ανθρώπους

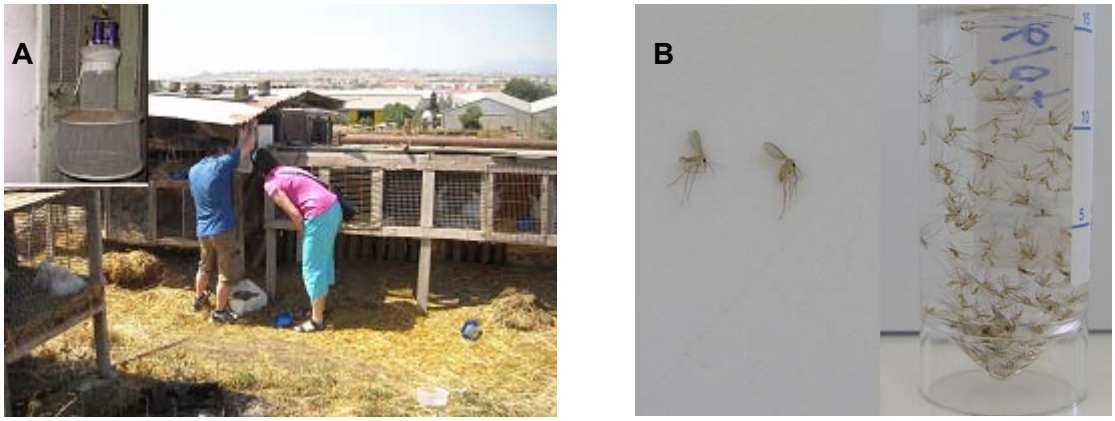
Μετά την οροεπιδημιολογική έρευνα στα σκυλιά επιλέγηκαν δύο τετράγωνα με ψηλά ποσοστά οροθετικότητας, 25% και 29% αντίστοιχα (μεγαλύτερος κίνδυνος για τους ανθρώπους) και ένα τετράγωνο με μηδενικό ποσοστό (μικρός κίνδυνος) για να πραγματοποιηθεί η επιδημιολογική μελέτη στον ανθρώπινο πληθυσμό (Χάρτης 2). Τα τετράγωνα επιλέγηκαν έτσι ώστε να βρίσκονται κοντά σε νοσοκομεία. Με την συνεργασία των Ιατρικών Υπηρεσιών και των Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας του Υπουργείου Υγείας, γιατροί από τα τοπικά νοσοκομεία έλαβαν δείγματα από άτομα που κατοικούσαν μόνιμα σε αυτά τα τρία τετράγωνα (200 άτομα ανά τετράγωνο: ανεξάρτητα εθνικότητας, ηλικίας ή κατάστασης υγείας) που επισκέφτηκαν τα τοπικά ιατρικά κέντρα για οποιονδήποτε λόγο. Η επιλογή των ατόμων έγινε τυχαία. Τα άτομα ενημερώθηκαν από τους ιατρούς για τη λεϊσμανίαση και τους σκοπούς της μελέτης και τους ζητήθηκε να λάβουν μέρος. Όσοι συμφώνησαν συμπλήρωσαν ερωτηματολόγιο με όλα τα επιδημιολογικά και κλινικά τους στοιχεία με τη βοήθεια του ιατρικού προσωπικού (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3) και υπέγραψαν σχετικό έγγραφο. Οι γιατροί στη συνέχεια έλαβαν δείγματα αίματος με κωδικό ο οποίος αντιστοιχούσε στον κωδικό του ερωτηματολογίου, ώστε η εξέταση του αίματος να είναι ανώνυμη. Τα άτομα από τα οποία ελήφθησαν δείγματα αίματος ήταν ηλικίας από 10 έως 88 ετών με μέσο όρο τα 52,7 έτη. Επιπρόσθετα, δείγματα αίματος (35 δείγματα), δείγματα ιστού δέρματος (4) και δείγματα μυελού των οστών (4) στάλθηκαν από 3 Νοσοκομεία από διαφορετικές πόλεις της χώρας, άσχετα με τις περιοχές δειγματοληψίας, και αφορούσαν σε 35 ασθενείς με ύποπτα για λεϊσμανίαση κλινικά συμπτώματα (ψηλός παρατεινόμενος και επιμένων πυρετός ή δερματικές αλλοιώσεις χωρίς τάση για ίαση).

Χάρτης 2: Επιλογή των 3 περιοχών (σε κίτρινο κύκλο) για τον έλεγχο του ανθρώπινου πληθυσμού για λεϊσμανίαση με βάση τα αποτελέσματα της έρευνας στα σκυλιά.

1-5. Φλεβοτόμοι- σκνίπες, διαβιβαστές της νόσου

Πραγματοποιήθηκε σύλληψη Φλεβοτόμων στο διάστημα Μαΐου-Οκτωβρίου 2006. Οι Φλεβοτόμοι παγιδεύτηκαν ζωντανοί με τη χρήση CDC φωτεινών παγίδων (Hausherr's Machine Works in Tom's River, New Jersey). Οι παγίδες αυτές περιλαμβάνουν μια φωτεινή πηγή, ανεμιστηράκι και υφασμάτινο χώρο όπου εγκλωβίζονται τα έντομα. Οι παγίδες τοποθετήθηκαν σε 20 χωριά με ή χωρίς ανθρώπινα περιστατικά, με ή χωρίς περιστατικά στα σκυλιά: 10/20 χωριά περιλαμβάνονταν στα τρία τετράγωνα για τον έλεγχο του ανθρώπινου πληθυσμού για λεϊσμανίαση και ανήκαν στις επαρχίες Πάφου με 25% οροθετικότητα στα σκυλιά, Λεμεσού με 28,6% και Αμμοχώστου με 0%. Τα άλλα 10 ήταν χωριά με: ανθρώπινο κρούσμα κοντά στην Λευκωσία, με ή χωρίς οροθετικά σκυλιά κυρίως από την επαρχία Λευκωσίας. Οι παγίδες τοποθετήθηκαν και λειτούργησαν για ένα ή περισσότερα βράδια, κοντά σε καταφύγια ζώων με ή χωρίς ανθρώπινα περιστατικά

και με ή χωρίς περιστατικά στα σκυλιά (αν υπήρχαν τέτοια στο χωριό), από το σούρουπο έως και νωρίς το πρωί (Εικ. 13). Η συλλογή των παγιδευμένων Φλεβοτόμων γινόταν νωρίς το πρωί και αυτοί φυλάσσονταν σε ειδικά δοχεία με ή χωρίς αιθανόλη (70%). Η ταυτοποίηση των Φλεβοτόμων έγινε με βάση τις κλείδες μορφολογίας. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια απομόνωσης του παράσιτου από το έντερο των Φλεβοτόμων.



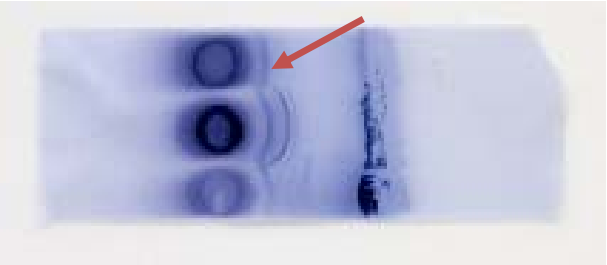
Εικόνα 13: (Α) Σύλληψη Φλεβοτόμων με παγίδες CDC κοντά σε κλουβιά κουνελιών, (Β) Φλεβοτόμοι που συνελέγησαν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

1-6. Ορολογικές εξετάσεις

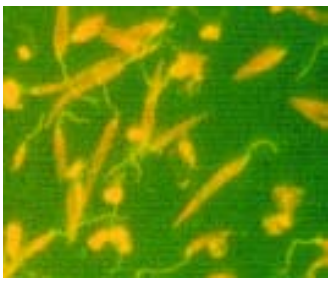
Τα 900 δείγματα ορών αίματος από τα σκυλιά και τα 635 δείγματα ορών αίματος από τους ανθρώπους εξετάστηκαν με την τεχνική της ELISA (*L. infantum* promastigote soluble antigens, Bordier Affinity Products SA, Swizerland) για παρουσία IgG αντισωμάτων έναντι της Λεϊσμάνια (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5, Εικ. 15). Τα ποσοστά οροθετικότητας υπολογίστηκαν αποκλειστικά με βάση τα αποτελέσματα της ELISA (cut off: 0,318 OD: ο μέσος όρος cut off του ασθενώς θετικού μάρτυρα, που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις δοκιμές που εκτελέστηκαν, σύμφωνα με τον κατασκευαστή) ούτως ώστε να είναι συγκρίσιμα με προηγούμενες μελέτες στην Κύπρο (Deplazes *και συν.*, 1998). Όλα τα θετικά δείγματα εξετάστηκαν περαιτέρω με την τεχνική: α) του Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (IFAT) όπου χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα anti-human ή anti-dog anti- IgG αντίστοιχα (VMRD, Inc. USA) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6, Εικ. 14Β). Για την εκτέλεση της τεχνικής ετοιμάστηκαν σειρές με υποδιπλάσιες αραιώσεις των υπό εξέταση ορών, ξεκινώντας από την αραίωση 1/50

και όριο θετικότητας τον τίτλο ≥1/200. β) της ηλεκτροσυναίρεσης (ES) που αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη ορολογική δοκιμασία η οποία μπορεί να προσδιορίσει οξεία λοίμωξη με την ανίχνευση του ειδικού τόξου 4-24 για τη *Leishmania* (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7, Εικ. 14Α). Τα επιπλέον 2056 δείγματα ορών αίματος σκυλιών, εξετάστηκαν μόνο με την τεχνική της ELISA. Κατά την εκτέλεση κάθε εξέτασης, και για τις τρεις τεχνικές, συμπεριλήφθηκαν θετικοί μάρτυρες (από σκυλιά με αποδεδειγμένη παρασιτολογικά μόλυνση με λεϊσμανίαση) και αρνητικοί μάρτυρες (από αρνητικά σκυλιά που ζούσαν σε περιοχές χωρίς κανένα κρούσμα λεϊσμανίασης, σε μεγάλο υψόμετρο).

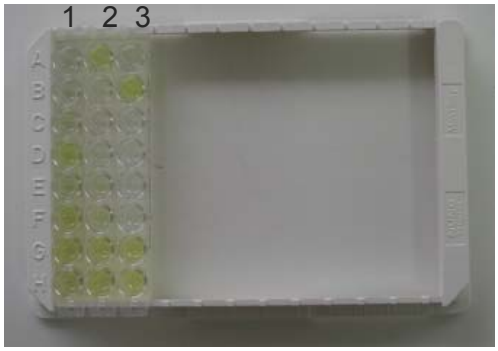
A



B



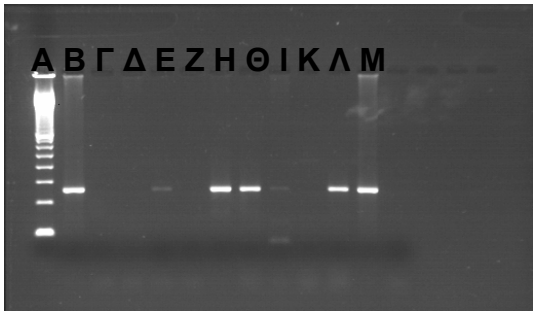
Εικόνα 14: (Α) Θετικό δείγμα με την τεχνική της ηλεκτροσυναίρεσης (ES) που αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη ορολογική δοκιμασία η οποία μπορεί να προσδιορίσει οξεία λοίμωξη με την ανίχνευση του ειδικού τόξου 4-24 για τη *Leishmania* και (Β) Λεϊσμάνιες σε θετικό δείγμα, με Έμμεσο Ανοσοφθορισμό.



Εικόνα 15: Αποτέλεσματα ELISA σε δείγματα αίματος σκυλιών. A1 Blank, B1 αρνητικός μάρτυρας, C1 ασθενώς θετικός μάρτυρας, D1 θετικός μάρτυρας, F3 εσωτερικός αρνητικός μάρτυρας, G3 εσωτερικός θετικός μάρτυρας. E1-A2, G2, H2, B3, H3 θετικά σκυλιά. B2-F2, A3, C3-E3 αρνητικά σκυλιά.

1-7. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8, Εικ. 16) εφαρμόστηκε για την εξέταση των 35 δειγμάτων περιφερικού αίματος, δέρματος και/ή μυελού των οστών από ανθρώπους και για την εξέταση περιφερικού αίματος, πολφού λεμφογαγγλοίων και βιοψίας σπλήνας και από τα 900 τυχαία δείγματα από σκυλιά, ανάλογα με την διαθεσιμότητα του δείγματος. Για την εξαγωγή του DNA από τα δείγματα αίματος και ιστών, χρησιμοποιήθηκε το QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN) και DNeasy Tissue kit (QIAGEN) αντίστοιχα και για τον πολλαπλασιασμό του DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές T2 και B4 (Minodier *και συν.,* 1997).

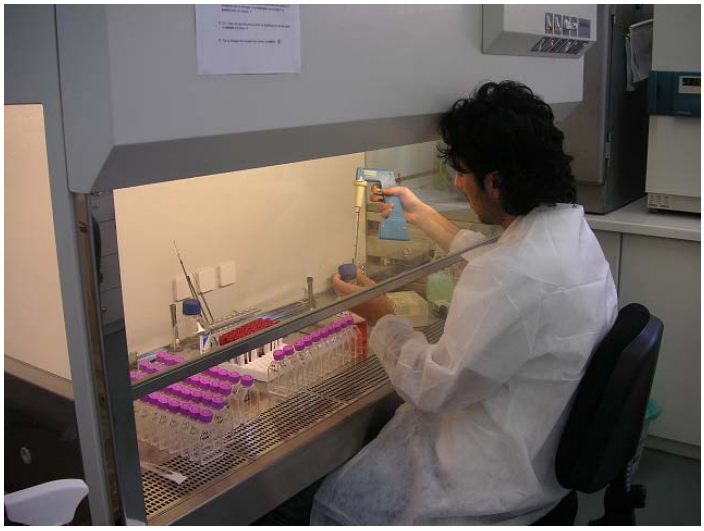


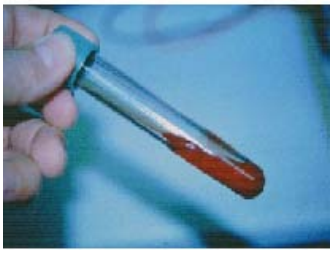
Εικόνα 16: Αποτέλεσματα PCR σε δείγματα αίματος σκυλιών και ανθρώπων. Α (lader 100 bp). Β θετικός μάρτυρας (καλλιέργεια Λεϊσμάνιας). Γ, Δ αρνητικά δείγματα από ανθρώπους. Ζ, Κ αρνητικά δείγματα από σκυλιά Ε, Η, Θ, Ι, Λ, Μ θετικά δείγματα από σκυλιά.

1-8. Απομόνωση του παράσιτου και ταυτοποίηση

Έγιναν προσπάθειες για την απομόνωση του παράσιτου (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9, Εικ. 17) από τα βιολογικά δείγματα που προήλθαν από τους 35 ασθενείς και τα 900 σκυλιά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο καλλιεργητικά υλικά: το διφασικό καλλιεργητικό υλικό NNN (Novy- MacNeal- Nicolle, Ozbilgin *και συν.,* 1995) και το RPMI 1640 (World Health Organization, 1991, Lightner *και συν.,* 1983, Lemesre *και συν.,* 1988). Τα στελέχη που απομονώθηκαν τυποποιήθηκαν με δύο μεθόδους: α) την Πολυεστιακή Ισοενζυμική Ηλεκτροφόρηση με τη χρήση 15 ενζυματικών συστημάτων (Rioux *και συν.*, 1990) και β) τη χρήση του γονιδιακού δείκτη *K26* (*K26-*

PCR based assay) ο οποίος διαχωρίζει είδη/υποείδη του συμπλέγματος *L. donovani*, βάσει του μεγέθους του *K26*-αλληλόμορφου (Haralambous *και συν.,* 2008).





Εικόνα 17: Καλλιέργεια του παράσιτου στα καλλιεργητικά υλικά RPMI 1640 και NNN (Novy- MacNeal- Nicolle).

1-9. Δημιουργία τράπεζας στελεχών.

Από τις απομονώσεις και την καλλιέργεια των στελεχών από ασθενείς και σκυλιά, δημιουργήθηκε τράπεζα στελεχών η οποία θα χρησιμεύσει για περαιτέρω μελέτες, όπως για παράδειγμα για μελέτη της αντοχής του κάθε στελέχους στα φάρμακα και για τη δημιουργία συνεργασιών με εργαστήρια που εργάζονται στο θέμα αυτό. Ήδη έχει ζητηθεί τέτοια συνεργασία από εργαστήρια του εξωτερικού.

1-10. Στατιστική ανάλυση και χαρτογράφηση των αποτελεσμάτων

Η οροθετικότητα στα σκυλιά υπολογίστηκε για κάθε ένα από τα 30 τετράγωνα και για κάθε μία από τις 5 επαρχίες και η χαρτογράφηση έγινε με την χρήση του λογισμικού συστήματος γεωγραφικής πληροφόρησης (GIS, ArcGIS 9.2). Τα διαστήματα εμπιστοσύνης για τις αναλογίες εκτιμήθηκαν με τη χρήση της κανονικής προσέγγισης σε τυχαίες κατανομές ή στα κατάλληλα ακριβή όρια (Neave, 1978). Η πιθανή σχέση μεταξύ οροθετικότητας των σκυλιών και εννέα πιθανών παραγόντων κινδύνου εκτιμήθηκαν αρχικά με την χρήση μονομεταβλητών (univariate) λογιστικών

μοντέλων οπισθοδρόμισης (wald test). Οι παράγοντες κινδύνου που λήφθηκαν υπόψη ήταν οι εξής: η γεωγραφική προέλευση, η εποχή δειγματοληψίας, η χρήση των σκυλιών, το φύλο, η ηλικία, το βάρος, το χρώμα του τριχώματος, το μήκος του τριχώματος, και η παρουσία τριών το λιγότερο από τα ακόλουθα συμπτώματα λεϊσμανίασης (διόγκωση των λεμφαδένων, αλωπεκία, παραμόρφωση των νυχιών, επίσταξη, οφθαλμικές αλλοιώσεις, σπληνομεγαλία). Ακολούθως προσαρμόστηκε ένα πολυμεταβλητό λογιστικό μοντέλο οπισθοδρόμισης που περιέλαβε και τους εννέα παράγοντες κινδύνου και επιλέγηκαν διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη του τελικού μοντέλου πρόβλεψης. Το ποσοστό σημασίας καθορίστηκε στο 5% και χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 15 του στατιστικού πακέτου «SPSS».

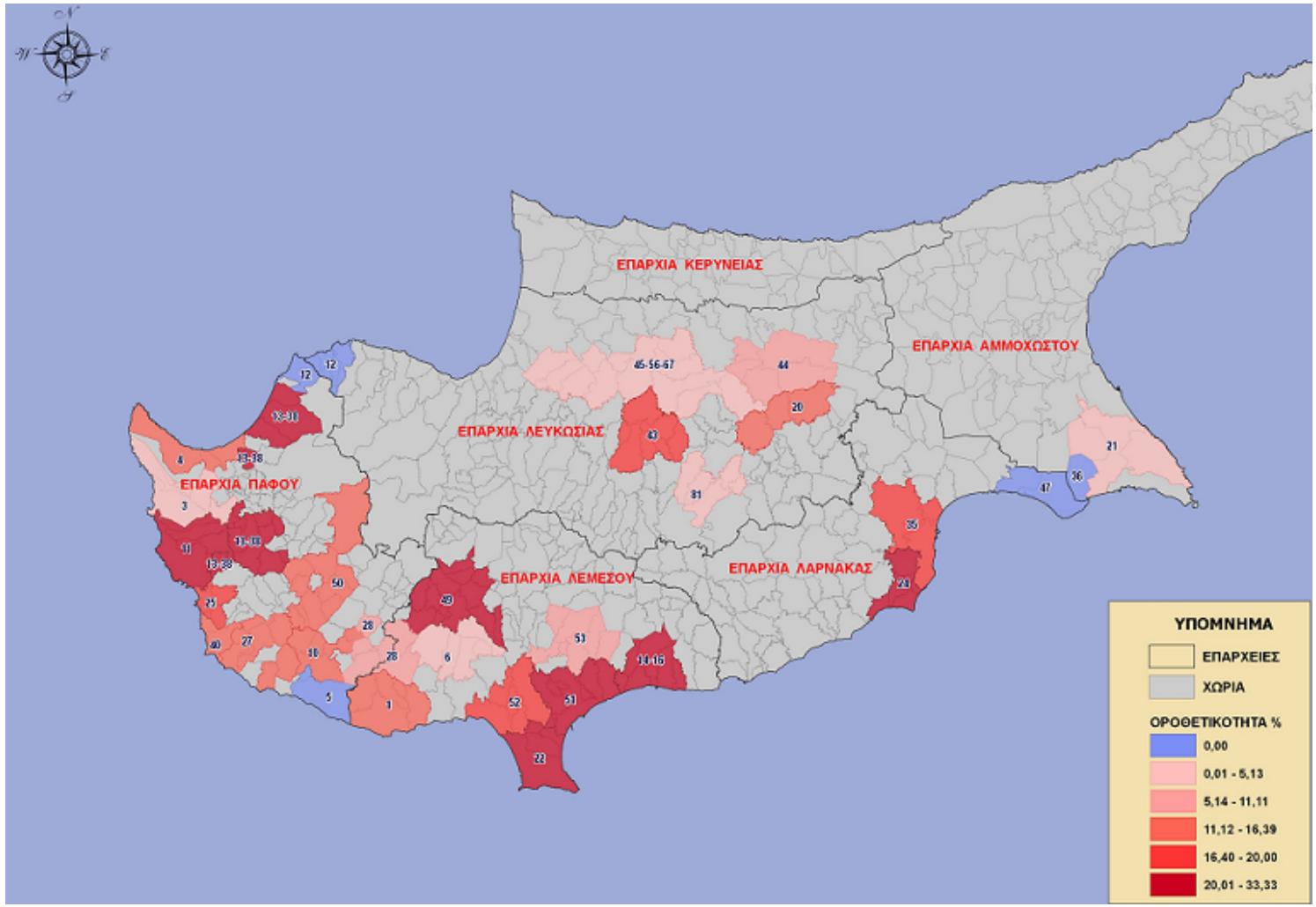
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2-1. Δείγματα από σκυλιά

Από τα 900 σκυλιά, 14.9% ήταν θετικά με την τεχνική ELISA, 11.8% με την τεχνική IFAT με cut off titre 1/200 και 12% με cut off titre 1/100, 9.1% με ES, 25% με PCR και 6.9% με καλλιέργεια (Πίνακας 6). Σε ορισμένα τετράγωνα η οροθετικότητα έφτασε το 33.3% (Χάρτης 1, 2, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12).

Τεχνική	ELISA	IFAT	ES	PCR	Απομόνωση παράσιτου
Αρ. Θετικών Σκυλιών	134 (14.9%)	106 (11.8%)	83 (9.1%)	229 (25%)	62 (6.9%)

Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων στα 900 τυχαία επιλεγμένα σκυλιά. Όσα σκυλιά ήταν θετικά στην τεχνική του Έμμεσου Ανοσοφθορισμού και της Ηλεκτροσυναίρεσης βρέθηκαν θετικά και στην δοκιμή ELISA. Από τα 229 σκυλιά που ήταν θετικά στην PCR μόνο 67 βρέθηκαν θετικά στην ELISA.



Χάρτης 1: Γεωγραφική κατανομή της οροθετικότητας σκυλιών έναντι της *Leishmania infantum* στις 30 περιοχές της Κύπρους

Παράσιτα απομονώθηκαν από αίμα (25 στελέχη), από λεμφαδένες (19), από σπλήνα (18) από 62 σκυλιά, 9 από τα οποία ήταν φαινομενικά υγιή και οροαρνητικά ζώα (Πίνακας 7). Όλα, εκτός από τρία, σκυλιά με θετική καλλιέργεια για Λεϊσμάνια ήταν θετικά με την τεχνική της PCR. Από τα επιπρόσθετα 2056 σκυλιά που εξετάστηκαν, 402 (19.6%) βρέθηκαν οροθετικά στην ELISA.

Απομόνωση από / Αρ. στελεχών	Αίμα	Λεμφαδένες	Σπλήνα
62/900 (6.9%)	25/62 (40.32%)	19/62 (30.64%)	18/62 (29.03%)

Πίνακας 7: Αριθμός στελεχών *Leishmania* και βιολογικό υλικό από το οποίο έγινε η απομόνωση του παράσιτου στα 900 τυχαία επιλεγμένα σκυλιά. Από αυτά τα 9 απομονώθηκαν από φαινομενικά υγιή και ταυτόχρονα οροαρνητικά σκυλιά και τα 3 από σκυλιά τα οποία έτυχαν "επιτυχούς" θεραπείας για λεϊσμανίαση.

Η τυποποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν από τα σκυλιά, έδειξε ότι 61/62 στελέχη ήταν *L. infantum* MON-1 και 1/62 *L. infantum* MON-98. Επιπρόσθετα από ένα σκύλο τυποποιήθηκαν ταυτόχρονα *L. infantum* MON-1 και *L. donovani* MON-37 (Antoniou *και συν.,* 2008) (Πίνακας 8).

Τυποποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν από τα σκυλιά	*L. Infantum* MON-1	*L. Infantum* MON-98	*L. Infantum* MON-1/ *L. donovani* MON-37 co-infection
	60/62 (96.7%)	1/62 (1.6%)	1/62 (1.6%)

Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα της τυποποίησης των 62 στελεχών του παράσιτου που απομονώθηκαν από τα 900 σκυλιά και που έγινε με δύο τεχνικές: α) με την Πολυεστιακή Ισοενζυμική Ηλεκτροφόρηση (MLEE, Rioux *και συν.,* 1990) και β) με την χρήση του γονιδιακού δείκτη *K26* (*K26*-PCR based assay) ο οποίος διαχωρίζει είδη/υποείδη του συμπλέγματος *L. donovani*, βάση του μεγέθους του *K26*-αλληλόμορφου (Haralambous *και συν.,* 2008).

Ο κίνδυνος για ένα σκύλο να βρεθεί οροθετικός βρέθηκε («by univariate analysis») να σχετίζεται σημαντικά με τις ακόλουθες μεταβλητές: 1) την εποχή δειγματοληψίας (p=0,019), με αυξημένο κίνδυνο την άνοιξη (OR 2.8, 95% CI 1.4 έως 5.3), το καλοκαίρι (OR 2.2, 95% CI 1.1 έως 4.3) και τους φθινοπωρινούς μήνες (OR 2.6, 95% CI 1.2 έως 5.8) σε σύγκριση με τους χειμερινούς μήνες, 2) την γεωγραφική προέλευση του σκυλιού (p=0,009) με τις επαρχίες Πάφου και Λεμεσού να έχουν

μεγαλύτερο κίνδυνο, 3) την ηλικία, με αύξηση του βαθμού κινδύνου οροθετικότητας στα μεγαλύτερα σκυλιά (p<0.0001) με τον κίνδυνο στα σκυλιά ηλικίας 2 έως 3 χρονών να είναι 3.2 φορές μεγαλύτερος από εκείνο των σκυλιών ηλικίας μικρότερης των 2 χρόνων (95% CI 1.6 έως 6.2), 5.4 φορές σε σκυλιά ηλικίας 4 έως 5 χρόνων (2.7 έως 11.0) και 2.9 φορές σε σκυλιά ηλικίας 6 χρονών και άνω (95% CI 1.3 έως 6.6) συγκρινόμενα με την ομάδα των νεαρότερων ηλικιακά ζώων, 4) την παρουσία τουλάχιστον 3 συμπτωμάτων της ασθένειας με αύξηση του κινδύνου κατά 4.3 φορές (OR 4.3, 95% CI 2.7 έως 6.8), παρά το γεγονός ότι 67% των οροθετικών σκυλιών δεν είχαν καθόλου κλινικά συμπτώματα. Η χρήση του σκυλιού, το βάρος, το χρώμα, το μήκος του τριχώματος και το φύλο βρέθηκαν να μην σχετίζονται σημαντικά με την οροθετικότητα κατά την «univariate analysis» (σε επίπεδο 5%).

Όταν ελήφθησαν υπόψη όλες οι μεταβλητές, σε πολυμεταβλητό λογιστικό μοντέλο οπισθοδρόμισης, στο τελικό μοντέλο επιλέγηκαν οι ακόλουθες επεξηγηματικές μεταβλητές: 1) γεωγραφική τοποθεσία (p=0.003). Η πιθανότητα να βρεθούν οροθετικά σκυλιά που ζουν σε Λεμεσό και Πάφο είναι 3.1 (95% CI 1.4 έως 6.5) και 2.6 (1.0 έως 5.1) φορές μεγαλύτερη από σκυλιά που ζουν στη Λευκωσία, 2) ηλικία (p<0.0001, OR 3.0, 4.8 και 2.7 για ηλικιακές ομάδες 2-3, 4-5 και 6+ αντίστοιχα, συγκρινόμενη με ηλικία <2 χρονών), 3) παρουσία εκτοπαρασίτων (p=0.016, OR 0.22, 95% CI 0.06 έως 0.72), και 4) παρουσία συμπτωμάτων (p<0.0001, OR 4.3, 95% CI 2.7 έως 6.8) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13).

Ο κίνδυνος για ένα σκύλο να βρεθεί θετικός στην PCR βρέθηκε («by univariate analysis») να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τις ακόλουθες μεταβλητές: 1) την εποχή δειγματοληψίας (p=0.0001), με αυξημένο κίνδυνο την άνοιξη (OR 10.8, 95% CI 5.9 έως 19.9), το καλοκαίρι (OR 5.3, 95% CI 2.9 έως 9.9) και τους φθινοπωρινούς μήνες (OR 4.2, 95% CI 2.03 έως 8.8) σε σύγκριση με τους χειμερινούς μήνες, 2) την γεωγραφική προέλευση του σκυλιού (p=0.0001) με την επαρχία Πάφου να έχει μεγαλύτερο αριθμό θετικών ζώων στην PCR (OR 2.1, 95% CI 1.4 έως 3.3), 3) συμπτώματα λεϊσμανίασης παρουσιάστηκαν σε 119 σκυλιά και ο κίνδυνος ανά συμπτωματικό σκυλί να είναι PCR θετικό ήταν 1.5 φορές μεγαλύτερος από ένα ασυμπτωματικό σκυλί (OR 1.5, 95% CI 1.0 έως 2.3). Η ηλικία, η χρήση του σκυλιού (κυνήγι, φύλακες, συντροφιάς), το βάρος, το χρώμα, το μήκος του τριχώματος, το φύλο και η παρουσία εκτοπαρασίτων βρέθηκαν να μην σχετίζονται σημαντικά με την θετικότητα στην PCR κατά την «univariate analysis» (σε επίπεδο 5%).

Όταν ελήφθησαν υπόψη όλες οι μεταβλητές, σε πολυμεταβλητό λογιστικό μοντέλο οπισθοδρόμισης, στο τελικό μοντέλο επιλέγηκε η ακόλουθη επεξηγηματική μεταβλητή για p=0.0001: εποχή (με τον κίνδυνο να είναι 5.5 και 3.8 για την άνοιξη και το καλοκαίρι σε σύγκριση με τον χειμώνα, 95% CI 2.6 έως 11.5 και 1.8 έως 7.7 αντίστοιχα). Για το λόγο αυτό σκυλιά από τα οποία ελήφθησαν δείγματα αίματος την άνοιξη και το καλοκαίρι είχαν τον ψηλότερο κίνδυνο να είναι θετικά για Λεϊσμάνια στην PCR.

2-2. Δείγματα από ανθρώπους

Και τα 600 άτομα από τα τρία υπό μελέτη τετράγωνα-περιοχές βρέθηκαν οροαρνητικά στην ELISA. Από τους 35 ασθενείς με ύποπτα κλινικά συμπτώματα από τα νοσοκομεία (ψηλός επιμένων πυρετός ή δερματικές αλλοιώσεις που δεν θεραπεύονταν), δύο ασθενείς ανέπτυξαν ΣΛ (ένα βρέφος ηλικίας εννέα μηνών από γονείς αθίγγανους, το οποίο είχε ταυτόχρονη μόλυνση με Epstein Barr virus (Koliou *και συν.,* 2008) και ένας Βρετανός, 73 χρονών χωρίς άλλα προβλήματα υγείας) και τέσσερις ανέπτυξαν ΔΛ (3 άνδρες 45, 48 και 55 ετών και μια γυναίκα 55 χρονών). Οι δύο ασθενείς με ΣΛ ήταν θετικοί στην ELISA και IFAT (τίτλοι αντισωμάτων και στους δύο: 1/200) και από τους τέσσερις ασθενείς με ΔΛ ένας είχε αντισώματα (στην ELISA και IFAT: τίτλος αντισωμάτων 1/400) (Πίνακας 9). Απομόνωση του παράσιτου έγινε από τους 5/6 ασθενείς. Τα 5 στελέχη τυποποιήθηκαν σαν *L. donovani* MON-37 με Πολυεστιακή Ισοενζυμική Ηλεκτροφόρηση (MLEE, Rioux *και συν.,* 1990). Και τα έξι στελέχη τυποποιήθηκαν σαν *L. donovani* με την *K26*-PCR based assay που διαχωρίζει είδη/υποείδη του συμπλέγματος *L. donovani*, βάση του μεγέθους του *K26*-αλληλόμορφου (Haralambous *και συν.,* 2008).

Τεχνική	ELISA	IFAT	ES	PCR	Απομόνωση παράσιτου
Αριθμός θετικών ασθενών	3/6 (50%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	6/6 (100%)	5/6 (83.3%)

Πίνακας 9: Τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων στα 6 ανθρώπινα περιστατικά λεϊσμανίασης από *L. donovani* MON-37 (2 ΣΛ, 4 ΔΛ,) που διαγνώστηκαν στις ελεύθερες περιοχές της Κύπρου. Οι 3 οροαρνητικοί ασθενείς έπασχαν από ΔΛ. Για έναν από τους οροαρνητικούς ασθενείς με ΔΛ δεν υπήρξε διαθέσιμο δείγμα για καλλιέργεια και απομόνωση του παράσιτου.

2-3. Φλεβοτόμοι

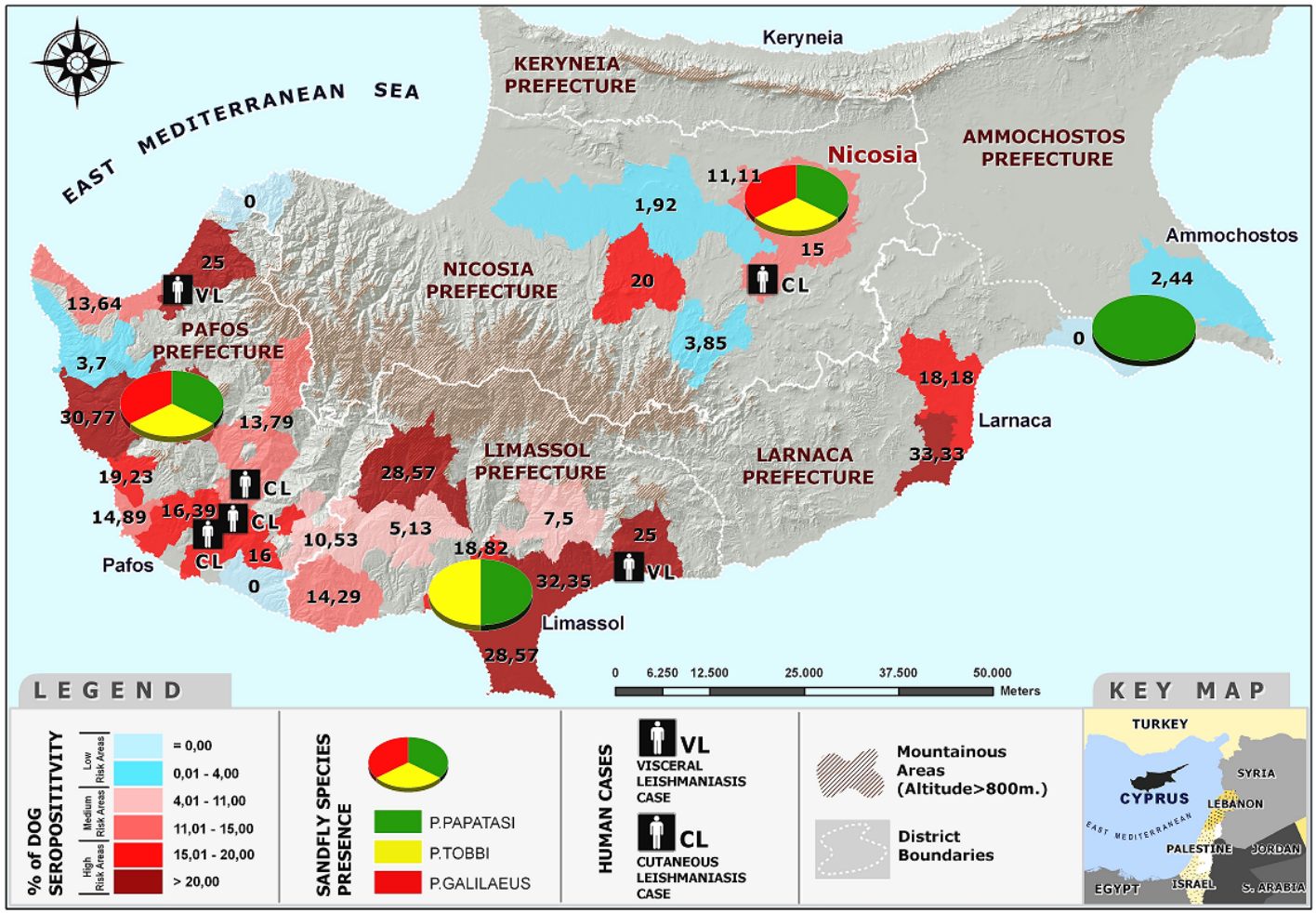
Συνολικά 1,716 Φλεβοτόμοι (649 αρσενικοί και 1067 θηλυκοί), που κατατάσσονται σε 10 διαφορετικά είδη παγιδεύτηκαν από τα 20 χωριά: Υψόμετρο 37-176μ: 1,512 *Phlebotomus spp.* και 204 *Sergentomyia spp.* Το είδος που ενοχοποιείται για τη διαβίβαση της Λεϊσμάνια, ο *P. tobbi*, βρέθηκε σε πολύ μεγάλους πληθυσμούς στις περιοχές υψηλού κινδύνου της Πάφου (345 άτομα) και της Λεμεσού (12 άτομα), ενώ στην περιοχή της Αμμοχώστου όπου δεν υπήρχαν οροθετικά σκυλιά δεν βρέθηκε κανένα άτομο του είδους αυτού. Ο *P. papatasi* βρέθηκε σχεδόν σε όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν (18/20), ο *P. tobbi* σε 14/20, ο *P. galilaeus* σε 7/20, ο *P. sergenti* σε 4/20, ο *P. alexandri* σε 1/20, ο *P. mascittii* σε 1/20 και ο *P. economidesi* σε 1/20 (Πίνακας 10, 11, Χάρτης 2). Από 80 θηλυκούς Φλεβοτόμους έγινε προσπάθεια για απομόνωση του παράσιτου. Για το σκοπό αυτό μετά την ταυτοποίηση τους με βάση τις κλείδες μορφολογίας, έγινε εξαγωγή του εντέρου και έλεγχος τυχόν παρουσίας προμαστιγωτών, με σκοπό την καλλιέργεια του παράσιτου. Και οι 80 Φλεβοτόμοι ήταν αρνητικοί για παρουσία προμαστιγοτών στο έντερο τους.

Επαρχία	**Υψόμετρο (μέτρα)**	**Αρ. τετραγώνου**	***P. papatasi***	***P. tobbi***	***P. galilaeus***	***P. sergenti***	***P. alexandri***	***P. mascittii***	***P. economidesi***	***S. minuta***	***S. azizi***	***S. fallax***
Πάφου	75	10	206	345	220	11	0	0	0	39	18	3
Λευκωσίας	136	20	453	6	3	0	0	1	0	27	31	7
Λεμεσού	176	14	118	12	0	1	2	0	1	74	0	1
Αμμόχωστου*	37	47	133	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Σύνολο			910	363	223	12	2	1	1	144	49	11

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Τα αποτελέσματα της τυποποίησης των 1,716 Φλεβοτόμων που συνελήφθηκαν. *Περιοχή χωρίς περιστατικά σκυλιών ή ανθρώπων.

Χωριό	Επαρχία	*P. papatasi*	*P. tobbi*	*P. galilaeus*	*P. sergenti*	*P. alexandri*	*P. mascittii*	*P. economidesi*
Χρυσοχούς *	Πάφος	+	+	+	-	-	-	-
Πόλις Χρυσοχούς*	Πάφος	+	+	+	+	-	-	-
Πελαθούσα *	Πάφος	+	+	-	+	-	-	-
Μακούντα * +	Πάφος	+	+	+	-	-	-	-
Άγ. Γεώργιος * +	Πάφος	+	+	+	+	-	-	-
Αναρίτα *	Πάφος	+	+	+	-	-	-	-
Δωρά *	Λεμεσός	+	+	-	-	-	-	+
Ύψωνας *	Λεμεσός	+	+	-	-	-	-	-
Πισσούρι *	Λεμεσός	+	+	-	-	+	-	-
Καντού *	Λεμεσός	+	+	-	+	-	-	-
Κολόσσι *	Λεμεσός	+	+	-	-	-	-	-
Αγίοι Τριμιθιάς	Λευκωσία	+	-	-	-	-	-	-
Ακάκι	Λευκωσία	-	-	+	-	-	-	-
Κοκκινιτριμιθιά	Λευκωσία	+	+	-	-	-	-	-
Λευκωσία *	Λευκωσία	+	+	+	-	-	+	-
Παλιομέτοχο	Λευκωσία	+	+	-	-	-	-	-
Σωτήρα	Αμμόχωστος	+	-	-	-	-	-	-
Ξυλοφάγου	Αμμόχωστος	+	-	-	-	-	-	-
Παραλίμνι	Αμμόχωστος	+	-	-	-	-	-	-
Αραδίππου	Λάρνακα	-	-	-	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Τα είδη των Φλεβοτόμων που βρέθηκαν στα 20 χωριά που μελετήθηκαν. + δηλώνει παρουσία Φλεβοτόμων (sp.), - δηλώνει απουσία Φλεβοτόμων (sp.), * δηλώνει παρουσία στην περιοχή κρουσμάτων λεϊσμανίασης στα σκυλιά, + δηλώνει παρουσία στην περιοχή κρουσμάτων λεϊσμανίασης σε ανθρώπους.



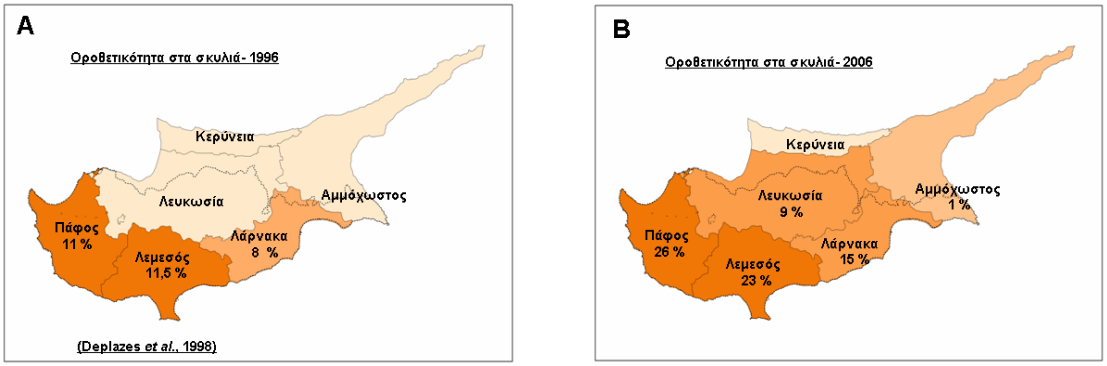
Χάρτης 2: Κατανομή των φλεβοτόμων ανά είδος σε σχέση με τη γεωγραφική κατανομή της οροθετικότητας στα σκυλιά στη *Leishmania infantum* και τα ανθρώπινα περιστατικά λεϊσμανίασης από *Leishmania donovani* MON-37, σε περιοχές της Κύπρου.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ερευνητικό έργο ανέδειξε τρία βασικά ερωτήματα: 1) Γιατί δεν βρέθηκαν μέχρι σήμερα περιστατικά ΣΛ ή/και ΔΛ στον άνθρωπο από *L. infantum* στην Κύπρο, αφού υπάρχουν όλες οι ενδείξεις ότι υπάρχουν ξενιστές ικανοί να μεταδώσουν την Λεϊσμάνια στα σκυλιά και τους ανθρώπους (Deplazes *και συν.*, 1998, Leger *και συν.*, 2000, Antoniou *και συν.*, 2008, 2009, Mazeris *και συν.,* 2010), 2) Πόσο μεγάλος είναι ο κίνδυνος να εγκατασταθεί και να εξαπλωθεί η *L. donovani* MON-37 στο νησί και σε άλλες χώρες της περιοχής, 3) Είναι ο *P. tobbi* ο ενδιάμεσος ξενιστής και για τα δύο είδη του παράσιτου στην Κύπρο;

Αναφορικά με το πρώτο ερώτημα, κάποιος θα ανέμενε ένα μικρό αριθμό περιστατικών από *L. infantum* μετά την επανεμφάνιση της λεϊσμανίασης στα σκυλιά και τον σχεδόν εννιαπλασιασμό, τα τελευταία δέκα χρόνια, της οροθετικότητας στα σκυλιά (ο μέσος όρος οροθετικότητας στα τυχαία δείγματα από σκυλιά αυξήθηκε από 1.7% (Deplazes *και συν.,* 1998) σε 14.9% (Εικ. 18). Η οροθετικότητα στα επιπλέον 2,056 σκυλιά που στάλθηκαν για έλεγχο από κτηνίατρους ήταν συγκρίσιμη με αυτήν των 900 τυχαία επιλεγμένων σκυλιών και ανήλθε στο 19.6%.

Η αύξηση της οροθετικότητας καταδεικνύει ότι το παράσιτο έχει εγκατασταθεί στο νησί χρησιμοποιώντας σαν ενδιάμεσους ξενιστές αυτόχθονα είδη Φλεβοτόμων που βρέθηκαν στα περισσότερα μέρη της Κύπρου. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με την παρούσα γεωγραφική διασπορά της ασθένειας (Χάρτης 1, 2) η οποία δεν περιορίζεται πλέον στις παράλιες περιοχές (Adler S, 1945, Deplazes *και συν.,* 1998).



Εικόνα 18: Σύγκριση της οροθετικότητας στα σκυλιά τα έτη (Α) 1996 και (Β) 2006. Το 2006 παρατηρήθηκε πολύ σημαντική αύξηση της οροθετικότητας στα σκυλιά.

Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε ότι η γεωγραφική προέλευση του σκύλου αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου οροθετικότητας (p=0,009) και θετικότητας στην PCR (p=0,0001) με την επαρχία Πάφου (επαρχία με 4/6 ανθρώπινα περιστατικά) να αντιμετωπίζει τον μεγαλύτερο κίνδυνο και για τα δύο. Όμως, η εποχή δειγματοληψίας ήταν επίσης σημαντική στατιστικά για την οροθετικότητα (p=0,019) και την θετικότητα στην PCR (p=0,0001), με αύξηση του κινδύνου την άνοιξη, το καλοκαίρι και το φθινόπωρο (Παράρτημα 13). Το ψηλό ποσοστό θετικότητας στην PCR που παρατηρήθηκε στην επαρχία Λευκωσίας συγκρινόμενο με την θετικότητα στην ELISA (21.9% και 8.5% αντίστοιχα) και στην Πάφο (37.5% και 15.8% αντίστοιχα) εξηγείται από το γεγονός ότι η δειγματοληψία από τα περισσότερα ζώα αυτών των περιοχών έγινε κατά την διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού, περίοδο κατά την οποία οι σκνίπες είναι ενεργές και μεταδίδουν το παράσιτο.

Η έρευνα που αφορούσε στην λεϊσμανίαση του ανθρώπου, ήταν η πρώτη που έγινε στην Κύπρο. Από το 1935 ήταν γνωστά μόνο δύο περιστατικά ΣΛ σε βρέφη και κανένα περιστατικό ΔΛ (Minter και Eitrem, 1989). Στην Κύπρο η λεϊσμανίαση του σκύλου και του ανθρώπου είναι νόσημα υποχρεωτικής δήλωσης και η ΣΛ αναγκάζει τον άρρωστο να καταφύγει στο νοσοκομείο αφού είναι θανατηφόρα χωρίς θεραπεία. Σε ενδημικές περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου καταγράφονται κρούσματα, με σαφή κλινική και υποκλινική εικόνα σε υγιείς και σε HIV-μολυσμένους ανθρώπους (Alvar *και συν.,* 1997, Le Fichoux *και συν.,* 1999), όπου η *L. infantum* MON-1 αντιπροσωπεύει μέχρι και το 90% των τυποποιημένων στελεχών *L. infantum* και είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα των περιστατικών λεϊσμανίασης στα σκυλιά και ΣΛ στους ανθρώπους (Hide *και συν.*, 2001). Παρά το γεγονός ότι τα περιστατικά ΣΛ είναι σχετικά λίγα στις Ευρωπαϊκές χώρες όπου η λεϊσμανίαση του σκύλου είναι ενδημική, εντούτοις οι ασυμπτωματικές μολύνσεις είναι συνήθεις. Σε ενδημικές περιοχές της νότιας Γαλλίας και της Ελλάδας για παράδειγμα, δηλώθηκαν ποσοστά οροθετικότητας της τάξης του 3.4% και 15% αντίστοιχα (Dujardin *και συν.,* 2008).

Οι ορολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση ενεργής ΣΛ είναι σε θέση να ανιχνεύσουν ειδικά αντισώματα σε ανοσοϊκανά άτομα. Αντίθετα, στις υποκλινικές μολύνσεις, το επίπεδο των κυκλοφορόντων αντισωμάτων είναι χαμηλό (Mary *και συν.,* 1992). Η απουσία μιας «χρυσής» τεχνικής, που να έχει την δυνατότητα ανίχνευσης υποκλινικών μολύνσεων, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις επιδημιολογικές μελέτες της λεϊσμανίασης στην περιοχή της Μεσογείου (Riera *και*

συν., 2004). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της λεϊσμανίασης είναι: IFAT, ELISA, Direct Agglutination Test (DAT) και Delayed-Type Hypersensitivity Reaction Test (DTH). Θετικό αποτέλεσμα δηλώνει έκθεση στη *Leishmania*, γεγονός αναμενόμενο σε μια ενδημική περιοχή, όμως αρνητικό αποτέλεσμα δεν σημαίνει απαραίτητα μη επαφή με το παράσιτο (Riera *και συν.,* 2004). Η ενδοδερμική δοκιμασία εκχυλίσματος του παράσιτου (leismanin skin test, LST) έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα σε επιδημιολογικές μελέτες και παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα στις περιπτώσεις περιστατικών ΣΛ που έχουν ιανθεί, όμως η χρησιμότητα της στις περιπτώσεις ασυμπτωματικών μολύνσεων δεν είναι καλά αποσαφηνισμένη (Pampiglione *και συν.,* 1975, Weigle *και συν.,* 1991). Μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζει η τεχνική nested-PCR για την οποία υπάρχουν αναφορές για σημαντική στατιστική σχέση μεταξύ nested-PCR και ELISA, η οποία δείχνει ότι ο ορολογικός έλεγχος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ασυμπτωματικών μολύνσεων, όμως με μειωμένη ευαισθησία (Le Fichoux *και συν.,* 1999). Σε παρόμοια εργασία των Riera *και συν.,* 2004 γίνεται αναφορά για ασυμτωματικές μολύνσεις από λεϊσμανίαση σε ποσοστό 2.4% από 656 αιμοδότες από την ενδημική περιοχή του νησιού Eivissa της Ισπανίας με ELISA και 7.6% με Western blot. Όμως υπάρχουν διάφορα είδη ELISA τα οποία χρησιμοποιούν διάφορα είδη αντιγόνων με αποτέλεσμα να ποικίλει η ευαισθησία τους (Romero *και συν.,* 2009). Στις δύο περιοχές από τις οποίες έγιναν δειγματοληψίες και οι οποίες έδειξαν 25% και 28.6% οροθετικότητα στα σκυλιά, τα 400 άτομα που ελέγχθηκαν (από τους 21,967 μόνιμους κατοίκους σύμφωνα με την καταγραφή του 2001: www.mof.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf) ήταν όλοι μόνιμοι κάτοικοι των περιοχών μελέτης με μέσο όρο ηλικίας τα 52.7 έτη, παράγοντες που ευνοούν την επαφή τους με το παράσιτο (Moral *και συν.,* 2002). Εν τούτοις, οι εξετάσεις που έγιναν στον ορό αίματος των κατοίκων των περιοχών αυτών, με την τεχνική της ELISA, δεν έδωσαν οποιαδήποτε θετικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά οι δύο ασθενείς με ΣΛ και ένας από τους τέσσερις με ΔΛ, από *L. donovani* MON-37, ήταν οροθετικοί στην τεχνική ELISA που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη και που χρησιμοποιούσε ολικό αντιγόνο *L. infantum.* Ως εκ τούτου, ο σχεδιασμός της έρευνας αναμενόταν να οδηγήσει σε ένα μικρό ποσοστό οροθετικών ατόμων. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες πριν εξαχθεί το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν οροθετικά άτομα στις ενδημικές περιοχές.

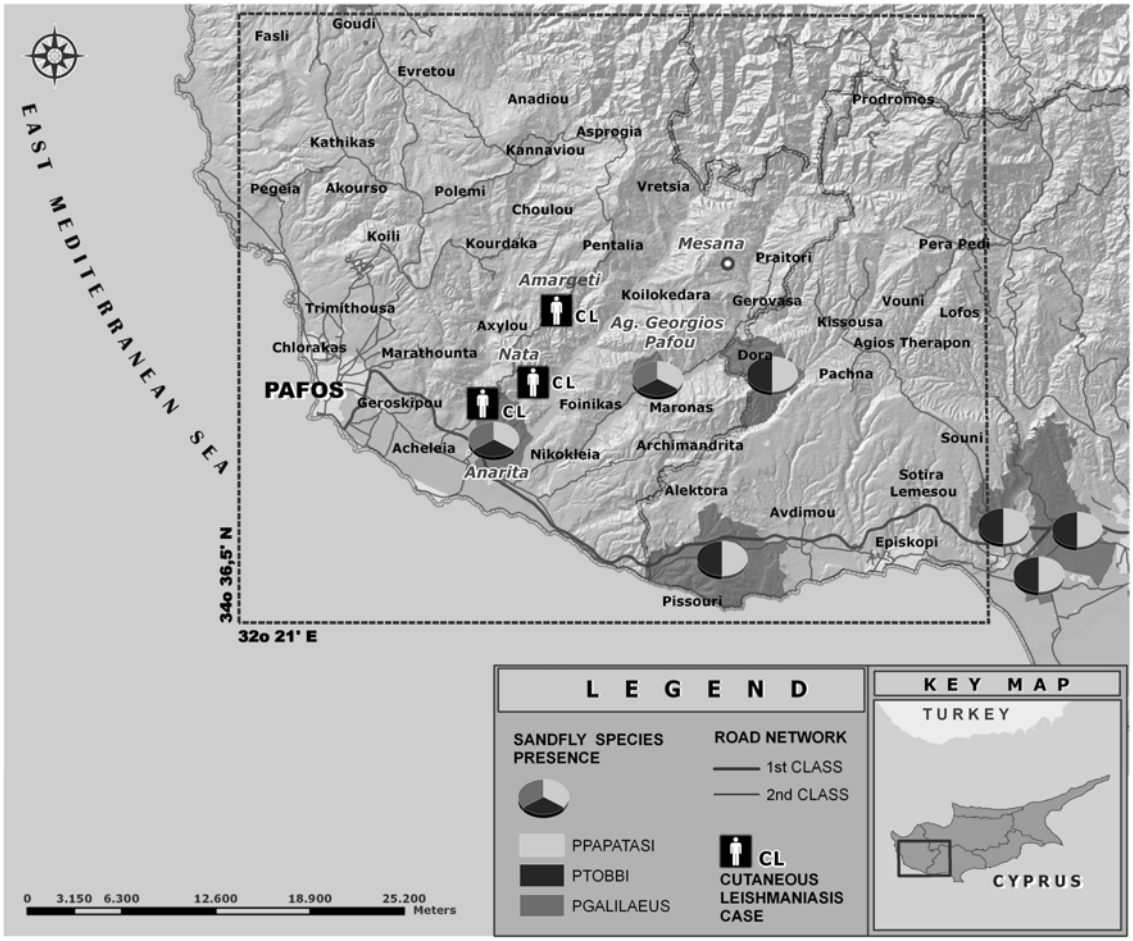
Η απουσία ασθενών με ΣΛ ή ΔΛ από *L. infantum,* παρά το ψηλό ποσοστό οροθετικότητας στα σκυλιά, αποτελεί παράδοξο. Στην Νότια Κύπρο παρατηρήθηκε χαμηλός κίνδυνος για μετάδοση της *L. infantum* στον άνθρωπο συγκρινόμενη με τον ψηλό κίνδυνο που υπάρχει για τη μετάδοση της *L. infantum* στα σκυλιά. Είναι ένα γεγονός που δεν παρατηρείται σε άλλες ενδημικές χώρες όπου η λεϊσμανίαση στα σκυλιά και η ΣΛ στον άνθρωπο από *L. infantum* εμφανίζονται ταυτόχρονα. Επιπλέον, η επιδημιολογία της λεϊσμανίασης στο βόρειο τμήμα της Κύπρου είναι διαφορετική, με τα περιστατικά ΔΛ να παρουσιάζουν αύξηση, από δύο τον χρόνο το 1985, σε 36 το 1990 στον Τουρκοκυπριακό πληθυσμό (Desjeux P, 1991) και ένα περιστατικό ΣΛ το 1988 (Minter DM, Eitrem UR, 1989) για το οποίο ενοχοποιήθηκε η *L. infantum* (Howard *και συν.,* 1992). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με την παρουσία του *P. neglectus,* που αποτελεί τον συνήθη ενδιάμεσο ξενιστή *της L. infantum* στην ανατολική Μεσόγειο, στην βόρεια αλλά όχι στη νότια Κύπρο (Leger *και συν.,* 2000, Rastgeldi *και συν.,* 2005). Αυτό το είδος βρέθηκε βόρεια των βουνών της Κερύνειας. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι σκνίπες δεν μπορούν να πετάξουν σε μεγάλες αποστάσεις και συνήθως απομακρύνονται μόνο μερικές εκατοντάδες μέτρα από τις φωλιές τους, η διασπορά του *P. Neglectus* προς τον νότο εμποδίζεται και κατά ένα μέρος από την ορεινή υφή του νησιού, με υψόμετρο μέχρι και 1024 μέτρα στην περιοχή αναφοράς (Τμήμα γεωλογικής Επισκόπησης της Κύπρου, Εικ. 19). Επίσης η απουσία του από τον νότο είναι πιθανόν να οφείλεται και στη βιογεολογική/ μικροκλιματική ποικιλομορφία της Κύπρου (Antoniou *και συν.,* 2009).

Εικόνα 19: Η ορεινή υφή του εδάφους στα βόρεια της Κύπρου (οροσειρά του Πενταδάκτυλου) πιθανόν να εμποδίζει την εξάπλωση του *Phlebotomus neglectus* προς τα νότια.

Μέχρι τώρα, για την απουσία ανθρώπινων περιστατικών λεϊσμανίασης στην Κύπρο, διδόταν η εξήγηση ότι ο τοπικός πληθυσμός του *P. tobbi*, που ενοχοποιείται σαν ο διαβιβαστής ξενιστής της *L. infantum* στην Κύπρο, δεν είναι ανθρωπόφιλος (Leger και Depaquit, 2008). Ο *P. tobbi* ανευρέθηκε σε 14/20 χωριά στα οποία τοποθετήθηκαν παγίδες. Σε αυτά τα χωριά, εκτός από δύο, υπήρχαν περιστατικά λεϊσμανίασης στα σκυλιά ενώ στα υπόλοιπα 6/20 χωριά όπου δεν ανευρέθηκε ο *P. tobbi* δεν υπήρχαν περιστατικά λεϊσμανίασης σε σκυλιά (Πίνακας 11, παράρτημα 11). Ο *P. galilaeus* ανευρέθηκε σε 7/20 χωριά, στα δύο από τα οποία υπήρχαν ανθρώπινα κρούσματα και κρούσματα σε σκυλιά (Πίνακας 11, παράρτημα 11). Οι διατροφικές προτιμήσεις του *P. galilaeus* δεν είναι γνωστές, όμως το είδος αυτό είναι πολύ όμοιο με τον *P. perfiliewi galilaeus,* ξενιστή της *L. infantum* στην λεκάνη της Μεσογείου, ο οποίος τρέφεται ευκαιριακά παίρνοντας γεύματα αίματος από σκυλιά και ανθρώπους. Και τα δύο είδη Φλεβοτόμων, ο *P. tobbi* και *P. galilaeus,*

ανευρέθηκαν στα δύο χωριά που μελετήθηκαν με ανθρώπινα κρούσματα και κρούσματα σε σκυλιά και ο *P. tobbi* ανευρέθηκε σε όλα τα χωριά με *P. galilaeus,* με εξαίρεση ένα στην επαρχία Λευκωσίας (Πίνακας 11, χάρτης 2, 3, παράρτημα 11). Ο *P. galilaeus* ανευρέθηκε στο χωριό Μακούντα, όπου καταγράφηκε ένα κρούσμα ΣΛ, όχι όμως στη Λεμεσό, όπου καταγράφηκε το δεύτερο κρούσμα ΣΛ και απουσίαζε από 6/12 χωριά με κρούσματα σε σκυλιά (Πίνακας 11, χάρτης 2, 3, παράρτημα 11). Αντίθετα ο *P. papatasi,* παρά το γεγονός ότι ανευρέθηκε σε 18/20 χωριά, δεν θεωρείται δυνητικός ξενιστής της *L. infantum* αλλά ούτε και της *L. donovani* (Leger και Depaquit, 2008).

Τα τρία κρούσματα ΔΛ αφορούσαν σε κατοίκους των γειτονικών χωριών Αμαργέτη, Νατά και Άγιος Γεώργιος, τα οποία βρίσκονται σε απόσταση περίπου 7 χλμ το ένα από το άλλο, και το τέταρτο αφορούσε κάτοικο της Λευκωσίας ο οποίος όμως επισκέπτεται τα Μέσανα, το χωριό καταγωγής του, κάθε καλοκαίρι και τα περισσότερα Σαββατοκύριακα και το οποίο βρίσκεται σε απόσταση περίπου 9 χλμ από τα άλλα τρία χωριά (Χάρτης 3).



Χάρτης 3: Χάρτης των νοτιοδυτικών περιοχών της Κύπρου που δείχνει τις τοποθεσίες των 3 χωριών στα οποία εκδηλώθηκαν τα 3 ανθρώπινα περιστατικά Δερματικής Λεϊσμανίασης (ΔΛ) όπως επίσης και το χωριό Μέσανα, για το οποίο υπάρχει η υποψία ότι αποτέλεσε το σημείο μόλυνσης για τον τέταρτο ασθενή με ΔΛ. Επιπλέον, φαίνεται η παρουσία των πιο κύριων ειδών *Phlebotomus spp*.

Αυτά τα τέσσερα χωριά βρίσκονται σε κοιλάδα και περιβάλλονται από τρεις ποταμούς, σε υψόμετρο 350-600 μέτρα, με ετήσια βροχόπτωση 650 mm όπου οι κάτοικοι ασχολούνται κυρίως με την γεωργία (αμπέλια, αμυγδαλιές, ελιές) και την

κτηνοτροφία (αιγοπρόβατα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όλα τα χωριά που μελετήθηκαν κοντά σε αυτούς τους ποταμούς παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό κρουσμάτων λεϊσμανίασης στα σκυλιά, σε σύγκριση με χωριά που δεν είναι τόσο κοντά, γεγονός που υποδεικνύει ότι η περιοχή είναι ευνοϊκή για την ανάπτυξη των ειδών των Φλεβοτόμων που παίζουν το ρόλο του διαβιβαστή, δηλαδή των *P. tobbi* και/ή *P. galilaeus*.

Το γεγονός ότι στην Συρία η *L. donovani* MON-3 απομονώθηκε από τον *P. tobbi* (Rioux *και συν.,* 1998) δείχνει ότι αυτό το είδος αποτελεί ξενιστή ικανό να μεταδώσει την *L. donovani* και την *L. infantum*. Ο εντοπισμός και των δύο ειδών, της *L. infantum* MON-1 και της *L. donovani* MON-37 σε ένα σκυλί (Antoniou *και συν.,* 2008) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο/οι Φλεβοτόμοι διαβιβαστές του παράσιτου στην Κύπρο τσιμπούν τόσο ανθρώπους όσο και σκυλιά και αν αυτοί ανήκουν στο είδος *P. tobbi* ή *P. galilaeus* είναι κάτι που θα πρέπει να διευκρινιστεί με μελλοντικές έρευνες, αν και τα μέχρι τώρα ευρήματα ενοχοποιούν τον *P. tobbi*.

Το γεγονός ότι οι Φλεβοτόμοι στην Κύπρο είναι ανθρωπόφιλοι υποστηρίζεται επιπλέον από έναν αριθμό τουριστών που επισκέφτηκαν την Κύπρο, μεταξύ άλλων ενδημικών χωρών, και ανάπτυξαν ΣΛ (Wheatley *και συν.,* 1983, Valkoun *και συν.,* 1985). Έτσι, η απουσία ανθρώπινων κρουσμάτων ΣΛ και ΔΛ από *L. infantum* θα μπορούσε πιθανόν να εξηγηθεί από κάποιο μηχανισμό ο οποίος προστατεύει τους Έλληνες Κύπριους από την *L. infantum* αλλά όχι από την *L. donovani* η οποία, σε υγιή άτομα, προκαλεί ΔΛ και όχι ΣΛ, όπως συμβαίνει και στην Σρι Λάνκα (Nawaratna *και συν.,* 2007). Έχει καταδειχθεί ότι παράγοντες που συνδέονται με τον ξενιστή μπορεί να καθορίζουν την εξέλιξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ ξενιστή-παράσιτου και ότι παράγοντες οικογενειακοί και η εθνικότητα των ατόμων μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση της ΣΛ σε μια περιοχή (Bucheton *και συν.,* 2002). Τα δύο ανθρώπινα περιστατικά ΣΛ από *L. donovani* (ένα αθίγγανο βρέφος ηλικίας 9 μηνών με συν λοίμωξη με Epstein Barr Virus (Koliou *και συν.,* 2008) και ένας Βρετανός άνδρας ηλικίας 73 ετών χωρίς άλλα προβλήματα υγείας), και οι δύο μόνιμοι κάτοικοι Κύπρου σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές χωρίς καμιά σύνδεση, ανέπτυξαν σοβαρής μορφής νόσο (Antoniou *και συν.,* 2008) (Χάρτης 2). Τα τέσσερα περιστατικά ΔΛ αφορούσαν όλα σε Ελληνοκύπριους, υγιή άτομα, ηλικίας 45 έως 55 ετών. Η ανάλυση μικροδοριφορικών αλληλουχιών έδειξε ότι η γενετική δομή των έξι στελεχών δεν συνδέεται με την κλινική εκδήλωση της λεϊσμανίασης (Alam *και συν.,*

2009). Η πιθανότητα αυτή, της ύπαρξης κάποιου μηχανισμού που προστατεύει τους Ελληνοκύπριους από την *L. infantum*, υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι ενώ οι πληθυσμοί από τα δύο διαιρεμένα μέρη του νησιού έρχονται σε επαφή, ιδιαίτερα μετά το 2003 όπου οι άνθρωποι μπορούν να περνούν ελεύθερα από το ένα μέρος στο άλλο διαμέσου της "πράσινης γραμμής", στο νότιο μέρος του νησιού δεν δηλώθηκε κανένα κρούσμα ΔΛ ή ΣΛ λόγω *L. infantum*.

Κατά συνέπεια η Κυπριακή Δημοκρατία αποτελεί ένα μοναδικό φαινόμενο όπου υπάρχουν δύο ξεχωριστοί παράλληλοι κύκλοι μετάδοσης της λεϊσμανίασης. Στα σκυλιά με τη *L. infantum* MON-1 και στους ανθρώπους με τη *L. donovani* MON-37. Πρόσφατα στοιχεία με την ανάλυση μικροδοριφορικών αλληλουχιών (Alam *και συν.,* 2009) έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυπριακών στελεχών MON-37 και των στελεχών MON-37 από την Ινδία (Moreno G, 1989), το Ισραήλ (Schnur *και συν.,* 2001), τη Σρι Λάνκα (Karunaweera *και συν.,* 2003) και την Κένυα (Moreno *και συν.,* 1986). Ως εκ τούτου δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι η παρουσία του στελέχους MON-37 είναι πρόσφατη στην Κύπρο και ότι σχετίζεται με μετανάστες ή με μολυσμένους Φλεβοτόμους, τουλάχιστον από τις εν λόγω χώρες (Alam *και συν.,* 2009). Δεν μπορεί όμως να αποκλειστεί το σενάριο ότι οι Κύπριοι πιθανόν να μολύνθηκαν από παράσιτα τα οποία εισήχθησαν με μολυσμένους ανθρώπους από άλλες ενδημικές περιοχές, οι οποίες δεν έχουν ακόμα μελετηθεί, όπως για παράδειγμα η Τουρκία στην οποία υπάρχει υπόνοια ότι υπάρχει η *L. donovani* MON-37 (Ozensoy Toz, προσωπική επικοινωνία).

Τα αποτελέσματα της οροεπιδημιολογικής μελέτης στα σκυλιά οδήγησαν την αρμόδια υπηρεσία της Κυπριακής Δημοκρατίας (Κτηνιατρικές Υπηρεσίες) να λάβει μέτρα για την πρόληψη της εξάπλωσης της λεϊσμανίασης (υπουργικό διάταγμα για έλεγχο της ασθένειας στα σκυλιά, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 18). Όμως τα μέτρα αυτά θα προστατέψουν τα σκυλιά, όχι όμως και τον ανθρώπινο πληθυσμό στην περίπτωση που οι ασθενείς παίζουν το ρόλο αποθήκης για την *L. donovani* (ανθρωπονόσος). Για το λόγο αυτό θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για την προστασία του πληθυσμού από το αναδυόμενο αυτό νόσημα διαφορετικά υπάρχει η πιθανότητα η *L. donovani* να εξαπλωθεί γρήγορα, όπως έγινε στη Σρι Λάνκα (Nawaratna *και συν.,* 2007). Τη στιγμή που η ΣΛ, από *L. infantum,* εξαπλώνεται σε νέες περιοχές στην κεντρική Ευρώπη (Maroli *και συν.,* 2008), η εμφάνιση της *L. donovani* MON-37 σε μια Μεσογειακή/Ευρωπαϊκή χώρα μπορεί να οδηγήσει όχι μόνο σε δραματικές αλλαγές

στην επιδημιολογία της λεϊσμανίασης, αλλά θα μπορούσε να έχει σαν αποτέλεσμα και την δημιουργία υβριδίων. Ήδη στην Πορτογαλία απομονώθηκε υβρίδιο *L. major/L. infantum,* το οποίο μάλιστα παρουσιάζει αυξημένη μολυσματικότητα για τον άνθρωπο (Ravel *και συν.,* 2006). Για να αποφευχθεί αυτός ο κίνδυνος αλλά και η εξάπλωση της νόσου, είναι σημαντικό η ασθένεια να συμπεριληφθεί στα προγράμματα επιτήρησης για τη δημόσια υγεία σε Ευρωπαϊκό επίπεδο μια και πιθανοί φορείς του παράσιτου υπάρχουν σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες (Myskova *και συν.*, 2007).

4. ΟΦΕΛΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ

1. Η χρονική συγκυρία εκτέλεσης της μελέτης συνέπεσε με την εμφάνιση της *L. donovani* MON-37 στην Κύπρο και άρα και στην Ευρώπη. Έγινε κατορθωτή η διάγνωση του προβλήματος στα αρχικά του στάδια και με τα σωστά μέτρα επαγρύπνησης από τους αρμόδιους φορείς της Κύπρου (Υπουργεία Υγείας και Γεωργίας) είναι δυνατό να αναχαιτιστεί και να αποτραπεί να καταστεί ένα σοβαρό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας στην περιοχή.
2. Υπήρξε μια μεγάλη δημοσιότητα του προβλήματος της λεϊσμανίασης, με την συμβολή των μέσων μαζικής ενημέρωσης, η οποία παρακινήθηκε από τα αποτελέσματα της μελέτης. Καθημερινά, για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα και ακολουθώντας τα αποτελέσματα της μελέτης, η λεϊσμανίαση έμπαινε σε όλα τα σπίτια μέσα από εκτενή τηλεοπτικά και ραδιοφωνικά ρεπορτάζ, τηλεοπτικές και ραδιοφωνικές συνεντεύξεις (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 16), όπως επίσης μέσα από πρωτοσέλιδα άρθρα στον ημερήσιο και άλλο τύπο. Το γεγονός αυτό έκανε κατορθωτή τη γνωστοποίηση του προβλήματος της λεϊσμανίασης στο ευρύ κοινό και την ευαισθητοποίηση των αρμόδιων φορέων και του απλού πολίτη, που έδωσε σημαντικά οφέλη σχετικά με την λήψη προληπτικών μέτρων για τον περιορισμό της ασθένειας, όπως για παράδειγμα προστασία των σκυλιών και του ανθρώπου με εντομοαπωθητικά κατά τους θερμούς μήνες του έτους όταν τα έντομα διαβιβαστές είναι ενεργά. Αυτή η ευαισθητοποίηση είχε και σαν αποτέλεσμα τα 2056 επιπλέον δείγματα από σκυλιά και τα 35 δείγματα από ύποπτα για λεϊσμανίαση ανθρώπινα περιστατικά.
3. Καταγράφηκε το μέγεθος του προβλήματος, το οποίο είναι ανησυχητικό και αφύπνισε τις αρμόδιες αρχές της Κύπρου. Οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες με στόχο την καταπολέμηση της λεϊσμανίασης στα σκυλιά και την προστασία της Δημόσιας Υγείας, προχώρησαν στην έκδοση υπουργικού διατάγματος (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 18) το οποίο κατέστησε τη λεϊσμανίαση στα σκυλιά υποχρεωτικά δηλούμενο νόσημα και καθόρισε τα μέτρα ελέγχου και καταπολέμησης της ασθένειας. Το δε Υπουργείο Υγείας της Κύπρου έλαβε τα εξής μέτρα: α) Έγινε υπενθύμιση και ευαισθητοποίηση των Παιδιάτρων, Παθολόγων, Δερματολόγων και Γενικών Ιατρών για το γεγονός ότι υπάρχουν

κρούσματα λεϊσμανίασης στην Κύπρο και πρέπει να την λαμβάνουν υπόψη στη διαφορική διάγνωσή, β) Σε συνεργασία με τις Υγειονομικές Υπηρεσίες αποφασίστηκε η εφαρμογή προγραμμάτων καταπολέμησης των φλεβοτόμων στις περιοχές υψηλού κινδύνου, γ) Τα ταξιδιωτικά γραφεία εφοδιάστηκαν με ενημερωτικά έντυπα, που εκδόθηκαν με τη συνεργασία των Κτηνιατρικών και Ιατρικών Υπηρεσιών, που αφορούν στη λεϊσμανίαση και τους τρόπους πρόληψής της (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 17) με στόχο την ενημέρωση των Κυπρίων που ταξιδεύουν σε ενδημικές χώρες και δ) Απεστάλη επιστολή προς τους κυβερνητικούς γιατρούς, υπεύθυνους για την έκδοση Πιστοποιητικών Υγείας σε μετανάστες από ενδημικές για λεϊσμανίαση χώρες, με την οποία γίνεται ευαισθητοποίηση και τονίζεται η ανάγκη για προσεκτική εξέτασή τους, για τυχόν δερματικές αλλοιώσεις λόγω λεϊσμανίασης (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 20).

4. Δημιουργήθηκε δίκτυο συνεργασίας με ιατρούς και κτηνιάτρους το οποίο εκτός από αλληλοενημέρωση στα θέματα κλινικής και εργαστηριακής διάγνωσης και θεραπείας της νόσου, απέδωσε και συνεχίζει να αποδίδει ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων για εργαστηριακές εξετάσεις. Το πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι η λεϊσμανίαση μπαίνει πλέον στην διαφορική διάγνωση των γιατρών, συνεισφέροντας έτσι ουσιαστικά στην έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας που αποτελεί πολύ κρίσιμο σημείο και καθορίζει την εξέλιξη και αντιμετώπιση της ασθένειας σε ένα ασθενή αλλά και προλαμβάνει την εξάπλωση της νόσου σε άλλα άτομα μια και η *L. donovani* είναι ανθρωπονόσος.
5. Από τις απομονώσεις και την καλλιέργεια των στελεχών από ασθενείς και σκυλιά, δημιουργήθηκε τράπεζα στελεχών για περαιτέρω μελέτες και για τη δημιουργία συνεργασιών με εργαστήρια που εργάζονται στο θέμα αυτό. Ήδη πραγματοποιούνται τέτοιες συνεργασίες με εργαστήρια του εξωτερικού.
6. Αναπτύχθηκε η εργαστηριακή υποδομή στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες και είναι σε πλήρη λειτουργία εργαστήριο το οποίο διαθέτει εμπειρία και εξοπλισμό για να διενεργεί όλες τις απαιτούμενες εξετάσεις για τη διάγνωση της λεϊσμανίασης τόσο στα σκυλιά όσο και στους ανθρώπους. Είναι το μοναδικό εργαστήριο στην Κύπρο που διενεργεί αυτές τις εξετάσεις. Στο εν λόγω εργαστήριο δημιουργήθηκε επιπλέον η δυνατότητα παραγωγής διαγνωστικών κιτ (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10).

7. Δημιουργήθηκαν συνεργασίες με ερευνητικά κέντρα του εξωτερικού, όπου διεξάγονται πιο εξειδικευμένες εξετάσεις (τυποποίηση στελεχών, έλεγχος μολυσματικότητας και αντοχής των στελεχών στα φάρμακα) γεγονός που προσφέρει σημαντική βοήθεια στους κλινικούς γιατρούς και κτηνίατρους, στην προσπάθεια τους να αντιμετωπίσουν περιστατικά λεϊσμανίασης σε ανθρώπους και σκυλιά για την αποφυγή αναζωπύρωσης της νόσου μετά την θεραπεία.
8. Η μελέτη αυτή μου έδωσε την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με ερευνητές της λεϊσμανίασης και να συμμετάσχω στο Ευρωπαϊκό πρόγραμμα *LEISHMED* «Monitoring Risk Factors of Spreading of Leishmaniasis Around the Mediterranean Basin» στο οποίο αντιπροσώπευσα την Κύπρο. Επίσης μου δόθηκε η δυνατότητα να συμμετάσχω σε διάφορα Εθνικά και Διεθνή Συνέδρια για την λεϊσμανίαση και να συμμετάσχω μαζί με άλλους ερευνητές στην παρουσιάση θεμάτων σχετικών με το πρόβλημα της λεϊσμανίασης στην Κύπρο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 19).
9. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, τα οποία καταγράφουν την παρούσα κατάσταση και προβλέπουν την δυναμική της ασθένειας, κατατέθηκε στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες και στις Ιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου στοιχειοθετημένη πρόταση για την εγκατάσταση μιας ενεργής επιδημιολογικής επιτήρησης, η οποία θα βοηθήσει στην αντιμετώπιση αυτής της απειλής που έχει πολιτικο-οικονομικές και κοινωνικές προεκτάσεις (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 21).

5. ΤΟΜΕΙΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Συνεχής παρακολούθηση και μελέτη των στελεχών που θα απομονώνονται από τον άνθρωπο, το σκύλο και τις σκνίπες από τις περιοχές υψηλού κινδύνου και χαρτογράφησή τους. Τα στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχει κίνδυνος τα στελέχη που κυκλοφορούν στο περιβάλλον της Κύπρου να συναντηθούν σε κάποιον ξενιστή και να γίνει ανταλλαγή DNA, με αποτέλεσμα την εμφάνιση στελεχών με νέες δυνατότητες μολυσματικότητας και αντοχής στα φάρμακα, αφού και τα δυο είδη του παράσιτου που εντοπίστηκαν: *Leishmania infantum* MON-1 (ζωονόσος που χρησιμοποιεί το σκύλο σαν ξενιστή παρακαταθήκη) και *Leishmania donovani* MON-37 (ανθρωπονόσος που δεν απαιτείται παρεμβολή ζώου αλλά βρέθηκε σε σκύλο), δύνανται να προκαλέσουν σπλαχνική και δερματική λεϊσμανίαση.

Λεπτομερέστερη μελέτη των ειδών των Φλεβοτόμων σαν διαβιβαστές της νόσου στον άνθρωπο και στο σκύλο, η οποία θα επεκταθεί και σε άλλα γεωγραφικά σημεία του νησιού και κατά τη διάρκεια και άλλων χρονικών περιόδων.

Περαιτέρω οροεπιδημιολογικές μελέτες στον ανθρώπινο πληθυσμό για τον εντοπισμό κρουσμάτων από τα δυο είδη του παράσιτου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι λεϊσμανιάσεις είναι μολυσματικές ασθένειες που μεταδίδονται μέσω αιματοφάγου διαβιβαστή ξενιστή, τη σκνίπα και είναι ανθρωπονόσοι ή/ ζωονόσοι. Παρόλο που σε 88 χώρες του κόσμου αποτελούσαν και αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για τη Δημόσια Υγεία οι λεϊσμανιάσεις μέχρι πρότινος κατατάσσονταν στις πλέον «παραμελημένες» νόσους και δεν θεωρούνταν απειλή για το Δυτικό Κόσμο (http://www.who.int/tdr/diseases/leish/).

Η Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (ΣΛ) του ανθρώπου, η οποία αποτελεί την πιο επιθετική μορφή της νόσου και η οποία είναι θανατηφόρος αν δεν δοθεί έγκαιρα φαρμακευτική αγωγή στο 95% των περιπτώσεων, στην Ευρώπη προκαλείται από το είδος *Leishmania infantum (L. infantum).* Η ΣΛ από *L. infantum* είναι ενδημική σε όλες τις χώρες της Νότιας Ευρώπης με οροθετικότητα στα σκυλιά που φθάνει μέχρι και 25% και 700 αυτόχθονα ανθρώπινα κρούσματα τον χρόνο (Dujardin *και συν.,* 2008). Οι ραγδαίες μεταβολές των περιβαλλοντολογικών και κλιματολογικών συνθηκών, τόσο σε παγκόσμιο όσο και σε περιφερειακό επίπεδο, επηρεάζουν τους ενδογενείς παράγοντες της νόσου (αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή-παράσιτου και εντόμου διαβιβαστή) με επιπτώσεις στην επιδημιολογία της. Τα κρούσματα τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί ραγδαία και η νόσος εξαπλώθηκε προς Βορρά σε νέες περιοχές ενδημικών χωρών, όπως η Ιταλία (Koechler *και συν.,* 2002, Gradoni *και συν.,* 2003, Gramiccia και Gradoni, 2005, Ferroglio *και συν.,* 2006, Maroli *και συν.,* 2008), και εισήχθη σε νέες χώρες, όπως η Ουγγαρία και η Γερμανία. Έτσι, η (επαν)-εμφάνιση και εξάπλωση της ΣΛ αποτελεί απειλή για τη Δημόσια Υγεία και στο Δυτικό Κόσμο.

Ο σκύλος αποτελεί την κύρια αποθήκη/ δεξαμενή της *L. infantum* στη φύση, του μόνου σπλαχνοτροπικού είδους που ενδημεί στην Ευρώπη. Σήμερα η λεϊσμανίαση στο σκύλο από *L. infantum* είναι ίσως το συχνότερο λοιμώδες νόσημα στην Κύπρο και στις άλλες παραμεσόγειες χώρες της Ευρώπης και στην Πορτογαλία, όπου το ποσοστό των ορολογικά ή/και PCR θετικών ζώων στο συνολικό πληθυσμό ενδέχεται να προσεγγίζει το 80% (Dereure *και συν.*, 1999, Solano-Gallego *και συν.*, 2001).

Στην Κύπρο, ένα νησί στο όριο της Ευρώπης με την Ασία και την Αφρική, η ΣΛ θεωρείτο μέχρι πρότινος ασθένεια των σκύλων, καθώς δεν υπήρχε επίσημη

αναφορά ανθρώπινων περιστατικών μέχρι και το 2005. Η λεϊσμανίαση του σκύλου ήταν ευρέως διαδεδομένη πριν από το 1945 (Minter και Eitrem, 1989) και ο *Phlebotomus tobbi* (*P. tobbi*) ήταν το είδος της σκνίπας που ενοχοποιήθηκε για την μετάδοση της *L. infantum* (Adler, 1945, Leger *και συν.,* 2000). Η νόσος σχεδόν εξαφανίστηκε λόγω της μείωσης του αριθμού των Φλεβοτόμων κατά την διάρκεια της εκστρατείας για τον έλεγχο της ελονοσίας το 1940-1950 (Constantinou, 1998) και της ελάττωσης του πληθυσμού των σκυλιών στο νησί από 46,000 σε 6,000 κατά την προσπάθεια ελέγχου της Εχινοκοκκίασης το 1970-1975 (Polydorou, 1984). Οι ενέργειες αυτές είχαν σαν αποτέλεσμα να παραμείνουν ελεύθερες από τη νόσο οι περιοχές που ελέγχονται από την Κυπριακή Δημοκρατία για πάνω από 20 χρόνια (Deplazes *και συν.,* 1998, Leger *και συν.,* 2000, Leger και Depaquit, 2008). Η Κύπρος κατέστη μια λανθάνουσα εστία λεϊσμανίασης η οποία όμως τώρα επανενεργοποιείται λόγω της ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού των σκυλιών (100,000) και των Φλεβοτόμων. Σαν επακόλουθο, το 1996 καταγράφηκαν ξανά κρούσματα στα σκυλιά στις παράκτιες περιοχές με μολυσματικό παράγοντα την *L. infantum* MON-1 (Deplazes *και συν.,* 1998, Leger *και συν.,* 2000). Παρά τα ψηλά ποσοστά κρουσμάτων στα σκυλιά που καταγράφηκαν, (Adler, 1945, Minter και Eitrem, 1989, Leger *και συν.,* 2000) δεν διενεργήθηκε στο παρελθόν καμία έρευνα σχετικά με την λεϊσμανίαση του ανθρώπου και μόνο δύο ανθρώπινα κρούσματα είναι γνωστά από το 1935 (Minter και Eitrem, 1989, Deplazes *και συν.,* 1998).

Σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η επιδημιολογική διερεύνηση της λεϊσμανίασης στην Κύπρο, στο σκύλο και στον άνθρωπο, για τον έλεγχο και την επιτήρηση της νόσου και η ανάπτυξη ενός ικανού συστήματος ενεργού επιτήρησης της ασθένειας, με σκοπό το φραγμό μετάδοσης της στον άνθρωπο και την παρεμπόδιση της εξάπλωσης της στο σκύλο.

Η έρευνα σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε έτσι ώστε να εντοπιστούν οι περιοχές με το υψηλότερο ποσοστό κρουσμάτων στα σκυλιά, οι περιοχές δηλαδή με τον μεγαλύτερο κίνδυνο για τη μετάδοση της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο και οι περιοχές με το χαμηλότερο ποσοστό ή αρνητικές, περιοχές δηλαδή με χαμηλό κίνδυνο για τη μετάδοση της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο. Σε αυτές τις περιοχές πραγματοποιήθηκε οροεπιδεμιολογική έρευνα στον άνθρωπο και έγιναν συλλήψεις Φλεβοτόμων με σκοπό την σύγκριση των ειδών που παρατηρούνται στις τρεις περιοχές.

Για τον σκοπό αυτό, οι ελεύθερες περιοχές της Κύπρου, έκτασης 5,896 τετραγωνικών χιλιόμετρων, χωρίστηκαν σε χάρτη σε 82 ίσα τετράγωνα. Στο κάθε τετράγωνο δόθηκε αριθμός 1-82 και με κλήρωση επιλέχθηκαν τυχαία 30 τετράγωνα. Μια περιοχή-τετράγωνο μπορούσε να περιλαμβάνει 1,2,3 ή και περισσότερα χωριά ή πόλεις. Από αυτά επιλέχθηκαν, με κλήρωση, τα χωριά στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες στα σκυλιά και η επιλογή του αριθμού των χωριών σε κάθε περίπτωση ήταν ανάλογη του πληθυσμού των σκυλιών ώστε να περιλαμβάνει τουλάχιστο 200 ζώα ανά τετράγωνο.

Από σκυλιά που ζούσαν στα 30 τετράγωνα ελήφθησαν συνολικά δείγματα από 900 ζώα (30 σκυλιά ανά τετράγωνο). Για το σκοπό αυτό, οι οικίες που θα συμπεριλαμβάνονταν στη μελέτη, από τα χωριά των 30 τετραγώνων, επιλέγηκαν μετά από κλήρωση. Τα σκυλιά εξετάστηκαν κλινικά και ελήφθησαν δείγματα περιφερικού αίματος (900 δείγματα) και πολφός λεμφογαγγλοίων στις περιπτώσεις που διαπιστώθηκε διόγκωση των λεμφαδένων (22 δείγματα). Για κάθε σκυλί συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο με όλα τα προσωπικά, επιδημιολογικά και κλινικά του στοιχεία. Σοβαρά κλινικά συμπτώματα διαγνώστηκαν σε 18 σκυλιά, στα οποία έγινε ευθανασία μετά από επιβεβαίωση σπλαχνικής λεϊσμανίασης με ορολογικές και μοριακές εξετάσεις και προσκομίστηκε η σπλήνα για καλλιέργεια, μετά από τη σύμφωνη γνώμη του ιδιοκτήτη. Επιπρόσθετα εξετάστηκαν 2056 δείγματα ορών αίματος από σκυλιά από όλες τις ελεύθερες περιοχές της Κύπρου, που ελήφθησαν από ιδιώτες κτηνίατρους από ζώα για σκοπούς ελέγχου ρουτίνας.

Μετά την οροεπιδημιολογική έρευνα στα σκυλιά, επιλέγηκαν δύο τετράγωνα με ψηλά ποσοστά οροθετικότητας, 25% και 29% (μεγαλύτερος κίνδυνος για τους ανθρώπους) και ένα τετράγωνο με μηδενικό ποσοστό (μικρός κίνδυνος) για να πραγματοποιηθεί η επιδημιολογική μελέτη στον ανθρώπινο πληθυσμό. Με την συνεργασία των Ιατρικών Υπηρεσιών και Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας του Υπουργείου Υγείας, γιατροί από τα τοπικά Νοσοκομεία έλαβαν δείγματα αίματος από άτομα που κατοικούσαν μόνιμα σε αυτά τα τρία τετράγωνα (200 ανά τετράγωνο, ανεξάρτητα εθνικότητας, ηλικίας ή κατάστασης υγείας) που επισκέφτηκαν τα τοπικά ιατρικά κέντρα για οποιονδήποτε λόγο. Η επιλογή των ατόμων για σκοπούς δειγματοληψίας έγινε τυχαία και μετά τη γραπτή τους συγκατάθεση. Για κάθε άτομο συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο με όλα τα επιδημιολογικά και κλινικά του στοιχεία. Επιπρόσθετα δείγματα αίματος (35 δείγματα), δείγματα ιστών δέρματος (4) και

δείγματα μυελού των οστών (4) στάλθηκαν στο Εργαστήριο από 35 ασθενής με ύποπτα για λεϊσμανίαση κλινικά συμπτώματα (ψηλός παρατεινόμενος και επιμένων πυρετός ή δερματικές αλλοιώσεις χωρίς τάση για ίαση) από 3 Νοσοκομεία από διαφορετικές πόλεις της χώρας.

Πραγματοποιήθηκε σύλληψη Φλεβοτόμων κατά το διάστημα Μαΐου - Οκτωβρίου 2006. Οι Φλεβοτόμοι παγιδεύτηκαν ζωντανοί με τη χρήση CDC φωτεινών παγίδων οι οποίες τοποθετήθηκαν στις τρεις περιοχές μελέτης αλλά και σε άλλες περιοχές, συνολικά σε 20 χωριά με ή χωρίς ανθρώπινα περιστατικά και με ή χωρίς περιστατικά στα σκυλιά, Οι παγίδες τοποθετήθηκαν και λειτούργησαν για μία ή περισσότερες νύκτες κοντά σε καταφύγια ζώων από το σούρουπο έως και νωρίς το πρωί. Η ταυτοποίηση των Φλεβοτόμων έγινε με βάση τις κλείδες μορφολογίας.

Τα 900 δείγματα ορών αίματος από τα σκυλιά και τα 635 δείγματα ορών αίματος από τους ανθρώπους εξετάστηκαν με την τεχνική της ELISA για παρουσία IgG αντισωμάτων έναντι της Λεϊσμάνια. Τα ποσοστά οροθετικότητας υπολογίστηκαν αποκλειστικά με βάση τα αποτελέσματα της ELISA ούτως ώστε να είναι συγκρίσιμα με προηγούμενες εργασίες στην Κύπρο (Deplazes *και συν.*, 1998). Όλα τα θετικά δείγματα εξετάστηκαν περαιτέρω με την τεχνική: α) του Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (IFAT) και χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα anti-human ή anti-dog anti- IgG αντίστοιχα. β) της ηλεκτροσυναίρεσης (ES) που αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη ορολογική δοκιμασία η οποία μπορεί να προσδιορίσει οξεία λοίμωξη με την ανίχνευση του ειδικού τόξου 4-24 για τη *Leishmania*. Τα επιπλέον 2056 δείγματα ορών αίματος εξετάστηκαν μόνο με την τεχνική της ELISA.

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) εφαρμόστηκε για την εξέταση των 35 δειγμάτων περιφερικού αίματος, δέρματος και/ή μυελού των οστών από ανθρώπους και για την εξέταση περιφερικού αίματος, πολφού λεμφογαγγλοίων και βιοψίας σπλήνας και από τα 900 τυχαία δείγματα από σκυλιά, ανάλογα με την διαθεσιμότητα τους.

Έγιναν προσπάθειες για απομόνωση του παράσιτου από τα βιολογικά δείγματα που προήλθαν από τους 35 ασθενείς και τα 900 σκυλιά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο καλλιεργητικά υλικά: το NNN και το RPMI 1640 (World Health Organization, 1991). Τα στελέχη που απομονώθηκαν τυποποιήθηκαν με δύο μεθόδους: α) την Πολυεστιακή Ισοενζυμική Ηλεκτροφόρηση με τη χρήση 15 ενζυματικών συστημάτων (Rioux *και συν.*, 1990) και β) τη χρήση του γονιδιακού

δείκτη *K26* (*K26*-PCR based assay) ο οποίος διαχωρίζει είδη/υποείδη του συμπλέγματος *L. donovani*, βάση του μεγέθους του *K26*-αλληλόμορφου (Haralambous *και συν.,* 2008).

Η οροθετικότητα στα σκυλιά υπολογίστηκε για κάθε ένα από τα 30 τετράγωνα και για κάθε μία από τις 5 επαρχίες και η χαρτογράφηση έγινε με την χρήση του λογισμικού συστήματος γεωγραφικής πληροφόρησης (GIS, ArcGIS 9.2). Η πιθανή σχέση μεταξύ οροθετικότητας των σκυλιών και θετικότητας στην PCR και δέκα πιθανών παραγόντων κινδύνου εκτιμήθηκαν αρχικά με την χρήση του X^2 (chi-squared test) και μονομεταβλητών λογιστικών μοντέλων οπισθοδρόμισης (univariate logistic regression models). Οι παράγοντες κινδύνου που λήφθηκαν υπόψη ήταν οι εξής: η γεωγραφική προέλευση, η εποχή δειγματοληψίας, η χρήση των σκυλιών, το φύλο, η ηλικία, το βάρος, το χρώμα του τριχώματος, το μήκος του τριχώματος, η παρουσία εκτοπαράσιτων και η παρουσία τριών το λιγότερο από τα ακόλουθα συμπτώματα λεϊσμανίασης (διόγκωση των λεμφαδένων, αλωπεκία, παραμόρφωση των νυχιών, επίσταξη, οφθαλμικές αλλοιώσεις, σπληνομεγαλία). Ακολούθως προσαρμόστηκε ένα πολυμεταβλητό λογιστικό μοντέλο οπισθοδρόμισης (multivariable logistic regression model) που περιέλαβε και τους εννέα παράγοντες κινδύνου και επιλέγηκαν διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη του τελικού μοντέλου πρόβλεψης.

Από τα 900 σκυλιά, 14.9% ήταν θετικά με την τεχνική ELISA, 11.8% με την τεχνική IFAT, 9.1% με την τεχνική της ηλεκτροσυναίρεσης, 25% με PCR και 6.9% με καλλιέργεια. Σε ορισμένα τετράγωνα η οροθετικότητα έφτασε το 33.3%. Παράσιτα απομονώθηκαν από αίμα (25 στελέχη), από λεμφαδένες (19), από σπλήνα (18) 62 σκυλιών, 9 από τα οποία ήταν φαινομενικά υγιή και οροαρνητικά. Όλα, εκτός από τρία σκυλιά με θετική καλλιέργεια για Λεϊσμάνια, ήταν θετικά με την τεχνική της PCR. Από τα επιπρόσθετα 2056 σκυλιά που εξετάστηκαν, 402 (19.6%) βρέθηκαν οροθετικά στην ELISA.

Η τυποποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν από τα σκυλιά έδειξε ότι 61/62 στελέχη ήταν *L. infantum* MON-1 και 1/62 *L. infantum* MON-98 (Rioux *και συν.*, 1990). Επιπρόσθετα από ένα σκύλο τυποποιήθηκαν ταυτόχρονα *L. infantum* MON-1/*L. donovani* MON-37 (Antoniou *και συν.,* 2008).

Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε ότι η γεωγραφική προέλευση του σκύλου αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου οροθετικότητας και θετικότητας στην PCR,

με την επαρχία Πάφου (επαρχία με 4/6 ανθρώπινα περιστατικά) να αντιμετωπίζει τον μεγαλύτερο κίνδυνο και για τα δύο. Όμως, η εποχή δειγματοληψίας ήταν εξίσου σημαντική στατιστικά για την οροθετικότητα, με αύξηση του κινδύνου την άνοιξη, το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Η χρήση του σκύλου, το βάρος, το χρώμα, το μήκος του τριχώματος και το φύλο βρέθηκαν να μην σχετίζονται σημαντικά με την οροθετικότητα.

Τα 600 άτομα από τα τρία υπό μελέτη τετράγωνα-περιοχές βρέθηκαν οροαρνητικά στην ELISA. Από τους 35 ασθενείς με ύποπτα κλινικά συμπτώματα από τα Νοσοκομεία (ψηλός επιμένων πυρετός ή δερματικές αλλοιώσεις που δεν θεραπεύονταν), δύο ασθενείς ανέπτυξαν ΣΛ και τέσσερις ανέπτυξαν Δερματική Λεϊσμανίαση (ΔΛ). Οι δύο ασθενείς με ΣΛ ήταν θετικοί στην ELISA και IFAT (τίτλοι αντισωμάτων και στους δύο: 1/200) και από τους τέσσερις ασθενείς με ΔΛ ένας είχε αντισώματα (στην ELISA και IFAT, τίτλος αντισωμάτων 1/400). Απομόνωση του παράσιτου έγινε από 5/6 ασθενείς. Τα 5 στελέχη τυποποιήθηκαν σαν *Leishmania donovani* MON-37 με Πολυεστιακή Ισοενζυμική Ηλεκτροφόρηση (MLEE, Rioux *και συν.,* 1990). Και τα έξι στελέχη τυποποιήθηκαν, με την *K26*-PCR based assay που διαχωρίζει είδη/υποείδη του συμπλέγματος *Leishmania Donovani* (*L. donovani*), βάση του μεγέθους του *K26*-αλληλόμορφου (Haralambous *και συν.,* 2008), σαν *L. donovani*.

Από τους 1,716 Φλεβοτόμους που παγιδεύτηκαν στα 20 χωριά, οι 649 ήταν γένους αρσενικού και 1067 θηλυκού και κατατάχθηκαν σε 10 διαφορετικά είδη (υψόμετρο περιοχών που μελετήθηκαν: 37-176μ). Οι Φλεβοτόμοι ανήκαν στα είδη: 1,512 *Phlebotomus spp.* και 204 *Sergentomyia spp.* Ο *P. papatasi* βρέθηκε σε όλα σχεδόν τα χωριά που μελετήθηκαν (18/20), ο *P. tobbi* σε 14/20, ο *P. galilaeus* σε 7/20, ο *P. sergenti* σε 4/20, ο *P. alexandri* σε 1/20, ο *P. mascittii* σε 10/20 και ο *P. economidesi* σε 1/20.

Παρά το γεγονός ότι στην Κύπρο υπάρχουν οι ξενιστές που μεταδίδουν την Λεϊσμάνια σε σκυλιά και ανθρώπους (Deplazes *και συν.*, 1998, Leger *και συν.,* 2000, Antoniou *και συν.,* 2008) παραμένει αναπάντητο το ερώτημα γιατί δεν υπάρχουν ανθρώπινα κρούσματα ΣΛ ή ΔΛ από *L. infantum.* Στην Κύπρο η λεϊσμανίαση στα σκυλιά είναι πολύ διαδεδομένη, με την οροθετικότητα να έχει σχεδόν εννιαπλασιαστεί, τα τελευταία δέκα χρόνια (ο μέσος όρος οροθετικότητας στα τυχαία δείγματα από σκυλιά αυξήθηκε από 1.7% (Deplazes *και συν.,* 1998) σε 14.9%). Η αύξηση της

οροθετικότητας καταδεικνύει ότι το παράσιτο κυκλοφορεί ενεργά, χρησιμοποιώντας σαν ενδιάμεσους ξενιστές αυτόχθονα είδη Φλεβοτόμων που βρέθηκαν στα περισσότερα μέρη της Κύπρου (Antoniou *και συν.,* 2009). Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με την παρούσα γεωγραφική διασπορά της ασθένειας η οποία δεν περιορίζεται πλέον στις παράλιες περιοχές (Adler S, 1945, Deplazes *και συν.,* 1998). Η οροθετικότητα στις δύο ομάδες σκυλιών που ελέγχθηκαν ήταν συγκρίσιμη: 14.9% στα 900 τυχαία επιλεγμένα σκυλιά και 19.6% στα επιπλέον 2,056 σκυλιά που στάλθηκαν από κτηνίατρους.

Στις δύο περιοχές από τις οποίες έγιναν δειγματοληψίες, και οι οποίες είχαν 25% και 28.6% οροθετικότητα στα σκυλιά, τα 400 άτομα που ελέγχθηκαν (από τους 21,967 μόνιμους κατοίκους σύμφωνα με την καταγραφή του 2001: www.mof.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf) ήταν όλοι μόνιμοι κάτοικοι των περιοχών μελέτης με μέσο όρο ηλικίας τα 52.7 έτη, γεγονός που ευνοεί την επαφή τους με το παράσιτο (Moral *και συν.,* 2002). Εν τούτοις οι εξετάσεις που έγιναν στον ορό αίματος των κατοίκων των περιοχών αυτών, με την τεχνική της ELISA, δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά οι δύο ασθενείς με ΣΛ και ένας από τους τέσσερις με ΔΛ από *L. donovani* MON-37 ήταν οροθετικοί με την ίδια τεχνική/αντιδραστήρια ELISA, στην οποία χρησιμοποιείται ολικό αντιγόνο *L. infantum.* Ως εκ τούτου, παρά το γεγονός ότι ο σχεδιασμός της έρευνας αναμενόταν να οδηγήσει σε ένα ποσοστό οροθετικών ατόμων, τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να τύχουν προσεκτικού χειρισμού και πρέπει να γίνουν περισσότερες εξετάσεις πριν εξαχθεί το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν οροθετικά άτομα στις περιοχές υψηλού κινδύνου.

Η απουσία ασθενών με ΣΛ ή ΔΛ από *L. infantum,* παρά το ψηλό ποσοστό οροθετικότητας στα σκυλιά, αποτελεί παράδοξο: χαμηλός κίνδυνος για μετάδοση της *L. infantum* στον άνθρωπο συγκρινόμενη με τον ψηλό κίνδυνο που υπάρχει για τη μετάδοση της L. *infantum* στα σκυλιά, γεγονός που δεν παρατηρείται στις γύρω χώρες όπου η λεϊσμανίαση στα σκυλιά και η ΣΛ από *L. infantum* στον άνθρωπο εμφανίζονται ταυτόχρονα (Alvar *και συν.,* 1997, Le Fichoux *και συν.,* 1999, Hide *και συν.*, 2001, Dujardin *και συν.,* 2008). Σε αντίθεση, η επιδημιολογία της λεϊσμανίασης στο βόρειο τμήμα της Κύπρου είναι διαφορετική, με τα περιστατικά ΔΛ να παρουσιάζουν αύξηση, από δύο τον χρόνο το 1985, σε 36 το 1990 στον Τουρκοκυπριακό πληθυσμό (Desjeux P, 1991) και ένα περιστατικό ΣΛ το 1989

(Minter και Eitrem, 1989) για το οποίο ενοχοποιήθηκε η *L. infantum* (Howard *και συν.,* 1992). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με την παρουσία του *P. neglectus,* που αποτελεί τον συνήθη ενδιάμεσο ξενιστή της *L. infantum* στην ανατολική Μεσόγειο, στην βόρεια αλλά όχι στη νότια Κύπρο (Leger *και συν.,* 2000, Rastgeldi *και συν.,* 2005). Αυτό το είδος αναφέρεται βόρεια των βουνών της Κερύνειας. Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι οι σκνίπες δεν μπορούν να πετάξουν σε μεγάλες αποστάσεις και συνήθως καλύπτουν αποστάσεις μόνο μερικών εκατοντάδων μέτρων από τα μέρη όπου ξεκουράζονται, η διασπορά του *P. neglectus* προς τον Νότο εμποδίζεται κατά ένα μέρος από την ορεινή υφή του νησιού, με υψόμετρο μέχρι και 1024 μέτρα στην περιοχή αναφοράς (Τμήμα γεωλογικής Επισκόπησης της Κύπρου). Επίσης η απουσία του από τον Νότο είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στην βιογεολογική/ μικροκλιματική ποικιλομορφία της Κύπρου (Antoniou *και συν.,* 2009). Η άποψη αυτή υποστηρίζεται ακόμη περισσότερο από το γεγονός ότι ενώ οι πληθυσμοί από τα δύο διαιρεμένα μέρη του νησιού έρχονται σε επαφή, ιδιαίτερα μετά το 2003 όπου οι άνθρωποι μπορούν να περνούν ελεύθερα από το ένα μέρος στο άλλο διαμέσου της "πράσινης γραμμής", στο νότιο μέρος του νησιού δεν δηλώθηκε κανένα κρούσμα ΔΛ ή ΣΛ λόγω *L. infantum*.

Το γεγονός ότι στην Συρία η *L. donovani* MON-3 απομονώθηκε από τον *P. tobbi* (Rioux *και συν.,* 1998) θεωρείται ότι ο *P. tobbi* αποτελεί ξενιστή ικανό να μεταδώσει την *L. donovani* και την *L. infantum*. Η απομόνωση από ένα σκυλί και των δύο ειδών, παράλληλα, (Antoniou *και συν.,* 2008) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο/οι Φλεβοτόμοι διαβιβαστές της νόσου τσιμπούν τόσο ανθρώπους όσο και σκυλιά. Αν το είδος *P. tobbi* ή *P. galilaeus* είναι ο/οι διαβιβαστές των δυο ειδών Λεϊσμάνιας που συναντάμε στην Κύπρο είναι κάτι που πρέπει να διευκρινιστεί με μελλοντικές έρευνες, παρά το γεγονός ότι τα μέχρι τώρα ευρήματα ενοχοποιούν τον *P. tobbi*.

Από τη στιγμή που οι Φλεβοτόμοι στην Κύπρο είναι και ανθρωπόφιλοι, γεγονός που υποστηρίζεται επιπλέον από το γεγονός ότι ένας αριθμός τουριστών που επισκέφτηκαν την Κύπρο, μεταξύ άλλων ενδημικών χωρών, ανάπτυξαν ΣΛ (Wheatley *και συν.,* 1983, Valkoun *και συν.,* 1985) η απουσία ανθρώπινων κρουσμάτων ΣΛ και ΔΛ από *L. infantum* θα μπορούσε να εξηγηθεί με την πιθανότητα να υπάρχει κάποιος μηχανισμός ο οποίος προστατεύει τους Έλληνες Κύπριους από την *L. infantum,* αλλά όχι από την *L. donovani* η οποία προκάλεσε ΔΛ και όχι ΣΛ σε υγιή άτομα, όπως συμβαίνει στην Σρι Λάνκα (Nawaratna *και συν.,* 2007). Έχει

καταδειχθεί ότι παράγοντες που συνδέονται με τον ξενιστή μπορεί να καθορίζουν την εξέλιξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ ξενιστή-παράσιτου και ότι παράγοντες που σχετίζονται με την οικογένεια και την εθνικότητα των ατόμων μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση τη ΣΛ (Bucheton *και συν.,* 2002). Τα δύο ανθρώπινα περιστατικά ΣΛ από *L. donovani* αφορούσαν και στα δύο μόνιμους κατοίκους Κύπρου (Antoniou *και συν.,* 2008) από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές χωρίς καμιά σύνδεση, μη Ελληνοκύπριους (ένα αθίγγανο βρέφος ηλικίας 9 μηνών με συν λοίμωξη με Epstein Barr Virus (Koliou *και συν.,* 2008) και ένα Βρετανό άνδρα ηλικίας 73 ετών χωρίς άλλα προβλήματα υγείας). Τα τέσσερα περιστατικά αφορούσαν όλα Ελληνοκύπριους, υγιή άτομα, ηλικίας 45 έως 55 ετών τα οποία ανέπτυξαν ΔΛ, την λιγότερο σοβαρή μορφή της νόσου. Η ανάλυση μικροδοριφορικών αλληλουχιών έδειξε ότι η γενετική δομή των στελεχών που απομονώθηκαν από τους 6 αυτούς ασθενείς δεν συνδέεται με την κλινική εκδήλωση της λεϊσμανίασης (Alam *και συν.,* 2009).

Η Κύπρος αποτελεί ένα μοναδικό φαινόμενο όπου υπάρχουν δύο ξεχωριστοί παράλληλοι κύκλοι μετάδοσης της λεϊσμανίασης. Στα σκυλιά με τη *L. infantum* MON-1 και στους ανθρώπους με τη *L. donovani* MON-37. Πρόσφατα στοιχεία με την ανάλυση μικροδοριφορικών αλληλουχιών (Alam *και συν.,* 2009) έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυπριακών στελεχών MON-37 και των στελεχών MON-37 από την Ινδία (Moreno G, 1989), το Ισραήλ (Schnur *και συν.,* 2001), τη Σρι Λάνκα (Karunaweera *και συν.,* 2003) και την Κένυα (Moreno και συν., 1986). Ως εκ τούτου δεν μπορεί να θεωρήσει κάποιος ότι η παρουσία του στελέχους MON-37 στην Κύπρο είναι πρόσφατη ή ότι σχετίζεται με την είσοδο στο νησί μολυσμένων μεταναστών ή Φλεβοτόμων, τουλάχιστον από τις εν λόγω χώρες (Alam *και συν.,* 2009). Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να αποκλειστεί το σενάριο ότι οι Κύπριοι πιθανόν να μολύνθηκαν από παράσιτα τα οποία εισήχθησαν με μολυσμένους ανθρώπους από ενδημικές περιοχές οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί ακόμα, για παράδειγμα από την Τουρκία.

Τα αποτελέσματα της οροεπιδημιολογικής μελέτης στα σκυλιά οδήγησε την αρμόδια υπηρεσία της Κυπριακής Δημοκρατίας (Κτηνιατρικές Υπηρεσίες) να λάβει μέτρα για την πρόληψη της εξάπλωσης της λεϊσμανίασης (Υπουργικό διάταγμα για τον έλεγχο της ασθένειας στα σκυλιά). Τα μέτρα αυτά θα προστατέψουν τα σκυλιά, όχι όμως και τον ανθρώπινο πληθυσμό στην περίπτωση που οι ασθενείς παίζουν το

ρόλο αποθήκης του παράσιτου (μια και η *L. donovani* είναι ανθρωπονόσος). Για το λόγο αυτό θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για την προστασία του πληθυσμού από το αναδυόμενο αυτό νόσημα διαφορετικά υπάρχει η πιθανότητα η *L. donovani* να εξαπλωθεί γρήγορα, όπως έγινε στη Σρι Λάνκα (Nawaratna *και συν.,* 2007). Η δημιουργία υβριδίων, γεγονός που ήδη έχει καταγραφεί στην Πορτογαλία όπου απομονώθηκε υβρίδιο *L. major/L. infantum* με αυξημένη μολυσματικότητα για τον άνθρωπο (Ravel *και συν.,* 2006), είναι ένα πιθανό σενάριο που μπορεί να επαναληφθεί και στην Κύπρο. Για να αποφευχθεί αυτό, όπως και η εξάπλωση της νόσου, είναι σημαντικό η ασθένεια να συμπεριληφθεί στα προγράμματα επιτήρησης για τη δημόσια υγεία σε Ευρωπαϊκό επίπεδο μια και πιθανοί φορείς υπάρχουν σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες (Myskova *και συν.,* 2007).

"Epidemiological investigation of leishmaniasis in Cyprus: control and surveillance of the disease"

Apostolos Mazeris, DVM

Doctoral thesis, 2009

SUMMARY

Leishmaniases are diseases caused by members of the genus *Leishmania,* protozoan parasites infecting numerous mammal species including humans, and transmitted by the bite of phlebotomine sandflies. Even though, they are endemic in 88 countries in which they consist serious public health problem, leishmaniases are among the most neglected diseases (http://www.who.int/tdr/diseases/leish/).

Visceral leishmaniasis (VL), caused by *Leishmania infantum* (*L. infantum*) in Europe, is the most severe form which, if left untreated, invariably leads to death in 95% of the cases. Visceral leishmaniasis is endemic in all countries of southern Europe with up to 25% seroprevalence in domestic dogs (the reservoir host) and 700 autochthonous human cases per year (Dujardin *et. al.*, 2008). Currently, it appears that the global incidence of human leishmaniases is higher than before: environmental and human behavioural factors contribute to the changing landscape of these diseases, which show a wider geographical distribution than previously known. Autochthonous *Leishmania* transmission is being recorded in traditionally non-endemic areas, such as North part of Italy, Hungary and Germany (Koechler *et al.,* 2002; Gradoni *et al.,* 2003; Gramiccia and Gradoni, 2005; Ferroglio *et al.,* 2006, Maroli *et al.,* 2008).

In nature, dogs are considered to be the main reservoir of *L. Infantum.* Canine leishmaniasis due to *L. Infantum* is, may be, the most frequent infectious disease in Cyprus and the other Mediterranean countries, as well as in Portugal, whereas the percentage of serological or/ and PCR positive animals may reached the percentage of 80% of the whole animal population (Dereure *et al.,* 1999, Solano-Gallego *et al.,* 2001a).

In Cyprus, leishmaniasis has been considered exclusively a veterinary problem. Before 1945, canine visceral leishmaniasis (CanL) was widespread in Cyprus (Minter and Eitrem, 1989) and *Phlebotomus tobbi* (*P. tobbi*) was incriminated as the vector of *L. infantum* (Adler, 1945; Leger *et al.,* 2000). The Malaria eradication campaign, 1940-1950, greatly reduced the sand fly fauna in Cyprus (Constantinou, 1998) whilst dog numbers fell dramatically (from 46,000 to 6,000) as a consequence of the successful anti echinococcosis campaign of 1970-1975 (Polydorou, 1984). These actions resulted in the almost complete eradication of CanL in the government controlled part of the island, which stayed clear of the disease for over 20 years (Leger *et al.,* 2000; Deplazes *et al.,* 1998; Leger and Depaquit, 2008). However, sand fly populations increased and the number of dogs recovered to an estimated 100,000 (17 dogs/km^2) following the end of the two control programmes. As a consequence, CanL re-emerged and dog cases were again recorded in coastal areas in 1996 implicating *L. infantum* MON-1 as the causative agent (Leger *et al.,* 2000; Deplazes *et al.,* 1998). In contrast to the relatively high infection rates observed in domestic dogs (Minter and Eitrem, 1989; Adler, 1945, Leger *et al.,* 2000) no passive or active surveys of human leishmaniasis have been conducted in the past in Cyprus and only two human cases (infantile VL) are known since 1935 (Minter and Eitrem, 1989; Deplazes *et al.,* 1998).

The aim of the study is the epidemiological investigation of leishmaniases in Cyprus, in dogs and humans, for the control and surveillance of the disease. The survey conducted to resolve this was based on the assumption that if there were to be VL cases, they had to be in the areas with the highest dog seroprevalence. To locate these areas, an epidemiological study was carried out on the dog population. A map of Cyprus was divided into 82 equal squares of which 30 were chosen randomly as the study area. Dog seroprevalence revealed the areas with the highest risk for humans. In such two areas, as well as in one with zero dog seroprevalence, a

seroepidemiological study was conducted on the human population and sandfly collections were done to compare species in these three areas.

The Government controlled part of the island, southern Cyprus (Fig.1), covering 5,896 km^2 and comprising five prefectures, was divided into 82 equal arbitrary squares on a map. The squares were given numbers and 30 numbers were drawn from a ballot to select the squares to be included in the study. One or more villages falling in each of the 30 squares, according to dog population size, were chosen so as to have at least 200 dogs per square.

A total of 900 dogs (379 males and 521 females; 719 hunting, 87 guard, 94 companion) living in the 30 areas were sampled (30 dogs per area) during 2005 and 2006. Owned dogs, living permanently in the area irrespective of race, age color or health status were included in the study. To select the dogs, the houses in each village in the study area were given numbers and drawn from a ballot; visited with a government veterinarian and the dog owners were informed about leishmaniasis and asked to participate in the study by providing a written consent. The dogs were examined clinically, peripheral blood (900 samples) and lymph node aspirates when enlarged lymph nodes were observed (22 samples) were collected and personal, epidemiological and clinical data were registered in questionnaires for each dog. Severe leishmaniasis symptoms were diagnosed in 18 dogs, the disease was confirmed by serology and PCR, the dogs were euthanized with the consent of the owner and the spleen provided. In addition, 2,056 dog sera were provided by veterinarians throughout the island for routine testing for leishmaniasis.

The two areas (squares) with high dog seropositivity, 25% and 29% (high risk for humans), and one with no seropositive dogs (low risk) were considered for the human survey. The areas were chosen such as to be located near a local hospital. In collaboration with the Ministry of Health, doctors from local hospitals provided samples from a total of 600 people that lived permanently in these three areas (200 people per area), irrespective of nationality, age or health status, visiting the local hospital for any reason. The people were informed of the study and if agreed to participate they provided a written consent and were examined clinically for symptoms of VL and CL and completed a personal questionnaire with epidemiological and clinical data. The ages of the people providing blood samples ranged from 10 to 88 years, with an average age of 52 years (SD). In addition, blood

(35), skin tissue (4) and bone marrow (4) samples from 35 patients with suspicious symptoms of leishmaniasis (high persisting fever or skin lesions difficult to cure) were provided from hospitals from different cities of the island irrespective of the sampled areas.

Sampling of sand flies was carried out during May to October, 2006. Live sand flies were collected by CDC light traps (Hausherr's Machine Works in Tom's River, New Jersey) from 20 villages with and without human and/or dog cases. The traps were battery operated and placed near animal shelters, at dusk until early morning, near houses with human and/or dog cases (if any in the village) for one or more nights. Species identification was carried out according to morphology based keys.

The 900 dog and the 635 human sera were screened for the presence of *Leishmania* IgG antibodies by ELISA. Seroprevalence measures were derived solely from the ELISA result in order to have comparable results with previous publications on Cyprus (Deplazes *et al.,* 1998). All sera were further tested by the Indirect Immunofluorescence Test (IFAT) using anti-human or anti-dog anti-IgG antibodies accordingly and Electrosyneresis (ES) which is a very sensitive serological test and can identify the acute stage of the disease. The 2,056 extra dog sera were tested only by ELISA.

All 35 patient samples and all 900 random dog samples were tested by polymerase chain reaction (PCR) on peripheral blood, skin and/or bone marrow from patients and blood, lymph node or spleen from dogs, according to availability.

An attempt to culture the parasite was made from biological samples from all the 900 dogs and the 35 patient samples. Two culture media were used: the NNN medium and the RPMI 1640 (World Health Organization, 1991). The isolates were typed by starch gel electrophoresis using 15 enzymatic systems (Rioux *et al.,* 1990) and the *K26* PCR assay(Haralambous *et al.,* 2008).

Dog seroprevalence was estimated for each of the 30 areas and the 5 prefectures and mapped using the geographical information system software (GIS; ArcGIS 9.2). Possible associations between a) dog seropositivity and b) PCR positivity and ten possible risk factors were initially assessed using the chi-squared test and univariate logistic regression models. The risk factors considered were: geographical origin, sampling season, dog use (hunting, companion, guard dog), sex, age, weight, coat colour, length of dog hair, ectoparasite presence and lastly, the

presence of at least three of any of the following CanL symptoms (lymph node swelling, alopecia, onychogryphosis, epistaxis, ocular lesions, splenomegaly). Subsequently, a multivariable logistic regression model was fitted including all nine factors and backwards stepwise selection procedures were used to obtain a final predictive model.

Of the 900 dogs, 14.9% were positive by ELISA, 11.8% by IFAT (at the 1/200 cut off titer and 12% at the 1/100), 9.1% by ES, 6.9% by culture and 25% by PCR. In some squares seropositivity by ELISA reached 33.3%. Of the additional 2,056 dogs tested, 402 (19.6%) were seropositive by ELISA. Parasites were isolated from the blood (25 isolates), lymph node (19) and spleen (18) of 62 dogs, 9 of which were healthy looking seronegative animals. All but three dogs with a positive culture gave a positive PCR. Typing showed 61/62 isolates to be *L. infantum* MON-1 and one *L. infantum* MON-98 (Rioux *et al.,* 1990; Haralambous *et al.,* 2008). In addition, one dog was positive both for *L. infantum* MON-1/*L. donovani* MON-37 (Antoniou *et al.,* 2008).

The statistical analyses showed that geographic location is a high risk factor for a dog to be seropositive and PCR positive with Pafos district to be a high risk area (area with 4/6 human cases). However, the season of sampling is also a high risk factor for a dog to be seropositive and PCR positive with high incidence in spring, summer and autumn. Age, dog use (hunting, guard, companion), gender, weight, coat shade, hair length and presence of ectoparasites were found not to be significantly associated with seropositivity.

All 600 individuals from the three areas under investigation were found seronegative. Of the 35 patients with suspicious symptoms of leishmaniasis, two with high persisting fever developed VL and four, with cutaneous lesions, CL. The VL patients were positive by ELISA and IFAT (both titers 1/200) and only one of the four CL patients had antibodies (by ELISA and IFAT, titer 1/400). PCR was positive in all 6 patients (2 VL from blood sample and 4 CL from skin biopsy) and parasite isolation was made from 5/6 patients. All isolates were typed as *Leishmania donovani* MON-37 by starch gel electrophoresis using 15 enzymatic systems (Rioux *et al.,* 1990) and the *K26* PCR assay (Haralambous *et al.,* 2008).

A total of 1,716 sand flies (649 males and 1067 females), comprising 10 species were collected from the 20 villages; altitude range 37-176m: 1,512 *Phlebotomus* and 204 *Sergentomyia. P. papatasi* was found in almost all areas

studied (18/20), *P. tobbi* in 14/20, *P. galilaeus* in 7/20, *P. sergenti* in 4/20, *P. alexandri* in 1/20, *P. mascittii* in 1/20 and *P. economidesi* in 1/20. Since sampling was not done for the same number of nights and in the same month for each village, the results are reported as presence of species found.

Although it is clear that in Cyprus there are competent vectors for the transmission of *Leishmania* to dogs and humans (Deplazes *et al.,* 1998; Leger *et al.,* 2000) the question why there are no VL or CL cases due to *L. infantum,* remains. CanL is widespread in the island and seroprevalence had an almost nine fold increase in the last 10 years (overall average from 1.7% (Deplazes *et al.,* 1998) to 14.9%). This demonstrates that the parasite is circulating actively, transmitted by autochthonous sand fly species found in most parts of the Republic (Antoniou *et al.,* 2009) and that conditions favor its geographic spread since it is no longer found restricted in coastal areas (Adler, 1945; Deplazes *et al.,* 1998). The seroprevalence found in the two groups of dogs tested: 14.9% in the 900 randomly selected dogs and 19.6% in the 2,056 extra dog sera sent by veterinarians from all over the country, is comparable.

In the two endemic areas sampled, with 25% and 28,6% dog seropositivity, the 400 persons tested (out of the 21,967 registered permanent residents of this area, according to Census 2001; www.mof.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf) were all permanent residents of the study areas with mean age of 52,7 years, factors which favour them coming into conduct with the parasite (Moral *et al.,* 2002). Yet, the ELISA test performed on the human sera did not produce any positives. Nevertheless the two VL and the one/four CL patients due to *L. donovani* MON-37 were seropositive with the same ELISA test, which used *L. infantum* promastigote soluble antigens. Hence, although the planning of the study expected to result a small percentage of seropositives, the negative result needs to be considered with caution and more tests are required before excluding the possibility of missing seropositive individuals.

In the two endemic areas sampled, with 25% and 28,6% dog seropositivity, the 400 persons tested (out of the 21,967 registered permanent residents of this area, according to Census 2001; www.mof.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf) were all permanent residents of the study areas with mean age of 52,7 years, factors which favour them coming into conduct with the parasite (Moral *et al.,* 2002). Yet, the

ELISA test performed on the human sera did not produce any positives. Nevertheless the two VL and the one/four CL patients due to *L. donovani* MON-37 were seropositive with the same ELISA test, which used *L. infantum* promastigote soluble antigens. Hence, although the planning of the study expected to result a small percentage of seropositives, the negative result needs to be considered with caution and more tests are required before excluding the possibility of missing seropositive individuals.

The absence of VL or CL patients due to *L. infantum* despite the high dog seroprevalence is intriguing, suggesting a paradox of a minimal risk of *L. infantum* infections in humans as compared to the high risk observed in dogs in southern Cyprus; a situation not found in the surrounding countries where CanL and VL due to *L. infantum* coexist. On the contrary, reports indicate that the epidemiology of leishmaniasis in the northern part of Cyprus is different, with CL cases increasing from two cases per year in 1985 to 36 in 1990 in the Turkish Cypriot population (Desjeux, 1991) as well as one VL case (Minter and Eitrem, 1989) implicating *L. Infantum* (Howard *et al.,* 1992). This could possibly be explained by the presence of *P. neglectus*, the usual vector of *L. infantum* in the eastern Mediterranean, in northern but not in southern Cyprus (Leger *et al.,* 2000; Rastgeldi *et al.,* 2005). This species is reported north of the Keryneia mountains. Taking into account that sandflies are weak fliers and do not usually disperse more than a few hundred meters from their breeding places, *P. neglectus* spreading towards the south is in part prevented by the mountainous terrain of the island with altitudes up to 1024m in the area concerned (Geological Survey Department of Cyprus). Also, its absence in the south is most probably linked to the biogeological/microclimate diversity of Cyprus (Antoniou *et al.,* 2009). The above are further supported by the fact that, although the populations between the two parts of the island mix, especially after 2003 when people were allowed to cross the “green line” freely, no VL cases due to *L. infantum* have been reported in the southern part.

As *L. donovani* MON-3 was isolated in Syria from *P. tobbi* (Rioux *et al.,*1998) this species is a putative vector of both *L. infantum* and *L. donovani.* The detection of both parasite species in one dog (Antoniou *et al.,* 2008) suggests that a sand fly biting both humans and dogs may be involved and whether this is *P. tobbi* or *P.*

galilaeus needs to be proved by further studies; although findings so far point to *P. tobbi* (Antoniou *et al.,* 2009).

The detection of both parasite species in one dog (Antoniou *et al.,* 2008) suggests that a sand fly biting both humans and dogs may be involved and whether this is *P. tobbi* or *P. galilaeus* needs to be proved by further studies; although findings so far point to *P. tobbi* (Antoniou *et al.,* 2009).

Since a man-biting sandfly exists in Cyprus, confirmed also by a number of tourists visiting Cyprus among other endemic countries who developed VL (Wheatley *et al.,* 1983; Valkoun *et al.,* 1985), the absence of human VL or CL cases due to *L. infantum* may suggest that there is a mechanism protecting the Greek Cypriots from *L. infantum* but not from *L. donovani* which caused CL and not VL in healthy individuals, like in Sri Lanka (Nawaratna *et al.,* 2007). It has been shown that host-related factors may determine the evolution of the host-parasite interactions and that, ethnic and familial factors can play an important role in the distribution of VL (Bucheton *et al.,* 2002). The two human VL cases due to *L. donovani* (a 9 month-old female, gypsy in origin, with Epstein Barr virus co-infection (Koliou *et al.,* 2008) and a 73 year-old British male with no other health complication), both permanent residents of Cyprus (Antoniou *et al.,* 2008) in different geographical areas without any connection, developed severe disease. The other four cases on the other hand, all Greek Cypriots, healthy, 44 to 55 years old (Antoniou *et al.,* 2008) developed CL the less severe form of leishmaniasis. In line with the above, microsatellite analysis showed that the genetic makeup of the strains did not correlate to the clinical manifestation of leishmaniasis.

Thus, the Republic of Cyprus presents a unique situation where two distinct leishmaniasis transmission cycles run in parallel: in dogs with *L. infantum* MON-1 and in humans with *L. donovani* MON-37. Recent data using microsatellites (Alam *et al.,* 2009) showed that there are substantial differences between the MON-37 Cypriot strains and the MON-37 strains from India (Moreno, 1989), Israel (Schnur *et al.,* 2001), Sri Lanka (Karunaweera *et al.,* 2003) and Kenya (Moreno *et al.,* 1986). Thus one cannot assume a very recent introduction by immigrants or infected sand fly vectors in Cyprus at least from the above mentioned countries (Moreno, 1989). However, the scenario that Cypriots were infected in Cyprus by parasites imported by infected people from endemic areas not yet studied, cannot be excluded.

The results of the dog seroepidemiological study led the Cyprus government to take measures to prevent the dispersal of leishmaniasis (decree for monitoring the disease in the dog). These measures however will protect the dog but not the human population if indeed *L. donovani* patients play the role of parasite reservoir. Measures must be taken to protect the population in this emerging disease hot spot otherwise *L. donovani* may spread fast, as it has done in Sri Lanka (Nawaratna *et al.,* 2007). At a time when VL due to *L. infantum* is spreading northwards in Europe (Maroli *et al.,* 2008) the emergence of *L. donovani* MON-37 in a Mediterranean country may result not only in a dramatic change in the epidemiology of leishmaniasis but it could also give the opportunity to the circulating species to generate hybrids (Ravel *et al.,* 2006). To avoid the spread of this species it is crucial that the disease is placed under public health surveillance at the European level since putative vectors occur in many European countries (Myskova *et al.,* 2007).

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: Ερωτηματολόγιο για τη μελέτη της λεϊσμανίασης στα σκυλιά

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήμα Ιατρικής
Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής

Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Τηλ. 2810 394746

WHO Collaborating Center for Research and Training in Mediterranean Zoonoses
Διευθυντής: Ιωάννης Τσελέντης
Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Παρασιτώσεων, Ζωονόσων, και Τροπικών Νόσων

Ερωτηματολόγιο: **ΣΚΥΛΙΩΝ**

Αρ. Ερωτηματολογίου .....

Ημερομηνία δειγματοληψίας ...../...../.....

Το ερωτηματολόγιο συμπληρώθηκε από ……

Δείγμα: αίμα .... σπλήνα .... μυελός των οστών .... λεμφαδένας .... άλλο .....

1. Όνομα ζώου.....
2. Ράτσα ζώου ……
3. Όνομα ιδιοκτήτη…….....
4. Υπογραφή συναίνεσης ιδιοκτήτη.....
5. Τηλέφωνο .....
6. Όνομα κτηνιάτρου…….....
7. Τηλέφωνο .....
8. Περιοχή που ζει το ζώο .....

Ζώο

1. αρσενικό (1)θηλυκό (2) .....
2. ηλικία σήμερα …….....
3. Κιλά ζώου ……
4. Χρώμα ζώου …….....
5. τρίχωμα: 1.κοντό, 2. μέτριο, 3. μακρύ .....
6. Βρέθηκαν τσιμπούρια: Ναι (1), Όχι (2). .....
7. Το ζώο χάνει βάρος: Ναι (1), Όχι (2). .....
8. Έχασε την ενεργητικότητά του: Ναι (1), Όχι (2). ……..
9. Τρώει καλά: Ναι (1), Όχι (2). …..……....
10. Το σκυλί χάνει τρίχωμα, κυρίως γύρω από τα μάτια: Ναι (1), Όχι (2). .....
11. Στο σκυλί εμφανίζονται δερματίτιδες που δεν θεραπεύονται: Ναι (1), Όχι (2).....
12. Στο σκυλί βρέθηκαν διογκωμένοι λεμφαδένες: Ναι (1), Όχι (2). .....
13. Στο σκυλί τα νύχια είναι μεγάλα και παραμορφωμένα: Ναι (1), Όχι (2) .....
14. Το σκυλί έχει πυώδεις εκκρίσεις από τα μάτια: Ναι (1), Όχι (2). .....
15. Τα αυτιά του σκυλιού έχουν πληγές: Ναι (1), Όχι (2). ……

Εργαστηριακή διάγνωση IFAT …….....……..… ημερομ …….

ES …… ημερομ …….

PCR …….. ημερομ …….

Καλλιέρ……..…… ημερομ …….

Το ζώο πήρε θεραπεία; ..... ημερομ …….

Ποια θεραπεία; .....

Παρατηρήσεις:

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Έντυπο ενημέρωσης των κτηνιάτρων για λήψη και αποστολή δειγμάτων στο Εργαστήριο:

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΕ ΣΚΥΛΙΑ

- ΑΙΜΑ

ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ: τουλάχιστον 3 ml αίματος **χωρίς** EDTA , ηπαρίνη ή άλλο αντιπηκτικό

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: τουλάχιστον 3 ml αίματος **χωρίς** EDTA, ηπαρίνη ή άλλο αντιπηκτικό

PCR: τουλάχιστον 3 ml αίματος **με** EDTA

- ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ, PCR: μυελός των οστών **χωρίς** EDTA , ηπαρίνη ή άλλο αντιπηκτικό

- ΛΕΜΦΑΔΕΝΑΣ

Παρακέντηση λεμφαδένα σε άσηπτες συνθήκες

Μεταφορά του δείγματος σε στείρο σωληνάριο με καλλιεργητικό υλικό RPMI (**μετά από συνεννόηση με το Εργαστήριο)** για δοκιμή PCR και καλλιέργεια.

Σε περίπτωση που αποφασισθεί ευθανασία θετικού ζώου, καλό θα ήταν να αποσταλούν στο εργαστήριό μας ολόκληρος ο σπλήνας και/ή λεμφαδένας

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ:

Λήψη του δείγματος σε στείρες συνθήκες και σε στείρο σωληνάριο

Αποστολή του δείγματος σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (με παγοκύστη)

Το δείγμα δεν πρέπει να τοποθετηθεί στην κατάψυξη!!!

Τα δείγματα θα πρέπει να συνοδεύονται από το ερωτηματολόγιο του Πανεπιστημίου Κρήτης και να αποστέλλονται στη διεύθυνση:

Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος

Κτηνιατρικές Υπηρεσίες

Εργαστήριο Ιολογίας (Υπόψη Απόστολου Μαζέρη, Κτηνίατρου)

1417 Λευκωσία Τηλ. +357 22805270/ 284 FAX.+357 22332803

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: Ερωτηματολόγιο για τη μελέτη της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήμα Ιατρικής
Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής

Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Τηλ. 2810 394746

WHO Collaborating Center for Research and Training in Mediterranean Zoonoses
Διευθυντής: Ιωάννης Τσελέντης
Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Παρασιτώσεων, Ζωονόσων, και Τροπικών Νόσων

Ερωτηματολόγιο: **ασθενών με /υποψία λεϊσμανίασης**

Αρ. Ερωτηματολογίου .....

Ημερομηνία δειγματοληψίας ...../...../.....

Το ερωτηματολόγιο συμπληρώθηκε από ……..

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ…….....

ΗΛΙΚΙΑ ……..

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ ……

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ .....…….....…….

ΤΗΛΕΦΩΝΟ .....……

Υπογραφή συναίνεσης εθελοντή.....

ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

- Διαλείπων και παρατεινόμενος πυρετός: ναι (1), όχι (2) ……
- Σπληνομεγαλία, Ηπατομεγαλία: ναι (1), όχι (2) …….....
- Διόγκωση λεμφαδένων: ναι (1), όχι (2) ……

- Χάσιμο βάρους: ναι (1), όχι (2) ……
- Κακουχία: ναι (1), όχι (2) ……
- Διάρροια, Βήχας: ναι (1), όχι (2) ……
- Θρομβοπενία, Λευκοπενία ναι (1), όχι (2) ……
- Χαμηλός αιματοκρίτης, αναιμία: ναι (1), όχι (2) .....…
- STRESS τους τελευταίους μήνες: ναι (1), όχι (2) .....…
- Ανοσοκαταστολή ναι (1), όχι (2) .....…

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

- Σκυλί στο σπίτι: ναι (1), όχι (2) ……
- Σκυλί στη γειτονιά: ναι (1), όχι (2) ……
- Ταξίδια τους τελευταίους 12 μήνες ……
- Αριθμός τσιμπημάτων σκνιπών ή κουνουπιών/ημέρα ……..

Εργαστηριακή διάγνωση IF ……...… ES ……PCR…….Καλλιέρ……..

ΘΕΡΑΠΕΙΑ…….

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: Έντυπο ενημέρωσης των ιατρών για λήψη και αποστολή δειγμάτων στο Εργαστήριο:

Αίτημα για εργαστηριακή εξέταση ασθενή με υποψία λεϊσμανίασης

Ημερομηνία δειγματοληψίας: ...../...../.....

Αίτημα από θεράποντα ιατρό .....

Τηλέφωνο ιατρού: .....

Νοσοκομείο /Κλινική .....

Δείγμα: αίμα με EDTA ..... αίμα χωρίς EDTA ..... μυελός των οστών ..... λεμφαδένας..... άλλο .....

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

- ΑΙΜΑ

ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ: τουλάχιστον 3 ml αίματος **χωρίς** EDTA , ηπαρίνη ή άλλο αντιπηκτικό

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ: τουλάχιστον 3 ml αίματος **χωρίς** EDTA, ηπαρίνη ή άλλο αντιπηκτικό

PCR: τουλάχιστον 3 ml αίματος **με** EDTA

- ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ, PCR: μυελός των οστών **χωρίς** EDTA , ηπαρίνη ή άλλο αντιπηκτικό

- ΛΕΜΦΑΔΕΝΑΣ

Παρακέντηση λεμφαδένα σε άσηπτες συνθήκες

Μεταφορά του δείγματος σε στείρο σωληνάριο με καλλιεργητικό υλικό RPMI (**μετά από συνεννόηση με το Εργαστήριο)** για δοκιμή PCR και καλλιέργεια.

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ:

Λήψη του δείγματος σε στείρες συνθήκες και σε στείρο σωληνάριο

Αποστολή του δείγματος σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (με παγοκύστη)

Λήψη δείγματος από τον ασθενή πριν αρχίσει η θεραπεία, ή αν αυτή ξεκίνησε ήδη, η πληροφορία να αναφέρεται στα στοιχεία του ασθενή.
Το δείγμα δεν πρέπει να τοποθετηθεί στην κατάψυξη!!!

Τα δείγματα θα πρέπει να συνοδεύονται από το ερωτηματολόγιο του εργαστηρίου μας και να αποστέλλονται στη διεύθυνση:

Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος
Κτηνιατρικές Υπηρεσίες
Εργαστήριο Ιολογίας (Υπόψη Απόστολου Μαζέρη, Κτηνίατρου)
1417 Λευκωσία
Τηλ. +357 22805270/ 284
FAX.+357 22332803

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5: Τεχνική ELISA

Διαδικασία εκτέλεσης της δοκιμής με βάση το τεχνικό εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας (Bordier Affinity Products SA, Swizerland).

1. Πλήρωση των βοθρίων της πλάκας μικροτιτλοδότησης με διάλυμα TBS-Tween (TBS- Tw) αραιωμένο 10X.
2. Επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Απόρριψη του διαλύματος TBS- Tw.
4. Προσθήκη στο πρώτο βοθρίο της πλάκας μικροτιτλοδότησης 100 μl TBS- Tw (no-serum blank).
5. Προσθήκη στα επόμενα τρία βοθρία 100 μl από τον αραιωμένο (1/20) αρνητικό, ασθενώς θετικό (cut off) και θετικό μάρτυρα αντίστοιχα.
6. Προσθήκη 100μl από τους υπό εξέταση ορούς αραιωμένους 1/20 στα εναπομείναντα βοθρία.
7. Κάλυψη της πλάκας μικροτιτλοδότησης με κολλητική ταινία και επώαση για 30 min στους 37°C.
8. Ξέπλυμα της πλάκας μικροτιτλοδότησης 4X με το διάλυμα ξεπλύματος (αραιωμένο 10X).
9. Προσθήκη 100μl από το διαλυμένο σύζευγμα (1/ 51) σε κάθε βοθρίο της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
10. Κάλυψη της πλάκας μικροτιτλοδότησης με κολλητική ταινία και επώαση για 30 λεπτά στους 37°C.
11. Ξέπλυμα της πλάκας μικροτιτλοδότησης 4X με το διάλυμα ξεπλύματος.
12. Προσθήκη 100μl από το έτοιμο για χρήση υπόστρωμα σε κάθε βοθρίο της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
13. Κάλυψη της πλάκας μικροτιτλοδότησης με κολλητική ταινία και επώαση για 30 λεπτά στους 37°C.
14. Διακοπή της αντίδρασης με την προσθήκη 100μl ειδικού διαλύματος για το σκοπό αυτό (stopping solution) .
15. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στο φασματοφωτόμετρο στα 405 nm.

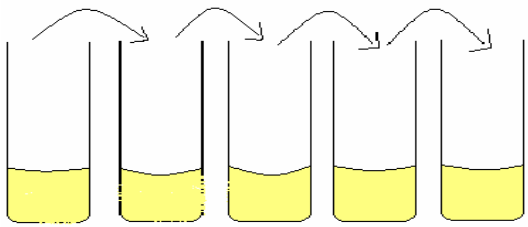
Η δοκιμή ήταν έγκυρη όταν πληρούνταν οι εξής προϋποθέσεις: Η οπτική πυκνότητα του θετικού μάρτυρα μετά από την αφαίρεση της τιμής του blank έπρεπε να είναι > 1.200, αυτή του αρνητικού μάρτυρα μετά από την αφαίρεση της τιμής του blank έπρεπε να είναι < 10% της τιμής του θετικού μάρτυρα και το blank έπρεπε να είχε τιμή < 0.350.

Το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό στην περίπτωση που η οπτική πυκνότητα των υπό εξέταση δειγμάτων παρουσίαζε τιμή χαμηλότερη από το μισό της τιμής της οπτικής πυκνότητας του ασθενούς θετικού μάρτυρα. Το αποτέλεσμα ήταν θετικό στην περίπτωση που η οπτική πυκνότητα των υπό εξέταση δειγμάτων παρουσίαζε τιμή υψηλότερη από το μισό της τιμής της οπτικής πυκνότητας του ασθενούς θετικού μάρτυρα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6: Τεχνική Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (IFAT)

Διαδικασία εκτέλεσης της δοκιμής. Προετοιμασία 5 αραιώσεων για κάθε δείγμα (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600).

1. Στην 1η αραίωση προσθήκη 1000μl Buffer 7,2 και στις υπόλοιπες αραιώσεις από 200μl.
2. Στην 1η αραίωση (1/100) προσθήκη 10μl του υπό εξέταση ορού.
3. Μεταφορά 200μl από την 1η αραίωση στη 2η και συνέχιση με τον ίδιο τρόπο για τις υπόλοιπες.



1/100 1/200 1/400 1/800 1/1600

4. Μεταφορά σε κάθε μια κυψελίδα της πλάκας ανοσοφθορισμού 25 μl από τις αραιώσεις των δειγμάτων.
5. Κάλυψη με μια γυάλινη πλάκα και επώαση στους 37° C για 30 min.
6. Ξέπλυμα με Buffer pH 7.2 και τοποθέτηση των πλακών ανοσοφθορισμού για 10min σε μπανάκι με Buffer pH 7.2.
7. Σκούπισμα της πλάκας, γύρω από τις κυψελίδες, και ακολούθως προσθήκη IgG φθορίζουσας ουσίας στις κυψελίδες (φθορίζουσα: 1ml Buffer 7.2 + 50μl Evans Blue + 10μl Anti-dog IgG.
8. Επώαση για 30min στους 37° C.
9. Ξέπλυμα με Buffer pH 7.2 και τοποθέτηση των πλακών ανοσοφθορισμού για 10min σε μπανάκι με Buffer pH 7.2.
10. Χωρίς να προηγηθεί σκούπισμα της πλάκα, γίνεται προσθήκη γλυκερόλης και καλυπτρίδας.
11. Μικροσκόπηση.

Σε περίπτωση που το δείγμα είναι θετικό μέχρι και την αραίωση 1/1600 η διαδικασία συνεχίζεται, εξετάζοντας επιπλέον άλλες 5 αραιώσεις.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7: Ηλεκτροσυναίρεση (ES)

Διαδικασία εκτέλεσης της δοκιμής.

1. Προσθήκη 300ml Buffer pH 8.2 σε μια σκάφη. Πλύσιμο των ταινιών οξικής κυτταρίνης με Buffer 8.2pH για 30 λεπτά με ανάδευση (rotor).
2. Σημειώνονται με μολύβι στην επιφάνεια των ταινιών οι αποστάσεις από αριστερά προς τα δεξιά (8,5 εκ. & 10,5 εκ.) με την κομμένη γωνία να βρίσκεται υποχρεωτικά στα δεξιά.
3. Στέγνωμα των ταινιών ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί (blotting paper).
4. Τοποθέτηση των ταινιών τεντωμένων με την κομμένη πλευρά πάντα προς τα δεξιά και στερεώνονται με τα ειδικά μανταλάκια.
5. Τρέξιμο στο ρεύμα, στα 75voltage για 10 λεπτά για stabilization.
6. Διακοπή της παροχής ρεύματος. Προσθήκη των ορών στην απόσταση 8.5 εκ. πάνω και κάτω και στην μέση του θετικού μάρτυρα. Τρέξιμο στο ρεύμα για 10 λεπτά.
7. Διακοπή της παροχής ρεύματος. Προσθήκη ~15μl αντιγόνο στην απόσταση 10.5 εκ. Τρέξιμο στο ρεύμα για 2 ώρες.
8. Κόψιμο των ταινιών και τοποθέτηση τους σε NaCl 9% on a rotor για 10 λεπτά.
9. Βάψιμο με Serva Blue για 10 λεπτά on a rotor.

Ξέπλυμα των ταινιών με αποχρωματιστικό υγρό (decolourant: 500ml Methanol + 100lml Acidic Acid + 400ml distilled Water) on a rotor για 10 λεπτά.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8: Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

I. Εξαγωγή DNA

α) Εξαγωγή DNA με βρασμό

1. Προσθήκη 200 μl δείγματος αίματος σε 1.5 ml eppendorf.
2. Πλύσιμο με NaCl 0.9% και φυγοκέντρηση στις 14000στρ/5 min x 3 φορές.
3. Ανασύσταση σε 150 μl ddH_2O.
4. Ανάδευση (pulse-vortexing).
5. Βρασμός για 10 λεπτά.
6. Κατάψυξη στους -20^oC.

β) Εξαγωγή DNA χρησιμοποιώντας το QIAamp DNA Blood Mini Kit

Σημειώσεις

1. Δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προετοιμασία υδατόλουτρου σε 56^oC
3. Protease βρίσκεται στην κατάψυξη
4. Εάν έχει εμφανιστεί ίζημα στο AL, γίνεται διάλυση στους 56^oC

Μέθοδος

1. Προσθήκη 20μl QIAGEN Protease (or Proteinase K) στον πυθμένα ενός 1.5ml eppendorf (**Προσοχή: η προσθήκη του Buffer AL γίνεται πάντα μετά την προσθήκη του δείγματος**).
2. Προσθήκη 200μl δείγματος (ολικό αίμα, πλάσμα, ορός, άλλα βιολογικά υγρά ή $5x10^6$ λεμφοκύτταρα σε 200μl PBS).
   (Εάν το δείγμα είναι λιγότερο από 200μl, συμπληρώνεται με PBS)
3. Προσθήκη 200μl Buffer AL. Ανάδευση για 15sec.
   (Το Buffer AL πρέπει να αναμειγνύεται καλά και να σχηματίζει ένα ομοιογενές διάλυμα για να υπάρχει καλύτερο αποτέλεσμα στην λύση των κυττάρων).
4. Εάν το δείγμα είναι πάνω από 200μl τότε αυξάνεται και η ποσότητα της Protease/Proteinase K και του Buffer AL. Δηλαδή, εάν το δείγμα είναι 400μl τότε χρησιμοποιούνται 40μl Protease και 400μl Buffer AL)
5. Επώαση στους 56^oC για 10min.

(DNA yield φτάνει στο maximum μετά από επώαση των 10min στους 56°C. Περισσότερος χρόνος δεν ωφελεί ούτε την ποσότητα ούτε την ποιότητα του DNA).

6. Άμεση φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές.
   (Για να πέσουν τυχών σταγόνες που βρίσκονται στο καπάκι)
7. Προσθήκη 200μl Ethanol 100%, και ακολουθεί δυνατή ανάδευση (Pulse-Vortexing) για 15sec και άμεση φυγοκέντρηση στις 14000στρ για να πέσουν τυχών σταγόνες που βρίσκονται στο καπάκι
   (Εάν το δείγμα είναι πάνω από 200μl τότε αυξάνεται και η ποσότητα του Ethanol. Δηλαδή, εάν το δείγμα είναι 400μl τότε χρησιμοποιούνται 400μl Ethanol)
8. Προσεχτική μεταφορά του μείγματος σε μία QIAamp Spin Column, σε 2ml collection tube χωρίς να βραχεί το καπάκι, κλείνεται και φυγοκεντρείται στις 8000στρ για 1min. Ακολουθεί μεταφορά της QIAamp Spin Column, σε ένα άλλο 2ml collection tube και απορρίπτεται το προηγούμενο.
   (Το καπάκι από κάθε spin column κλείνεται για αποφυγή aerosol formation κατά την φυγοκέντρηση)
9. Ανοίγεται η QIAamp Spin Column και γίνεται προσθήκη 500μl Buffer AW1 χωρίς να βραχεί το καπάκι, το οποίο αφού κλείσει φυγοκεντρείται στις 8000στρ για 1min. Μεταφέρεται η QIAamp Spin Column, σε ένα άλλο 2ml collection tube και απορρίπτεται το προηγούμενο.
   (Δεν χρειάζεται η αύξηση του όγκου του Buffer AW1 εάν το δείγμα είναι πάνω από 200μl)
10. Ανοίγεται η QIAamp Spin Column και γίνεται προσθήκη 500μl Buffer AW2 χωρίς να βραχεί το καπάκι, το οποίο αφού κλείσει φυγοκεντρείται στις 14000στρ για 3min.
11. Μεταφορά της QIAamp Spin Column, σε ένα1.5ml eppendorf και απόρριψη του προηγούμενου. Ανοίγεται η QIAamp Spin Column και γίνεται προσθήκη 200μl distilled water. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και φυγοκέντρηση στις 8000στρ για 1min.

II. Παρασκευή μείγματος αντίδρασης PCR για ανίχνευση Leishmania με την χρήση των LEI T_2, LEI B_4 primers

	Stock	Working	Final	Volumes
PCR Buffer	10X		1X	5μl
dNTPs	100mM	2mM (20μl of each of the dNTPs into 920μl ddH_20)	0.2mM	5μl
$MgCl_2$	25mM		5mM (1.5mM of which is contained in the PCR buffer)	7μl
LEI T_2	100μM	10μM	0.2μM	1μl
LEI B_4	100μM	10μM	0.2μM	1μl
***HotStarTaq*Polymer**	5U/μl		2.5U	0.5μl
ddH2O			Up to 50ml	30.5μl

III. Συνθήκες κυκλοποιητή (Thermal Cycler Conditions)

15 λεπτά στους 95° C

Ακολούθως 40 κύκλοι:*3-step cycling (40 cycles)*

30 δευτ. στους 96° C

30 δευτ. στους 60° C

20 δευτ. στους 72° C

Final Extension 5 λεπτά στους 72° C

IV. Τρέξιμο των προϊόντων της PCR σε τζελ αγαρόζης 1%, στην οποία έχει ενσωματωθεί η χρωστική ethidium bromide.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9: Απομόνωση και καλλιέργεια Leishmania spp

Ι. Από δείγμα αίματος

α) Από ολικό αίμα/μυελό των οστών: σε στείρο σωληνάριο με ηπαρίνη ή EDTA (~3 ml)

1. Προσθήκη 4 ml Histopaque-1077 (Θερμοκρασία δωματίου) σε σωληνάριο falcon 15 ml.
2. Ανάμειξη της ποσότητας του δείγματος αίματος με ίση ποσότητα στείρο PBS και επιστοιβάδευσή του στην επιφάνεια της Histopaque-1077.
3. Φυγοκέντρηση στις 3000στρ/10 min χωρίς φρένο.
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και προσεκτική συλλογή της στοιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων.
5. Μεταφορά των λευκών αιμοσφαιρίων σε 10 ml PBS.
6. Πλύσιμο στις 1800στρ/10 min/ T^o δωματίου x 3 φορές.
7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και ανασύσταση του ιζήματος.
8. Μεταφορά ~200 μl σε σωληνάριο eppendorf για PCR.
9. Προσθήκη 2 ml RPMI 1640 στο υπόλοιπο δείγμα.
10. Μεταφορά 3 σταγόνων σε υποδοχέα κυτταροφυγοκέντρου και φυγοκέντρηση στις 1200στρ/9 min. Στέγνωμα της πλάκας σε T^o δωματίου και βάψιμο με χρώση Giemsa.
11. Τοποθέτηση 0,5 ml δείγματος σε σωληνάριο με υλικό NNN.
12. Τοποθέτηση του υπόλοιπου δείγματος σε μικρή φλάσκα με RPMI 1640.
13. Εγκατάσταση των καλλιεργειών σε επωαστικό κλίβανο 26° C.
14. Έλεγχος των καλλιεργειών κάθε 2 μέρες για 1 μήνα.
15. Μεταφορά θετικού καλλιεργητικού υλικού από NNN σε φλάσκα με RPMI 1640.

β) Από πήγμα/μυελό των οστών: σε στείρο σωληνάριο χωρίς αντιπηκτικό (~3 ml)

1. Φυγοκέντρηση στις 2500στρ/10 min του δείγματος.
2. Μεταφορά του ορού σε σωληνάριο eppendorf για IFAT.
3. Προσθήκη 4 ml Histopaque-1077 (T^o δωματίου) σε σωληνάριο falcon 15 ml.
4. Τεμαχισμός του πήγματος σε τρυβλίο petri και συλλογή των απελευθερωμένων αιμοσφαιρίων με 4-5 ml στείρο PBS.

5. Επιστοιβάδευση του υγρού μέρους στην επιφάνεια της Histopaque-1077.
6. Φυγοκέντρηση στις 3000στρ/10 min χωρίς φρένο.
7. Η διαδικασία καλλιέργειας του δείγματος συνεχίζεται όπως τα σημεία 4-14 παραπάνω.

Στην εξέταση του μυελού των οστών παραλείπεται το αρχικό στάδιο της φυγοκέντρησης.

ΙΙ. Από σπλήνα/ λεμφαδένα:

1. Ξέπλυμα της σπλήνας ή του λεμφαδένα, κάτω από στείρες συνθήκες, με αλκοόλη 70%.
2. Ξέπλυμα άλλες δύο φορές με PBS και μία με RPMI-1640.
3. Κόβεται ένα μικρό κομματάκι από το εσωτερικό της σπλήνας το οποίο τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια σε αποστειρωμένο τρυβλίο petri και συλλέγονται τα απελευθερωμένα αιμοσφαίρια με 4 ml στείρου PBS.
4. Επιστοιβάδευση του υγρού μέρους στην επιφάνεια της Histopaque-1077.
5. Φυγοκέντρηση στις 3000στρ/10 min χωρίς φρένο.
6. Η διαδικασία καλλιέργειας του δείγματος συνεχίζεται όπως τα σημεία 4-14 παραπάνω.

Για την απομόνωση της Λεϊσμάνιας από ύποπτα υλικά χρησιμοποιήθηκαν τα καλλιεργητικά υλικά:

α) RPMI 1640 (GibcoBRL, UK) εμπλουτισμένο με 2mM L-glutamine, 20 MM Hepes, 10% decomplemented Foetal Bovine Serum, 100 IU/ ml Penicillin και 100mg/ ml Streptomycin (Lightner *και συν.,* 1983, Lemesre *και συν.,* 1988).

β) το διφασικό καλλιεργητικό υλικό NNN (Novy- MacNeal- Nicolle) το οποίο περιέχει απεσταγμένο νερό, 14g/l Agar (plain, Non-nutrient), 6g/l NaCl και 150 ml/l απινιδωμένο αίμα κουνελιού ή προβάτου (Ozbilgin *και συν.,* 1995).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10: Παραγωγή διαγνωστικών κιτς

α) Παρασκευή πλακών για Έμμεσο Ανοσοφθορισμό *Leishmania*

1. Συλλογή 10 ml καλλιέργειας Leishmania (οι οποίες να είναι απομόνωση απο σκύλο και να είναι λεπτές και χωρίς να έχουν σχηματίσει συσσωματώματα.)
2. Φυγοκέντρηση στις 2500 στρ/10 λεπτά
3. Απόρριψη υπερκείμενου.
4. Ανασύσταση σε 15 ml PBS και καλό vortex.
5. Έλεγχος του αριθμού των Λεϊσμάνιων στο μικροσκόπιο (με καλυπτρίδα 24x60)
6. Επανάληψη του πλυσίματος για άλλες 4 φορές
7. Έλεγχος του αριθμού των λεϊσμάνιων στο μικροσκόπιο (σε κάθε οπτικό πεδίο ο αριθμός των λεϊσμάνιων πρέπει να είναι 12-15 και χωρίς τον σχηματισμό συσσωματωμάτων.
8. Καθάρισμα των αντικειμενοφόρων πλακών με Acetone 90%
9. Στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Εναπόθεση μια σταγόνα σε κάθε φρεάτιο της αντικειμενοφόρου πλάκας, απο το παραπάνω διάλυμα μετά από καλό vortex.
11. Τοποθέτηση στον κλίβανο στους 37^0 C για 4-5 ώρες.
12. Φύλαξη στους-20^0 C.

β) Προετοιμασία αντιγόνου *Leishmania* για χρήση στη δοκιμή της ηλεκτροσυναίρεσης

1. Συλλογή ~250 ml καλλιέργειας *Leishmania* (7x35ml culture flasks)
2. Φυγοκέντρηση στις 1800στρ/10 min.
3. Πλύσιμο του ιζήματος σε 10 ml NaCl, 2 φορές.
4. Ανασύσταση σε 2 ml 0,9% NaCl.
5. Τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο.
6. Πραγματοποίηση 3 κύκλων στους υπέρηχους (30 sec έκαστος, με 30 sec διαλειμμάτων), διατηρώντας πάντα το δείγμα στον πάγο.
7. Μεταφορά του κυτταρολύματος σε σωληνάριο Corex.
8. Φυγοκέντρηση στις 16000στρ/15 min στους 4° C.

9. Άμεση μεταφορά του σωληναρίου Corex από τη φυγόκεντρο στον πάγο.
10. Προσδιορισμός της ποσότητας της υπάρχουσας πρωτεΐνης με τη δοκιμή Bradford.
11. Τοποθέτηση της πρωτεΐνης σε aliquots.
12. Φύλαξη στους -20° C.

Ποσοτικοποίηση Πρωτεΐνης (Bradford) στο δείγμα αντιγόνου για επιλογή της κατάλληλης τελικής συγκέντρωσης, για χρήση στη δοκιμή της ηλεκτροσυναίρεσης

Παρασκευή 2 ml (2mg/ml) πρότυπου διαλύματος bovine albumin.

1. Παρασκευή αραίωσης διαλύματος bovine albumin σε απεσταγμένο H_2O.

Συγκεντρώσεις	***Ποσότητες***	***Αραίωση***	***Τελ. Συγκέντρωση***
0,2mg/ml	*100μl πρωτεΐνης + 900μl H_2O*	*0.2 x 0.1*	*20μg/ml*
0,4mg/ml	*200μl πρωτεΐνης + 800μl H_2O*	*0.4 x 0.1*	*40μg/ml*
0,6mg/ml	*300μl πρωτεΐνης + 700μl H_2O*	*0.6 x 0.1*	*60μg/ml*
0,8mg/ml	*400μl πρωτεΐνης + 600μl H_2O*	*0.8 x 0.1*	*80μg/ml*
1,2mg/ml	*600μl πρωτεΐνης + 400μl H_2O*	*1.2 x 0.1*	*120μg/ml*

2. Παρασκευή αραίωσης της προς μέτρησης πρωτεΐνης (π.χ. 1:10). Εάν το χρώμα της αραίωσης δεν ταιριάζει με κάποια από τις αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων, μια άλλη αραίωση της προς μέτρηση πρωτεΐνης παρασκευάζεται.
3. Εναπόθεση 0,1ml από κάθε αραίωση σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
4. Προσθήκη 5ml αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford (1:5 σε απεσταγμένο H_2O).
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά – 1 ώρα.

6. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης ($O.D_{595}$).
7. Σχηματισμός γραφικής παράστασης των τιμών της $O.D_{595}$ προς τις πρότυπες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης.
8. Υπολογισμός της υπό διερεύνηση συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11: Περιοχές δειγματοληψιών. Οι αριθμοί αναφέρονται στον αριθμό του τετραγώνου όπως αυτός περιγράφεται στην παράγραφο 1-1 του δεύτερου μέρους και φαίνεται στο χάρτη 1. Σε κάθε τετράγωνο φαίνονται τα χωριά από τα οποία, με τυχαία επιλογή, έγινε η δειγματοληψία στα σκυλιά. Στα τετράγωνα με πράσινο χρώμα φαίνεται που έγινε επιπλέον η δειγματοληψία σε ανθρώπους και συλλογή Φλεβοτόμων. Επιπλέον Φλεβοτόμοι συλλέγηκαν και από το τετράγωνο με γαλάζιο χρώμα.

1	3	4	5	6
Αυδήμου	Ίνια	Πόλις Χρυσοχούς	Κούκλια	Αγ. Θεράπων
Πισσούρι	Δρούσια	Προδρόμι	Νικόκλια	Αγ. Αμβρόσιος
Αλέκτορα	Φασλί	Νέο Χωρίο		Πάχνα
Πλατανίσκια	Ανδρολύκου			Κυβίδες
Άγ. Θωμάς	Αρκουδάλια			

10	11	12	13	16
Νατά	Πέγια	Πομός	Μακούντα	Αγ. Τύχωνας
Αγ. Γεώργιος	Κυβίδες	Παλιάμπελα	Αγ. Μαρίνα	Αρμενοχώρι
Μαμωνιών	Κάθηκας	Αλέβγα	Κινούσα	Παρεκκλησιά
Σούσκιου	Αγ. Γεώργιος	Παχύαμμος	Αργάκα	Πύργος
Φοίνικας	Πέγιας	Αγ. Γεωργούδη	Πελαθούσα	Μουτταγιάκα
Χολέτρια		Σελάχι του Απή	Γιαλιά	Μονή
Νικόκλια		Αγ. Θεόδωρος	Αρκουδάλια	
		Μοσφιλερί	Μηλιού	
		Κόκκινα	Σίμου	
			Θελέτρα	
			Γιόλου	
			Δρύμου	
			Λάσα	
			Δρίνια	
			Στρουμπί	
			Ακουρσός	
			Πολέμι	

20	21	22	24	25
Γέρι	Σωτήρα	Τραχώνι	Δρομολαξιά	Κόλπος
Λατσιά	Παραλίμνι	Ακρωτήρι	Μενεού	Κοραλλίων
Τσέρι	Δερύνεια	Ασώματος	Κίτι	Κισσόνεργα
Μαθιάτης	Φρέναρος	Φασούρι	Σοφτάδες	Τάλα
Αλάμπρα		Σερκέζοη	Περβόλια	Λέμπα
Κοτσιάτης				Έμπα
Νήσου				
Δάλι				
Πέρα Χωρίο				

27	28	35	36	40
Μαραθούντα	Αρχιμανδρίτα	Λειβάδια	Λιοπέτρι	Πάφος
Αναρίτα	Τραχιπέδουλα	Αραδίππου	Σωτήρα-Αγ.Νάπα	Χλώρακας
Κονιά	Μάρωνας	Λάρνακα		
Αναβαργός	Μούσερε			
Επισκοπή	Δωρά			
Πάφου	Ανόγυρα			
Αρμού				
Γεροσκίπου				
Αγ. Μαρινούδα				
Κολώνη				
Τίμη				

43	44	45	47	49
Μένικο	Λευκωσία	Ζώδια	Ορμίδια	Πλάτρες
Μιτσερό	Αγλαντζιά	Κατωκοπιά	Ξυλοφάγου	Πέρα Πεδί
Αγροκηπιά	Στρόβολος	Αστρομερίτης		Μαντριά
Μαλούντα	Άγ. Δομέτιος	Περιστερώνα		Άρσος
Αρεδιού	Έγκωμη	Αγ. Τριμιθιάς		Βάσα
Αγ. Ιωάννης		Λακατάνια		Μαλιά
Άγ. Ηλιόφωτοι		Ανθούπολη		Κινούσα
		Ακάκι		Ποταμιού
		Κοκκινοτρικιθιά		Κιλάνι
		Παλιομέτοχο		Βουνί
		Δένια		Όμοδος
		Μάμμαρι		Λόφος
				Αγ. Γεώργιος
				Σιλίκου

50	51	52	53	81
Αμαργέτη	Λεμεσός	Ύψωνας	Μεθηκολώνη	Καμπιά
Αξύλου	Άγ. Ιωάννης	Κολόσσι	Παραμύθα	Πολιτικό
Ελεδιού	Ζακάκι	Ερήμη	Αρκούντα	Αναλιώντας
Αγ. Μαρίνα	Πολεμίδια	Επισκοπή	Φασούλα	Καταλιώντας
Πεντάλια	Αγ. Φύλα	Καντού	Σπιτάλι	Καπέδες
Γαλαταριά	Μέσα Γειτονιά		Απσιού	
Άγ. Φώτιος	Άγ. Αθανάσιος		Γεράσα	
Λεμώνα	Γερμασόγια		Απεσιά	
Χούλου				
Παναγιά				

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12: Ποσοστό οροθετικότητας, έναντι της Λεϊσμάνια στα σκυλιά, ανά τετράγωνο.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΕΤΡΑΓΩΝΟΥ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΟΡΟΘΕΤΙΚΩΝ ΣΚΥΛΙΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΟΡΟΘΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ %
1	21	3	14,2
3	27	1	3,7
4	22	3	13,6
5	32	0	0
6	39	2	5,1
10	25	4	16
11	13	4	30,7
12	17	0	0
13	24	6	25
16	16	4	25
20	40	6	15
21	41	1	2,4
22	7	2	28,5
24	9	3	33,3
25	26	5	19,2
27	61	10	16,3
28	38	4	10,5
35	11	2	18,1
36	47	0	0
40	47	7	14,8
43	10	2	20
44	27	3	11,1
45	52	1	1,9
47	13	0	0
49	21	6	28,5
50	29	4	13,7
51	34	11	32,3
52	85	16	18,8
53	40	3	7,5
81	26	1	3,8
	900		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13: Σχέση μεταξύ οροθετικότητας και 10 παραγόντων κινδύνου

Μεταβλητή	Αριθμός θετικών σκυλιών με ELISA(%)	Αριθμός θετικών σκυλιών με PCR (%)	Ολικός αριθμός σκυλιών
Γεωγραφική προέλευση[1]			
Λευκωσία	12 (7.7%)	34 (21.9%)	155
Αμμόχωστος	1 (1.0%)	1 (1.0%)	101
Λάρνακα	3 (15.0%)	3 (15.0%)	20
Λεμεσός	43 (16.3%)	56 (21.2%)	264
Πάφος	49 (13.6%)	135 (37.5%)	360
Εποχή δειγματοληψίας[2]			
Χειμώνας	13 (6.0%)	13 (6.0%)*	215
Άνοιξη	44 (15.1%)	120 (41.1%)*	292
Καλοκαίρι	36 (12.4%)	74 (25.5%)*	290
Φθινόπωρο	15 (14.6%)	22 (21.4%)*	103
Ηλικία[3] (χρόνια)			
<2	11 (4.5%)	61 (25%)	244
2-3	46 (12.9%)	91 (25.6%)	356
4-5	36 (20.3%)	51 (28.8%)	177
6+	15 (12.2%)	26 (21.1%)	123

Ελαχ. 3 συμπτώματα[4]			
Απουσία	72 (9.2%)	190 (24.3%)	781
Παρουσία	36 (30.3%)	39 (32.8%)	119
Χρήση του σκυλιού[5]			
Κυνηγόσκυλα	86 (12.0%)	185 (25.8%)	718
Φύλακες	13 (14.9%)	22 (25.3%)	87
Συντροφιάς	9 (9.5%)	22 (23.2%)	95
Φύλο[6]			
Αρσενικό	53 (14.0%)	104 (27.4%)	379
Θηλυκό	55 (10.6%)	125 (24.0%)	521
Χρώμα του τριχώματος[7]			
Ανοιχτόχρωμο	10 (10%)	26 (26.0%)	100
Σκουρόχρωμο	50 (12.4%)	113 (28.1%)	402
Ανάμεικτο	48 (12.1%)	90 (22.6%)	398
Μήκος του τριχώματος[8]			
Κοντό	86 (11.3%)	198 (26.0%)	763
Μέτριο	17 (15.5%)	27 (24.5%)	110
Μακρύ	5 (18.5%)	4 (14.8%)	27
Βάρος[9]			
<11 kg	6 (7.7%)	13 (16.7%)	78
11-20 kg	67 (13.1%)	129 (25.3%)	510
>20 kg	35 (11.2%)	87 (27.9%)	312

Εκτοπαράσιτα[10]			
Απουσία	105 (12.4%)	214 (25.3%)	846
Παρουσία	3 (5.6%)	15 (27.8%)	54

[1] ELISA X^2 statistic 19.9 on 4 df, p=0.001, PCR X^2 statistic 64.07 on 4 df, p<0.0001

[2] ELISA X^2 statistic 10.50 on 3 df, p=0.015, PCR X^2 statistic 81.26 on 3 df, p<0.0001

[3] ELISA X^2 statistic 24.91 on 3 df, p<0.0001, PCR X^2 statistic 2.29 on 3 df, p=0.515

[4] ELISA X^2 statistic 43.26 on 1 df, p<0.0001, PCR X^2 statistic 3.88 on 1 df, p=0.049

[5] ELISA X^2 statistic 1.24 on 2 df, p=0.539, PCR X^2 statistic 0.30 on 2 df, p=0.860

[6] ELISA X^2 statistic 2.44 on 1 df, p=0.118, PCR X^2 statistic 1.38 on 1 df, p=0.241

[7] ELISA X^2 statistic 0.48 on 2 df, p=0.798, PCR X^2 statistic 3.20 on 2 df, p=0.202

[8] ELISA X^2 statistic 2.64 on 2 df, p=0.267, PCR X^2 statistic 1.76 on 2 df, p=0.415

[9] ELISA X^2 statistic 2.20 on 2 df, p=0.332, PCR X^2 statistic 4.15 on 2 df, p=0.125

[10] ELISA X^2 statistic 2.04 on 1 df, p=0.153, PCR X^2 statistic 2.24 on 1 df, p=0.134

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 14: Άρθρα που δημοσιεύτηκαν στον ημερήσιο τύπο και σε περιοδικά της Κύπρου.

α) Η λεϊσμανίαση κάνει την επανεμφάνιση της στην Κύπρο (δημοσιεύτηκε στις 12 Ιουλίου 2006 στις εφημερίδες Σημερινή και Φιλελεύθερος, που είναι οι εφημερίδες με τις περισσότερες πωλήσεις φύλλων στην Κύπρο).

Η λεϊσμανίαση είναι μια νόσος γνωστή από τα αρχαία χρόνια και απαντάται σε περιοχές όπου οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν την επιβίωση και αναπαραγωγή της σκνίπας. Η σκνίπα είναι έντομο μικρότερο και πιο ανοιχτόχρωμο από το κουνούπι και το πέταγμά της δεν ακούγεται. Η σκνίπα είναι ο απαραίτητος κρίκος που συνδέει το ένα μολυσμένο ζώο με το άλλο. Είναι η «βελόνα» που θα πάρει τη Λεϊσμάνια, το Πρωτόζωο παράσιτο, από τον ένα μολυσμένο οργανισμό και θα το ενέσει μετά από λίγες μέρες, σε πολλαπλάσιους αριθμούς μια και το παράσιτο πολλαπλασιάζεται μέσα στη σκνίπα, στον άνθρωπο ή σε άλλο ζώο.

Το παράσιτο Λεϊσμάνια είναι μικρό και τρυπώνει μέσα στα κύτταρα-στρατιώτες που διαθέτει ο οργανισμός για να σκοτώνει τους εισβολείς. Όμως η Λεϊσμάνια-εισβολέας καταφέρνει να ξεγελάσει τους στρατιώτες και αντί να φαγωθεί από τα μακροφάγα κύτταρα μπαίνει στο σώμα τους, το χρησιμοποιεί σαν καταφύγιο και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται. Όταν το κύτταρο ξεχειλίσει από παράσιτα, σπάει και καινούργια κύτταρα μολύνονται. Έτσι αν το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι σε θέση να αντιμετωπίσει το παράσιτο, αναπτύσσεται νόσος.

Η νόσος έχει πολλές μορφές αλλά στην Μεσόγειο συναντάμε την δερματική και την σπλαχνική της έκφραση. Η Σπλαχνική Λεϊσμανίαση είναι η σοβαρότερη της μορφή και είναι θανατηφόρα αν δεν διαγνωστεί και θεραπευτεί έγκαιρα. Είναι νόσος κυρίως μικρών παιδιών που το ανοσοποιητικό τους σύστημα δεν έχει τη δύναμη να ελέγξει το παράσιτο. Τα τελευταία όμως χρόνια, το πολύ στρες και η κακή διατροφή που έχει μπει στη ζωή μας έχει σαν αποτέλεσμα και πολλοί υγιείς ενήλικες να αναπτύσσουν Σπλαχνική Λεϊσμανίαση. Βεβαίως, άτομα με AIDS μολύνονται εύκολα και κινδυνεύει άμεσα η ζωή τους από το παράσιτο.

Η αύξηση των κρουσμάτων Σπλαχνικής Λεϊσμανίασης στις χώρες της Μεσογείου έχει πάρει ανησυχητικές διαστάσεις και σχετίζεται με τη δραματική αύξηση των περιστατικών στα σκυλιά, που αποτελούν την παρακαταθήκη (την αποθήκη) του

παράσιτου στο περιβάλλον. Μια σκνίπα μπορεί να μολυνθεί μόνο από μολυσμένο σκύλο γιατί το παράσιτο κυκλοφορεί στο επιδερμικό αίμα μόνο του σκύλου. Ο άνθρωπος, και άλλα ζώα εκτός του σκύλου, μπορεί να μολύνουν σκνίπες μόνο αν έχουν ανοσοκαταστολή (AIDS) οπότε σε αυτή την περίπτωση έχουν παρασιταιμία και το παράσιτο κυκλοφορεί και στο επιδερμικό τους αίμα.

Οι πληθυσμοί της σκνίπας στη Μεσόγειο έχουν αυξηθεί ανεξέλεγκτα λόγω της ανθεκτικότητάς που έχουν αναπτύξει στα εντομοκτόνα, όμως ανθεκτικότητα έχει αρχίσει να αναπτύσσει και το παράσιτο στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενών και σκυλιών. Επιβάλλεται να είμαστε πολύ προσεκτικοί στη χρήση φαρμάκων για τη θεραπεία της ασθένειας στα σκυλιά γιατί σύντομα θα βρεθούμε στη δύσκολη θέση να μην έχουμε φάρμακα ικανά να θεραπεύσουν τους ασθενείς. Η Λεϊσμάνια διαθέτει ένα γονίδιο (το γονίδιο mdr – multi drug resistance), που του επιτρέπει να φτιάχνει αντλίες που αδειάζουν το φάρμακο από το σώμα του και έτσι να αποφεύγει το θάνατο.

Μέχρι να αποδώσει η προσπάθεια ανάπτυξης εμβολίου για τη νόσο επιβάλλεται να παρθούν μέτρα πρόληψης της εξάπλωσης της Λεϊσμανίασης σε περιοχές στις οποίες οι συνθήκες είναι ευνοϊκές. Κατάλληλες συνθήκες είναι ο μεγάλος πληθυσμός σκυλιών, η παρουσία των ειδών της σκνίπας η οποία μπορεί να μεταφέρει το παράσιτο από τον σκύλο σε άλλα ζώα και στον άνθρωπο. Αυτές οι συνθήκες απαντώνται σε όλα τα μέρη της Κύπρου εκτός από τα βουνά με μεγάλο υψόμετρο. Για να εξαπλωθεί η νόσος σε τέτοιες περιοχές το μόνο που χρειάζεται είναι ΕΝΑ μολυσμένο σκυλί.

Πριν αρκετά χρόνια είχε εκριζωθεί η Λεϊσμανίαση από την Κύπρο. Ο κύκλος ζωής του παράσιτου είχε διακοπεί στην προσπάθεια ελέγχου του Εχινόκοκκου, κατά την οποία ο πληθυσμός των σκυλιών από 46 000 μειώθηκε στις 6 000. Αυτή τη στιγμή όμως υπολογίζεται ότι ζουν στην ελεύθερη Κύπρο 100 000 σκυλιά.

Μελέτες που έγιναν το 1996 από ξένους ερευνητές σε συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες Κύπρου (Deplazes και συν., 1998), έδειξαν ότι η Λεϊσμάνια υπάρχει ακόμα στην Κύπρο και ότι σκυλιά στην περιοχή της Πάφου και της Λεμεσού φιλοξενούσαν το παράσιτο. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής μας ανησύχησαν και σε συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες και τις Ιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου ξεκινήσαμε μια λεπτομερή διερεύνηση του θέματος, την οποία χρηματοδοτεί το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας Κύπρου.

Το Καλοκαίρι του 2005 αρχίσαμε την εξέταση αίματος σκυλιών από 90 χωριά, σε 30 περιοχές, στις 5 επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου. Τα πρώτα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα κρούσματα στα σκυλιά είχαν διπλασιαστεί μέσα σε 9 χρόνια (από ένα μέσο όρο 11% για τις επαρχίες Πάφου και Λεμεσού, έφτασαν στο 20%). Το πιο ανησυχητικό αποτέλεσμα είναι ότι στις περιοχές Λευκωσίας, Αμμοχώστου και Λάρνακας τα μόνα θετικά σκυλιά που βρέθηκαν μέχρι σήμερα είναι σκυλιά που είχαν μεταφερθεί εκεί από την επαρχία Πάφου! Τα σκυλιά αυτά αποτελούν πηγή μόλυνσης των περιοχών στις οποίες μεταφέρθηκαν και αναμένεται ότι, άν δεν παρθούν μέτρα, θα ξεκινήσουν καινούργιες εστίες της νόσου σε αυτές τις περιοχές.

Πριν προλάβουμε να ανακοινώσουμε τα αποτελέσματά μας στο Υπουργείο Υγείας για να κρούσει τον κώδωνα του κινδύνου, εμφανίστηκε το πρώτο κρούσμα λεϊσμανίασης σε άνθρωπο (δερματική μορφή), και λίγο αργότερα το δεύτερο κρούσμα σε ένα παιδάκι (σπλαχνική μορφή της νόσου). Και τα δύο κρούσματα προήλθαν από την επαρχία Πάφου. Η μελέτη του παράσιτου που απομονώθηκε από το παιδάκι με Σπλαχνική Λεϊσμανίαση έδειξε ότι ήταν εξαιρετικά ανθεκτικό στα φάρμακα!

Ο αριθμός των ανθρώπων, κυρίως παιδιών κάτω των πέντε ετών, που θα αναπτύξουν τη νόσο θα εξελιχθεί σε χιονοστιβάδα αν δεν πάρουμε όλοι τα μέτρα μας. Αυτό δείχνουν τα αποτελέσματα της έρευνας στα σκυλιά. Γνωρίζουμε, από μελέτες που έγιναν σε πολλές χώρες του κόσμου, ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των μολυσμένων σκυλιών σε μια περιοχή τόσο αυξάνεται ο αριθμός των ανθρώπινων κρουσμάτων.

Οι σκνίπες μπορούν να πετάξουν 500 μέτρα απόσταση. Άρα, υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης άλλων σκυλιών και του ανθρώπου σε ένα κύκλο με 500 μέτρα διάμετρο γύρω από κάθε μολυσμένο σκυλί. Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των μολυσμένων σκυλιών σε μια περιοχή, τόσο μεγαλύτερος ο αριθμός των κύκλων και άρα της πιθανότητας να τσιμπηθούμε από μολυσμένη σκνίπα. Σε κάποια χωριά βρέθηκε το 33% των σκυλιών να είναι μολυσμένα με το παράσιτο.

Τι μπορούμε να κάνουμε, εμείς οι ιδιώτες, για να προφυλαχτούμε από τη Λεϊσμάνια;

- Εντομοαπωθητικά στα σκυλιά μας
- Εντομοαπωθητικά σε εμάς και στα παιδιά μας

- Κουνουπιέρες το βράδυ

- Εξέταση των σκυλιών μας 2 φορές το χρόνο (όταν ξυπνήσουν οι σκνίπες από τη χειμερία νάρκη τους, στην αρχή της Άνοιξης, για να βεβαιωθούμε ότι το σκυλί μας δεν είναι μολυσμένο και άρα μολυσματικό, και όταν πάνε οι σκνίπες και πάλι για ύπνο το Φθινόπωρο για να δούμε αν το σκυλί μας έχει μολυνθεί)

- Δεν μεταφέρουμε ούτε αγοράζουμε σκυλιά αν δεν είμαστε 100% σίγουροι ότι είναι καθαρά από το παράσιτο

- Δεν έχουμε περισσότερα σκυλιά υπό την προστασία μας από αυτά τα οποία είναι απαραίτητο να έχουμε και που άνετα μπορούμε να φροντίζουμε και να ελέγχουμε ιατρικά.

Τα μολυσμένα σκυλιά σε κάθε περιοχή πρέπει να αντιμετωπιστούν σωστά, βάση των οδηγιών των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών. Πρέπει να γνωρίζουμε ότι ένα σκυλί μπορεί να μην έχει κανένα σύμπτωμα της νόσου αλλά να φιλοξενεί το παράσιτο και άρα να μολύνει σκνίπες. Οι εξετάσεις στα σκυλιά και η σωστή αντιμετώπιση της νόσου είναι απαραίτητα αν θέλουμε να σταματήσουμε το πρόβλημα πριν πάρει ανεξέλεγκτες διαστάσεις.

β) Η λεϊσμανίαση στο σκύλο (δημοσιεύτηκε στην εφημερίδα Φιλελεύθερος, αρ. φύλλου 16341, 10 Απριλίου 2005 και στο τριμηνιαίο περιοδικό Αγρότης, που εκδίδεται σε 8.500 αντίτυπα από το Υπουργείο Γεωργίας της Κύπρου και διανέμεται δωρεάν, τεύχος 433, 2006)

Η λεϊσμανίαση είναι παρασιτικό νόσημα του σκύλου και του ανθρώπου με παγκόσμια εξάπλωση. Ενδημεί σε πολλές χώρες της Μεσογείου (Ελλάδα, Νότια Γαλλία, Νότια Ιταλία, Αφρική κ.ά.). Πρόκειται για πολύ σοβαρή νόσο η οποία μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο (κινδυνεύουν περισσότερο τα μικρά παιδιά και τα ανοσοκατασταλμένα άτομα) και η οποία χωρίς την ενδεδειγμένη θεραπεία οδηγεί στο θάνατο. Για το λόγο αυτό η λεϊσμανίαση έχει γίνει αντικείμενο έρευνας στα επιστημονικά ινστιτούτα όλου του κόσμου και περιλαμβάνεται στα ειδικά νοσήματα των περισσότερων ερευνητικών προγραμμάτων της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας.

Αιτία και μηχανισμός μόλυνσης

Αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι τα πρωτόζωα του γένους Λεϊσμάνια (Leishmania spp), τα οποία είναι ενδοκυτταρικά παράσιτα που εντοπίζονται στα μακροφάγα κύτταρα των ευπαθών οργανισμών, όπως ο σκύλος, ο άνθρωπος, το

τσακάλι, ο λύκος, τα τρωκτικά (τελικοί ξενιστές). Η μόλυνση των τελικών ξενιστών γίνεται μέσω των νυγμάτων μολυσμένων αιματοφάγων θηλυκών εντόμων, των φλεβοτόμων, που κοινά ονομάζονται σκνίπες (ενδιάμεσοι ξενιστές). Οι Φλεβοτόμοι (Phlebotomus spp.) είναι έντομα με μέγεθος 1-4 mm, που αναπτύσσονται σε σκοτεινούς χώρους, κορμούς δένδρων, λατομεία, σπηλιές, στάβλους, μάντρες, μέσα σε πέτρινους τοίχους, πηγάδια, αγροτικά σπίτια κ.ά. Διέρχονται τα στάδια εξέλιξης αυγού, προνύμφης (4 προνυμφικά στάδια), νύμφης και ενήλικου αρσενικού και θηλυκού εντόμου και έχουν διάρκεια ζωής 14-40 ημέρες. Εμφανίζουν δραστηριότητα από το Μάιο μέχρι το Νοέμβριο (μετά τη δύση του ήλιου), διατρέφονται με χυμούς φυτών (σιτηρά, αμυγδαλιές, ροδακινιές, βερικοκιές κ.ά.) και οι θηλυκές σκνίπες, επιπλέον, με αίμα. Διακρίνουν το κίτρινο, το πορτοκαλί και το κόκκινο χρώμα σε απόσταση κάτω των 2 μέτρων και προτιμούν να απομυζούν αίμα από ορισμένους ξενιστές (γι' αυτό υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη συχνότητα της μόλυνσης των ζώων και του ανθρώπου).

Οι βιολογικές συνήθειες και το είδος του μεταδότη έχουν μεγάλη σημασία στην εξάπλωση της λεϊσμανίασης. Από τα τουλάχιστον 700 είδη σκνιπών που υπάρχουν σε ολόκληρο τον κόσμο, μόνον τα 30 είδη είναι μεταδότες των Leishmania spp. Στις μεσογειακές χώρες απαντώνται 21 είδη σκνιπών (18 Phlebotomus spp. και 3 Sergentomyia spp.) από τα οποία μόνο τα 8 είδη είναι μεταδότες Leishmania spp. Η μολυσμένη θηλυκή σκνίπα μεταδίδει το παράσιτο 5-8 μέρες μετά τη μόλυνσή της. Με το τσίμπημα το παράσιτο εισέρχεται στα τριχοειδή αγγεία του δέρματος και με την κυκλοφορία φθάνει σε όργανα και ιστούς, όπως τα λεμφογάγγλια, το ήπαρ, το μυελό των οστών και το σπλήνα. Εισβάλλει στα μονοκύτταρα μακροφάγα όπου και πολλαπλασιάζεται. Το διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή του μολυσμένου νύγματος μέχρι την εκδήλωση των συμπτωμάτων κυμαίνεται από λίγες εβδομάδες μέχρι ένα χρόνο, η δε διάρκεια εξέλιξης της νόσου από τη στιγμή εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων μέχρι το θάνατο, αν δεν γίνει θεραπεία, είναι 3 μέχρι 24 μήνες.

Συμπτώματα - Διάγνωση – Θεραπεία

Τα συνήθη συμπτώματα που αναγκάζουν τον ιδιοκτήτη να πάρει το ζώο του στο κτηνίατρο είναι:

- δερματικές αλλοιώσεις που παρουσιάζονται στα πτερύγια των αυτιών, στα βλέφαρα, στο επιρρίνιο, αλλά και σε άλλα μέρη του σώματος και οι οποίες χρονίζουν
- πιτυρίαση
- κακή ποιότητα τριχώματος
- ονυχομεγαλία
- απώλεια βάρους
- μείωση της ενεργητικότητας και εύκολη κόπωση
- επίμονες βλεννοπυώδεις εκκρίσεις από τα μάτια και τη μύτη
- ρινορραγία
- επίμονος βήχας χωρίς αντίστοιχες αλλοιώσεις στους βρόγχους και τους πνεύμονες

Κατά την κλινική εξέταση μπορεί να παρατηρηθούν αναιμία, διογκωμένοι λεμφαδένες και σπληνομεγαλία. Η διάγνωση του νοσήματος στο σκύλο δεν μπορεί να βασιστεί μόνο στην κλινική εικόνα, αλλά πρέπει πάντοτε να τίθεται μετά από εργαστηριακή διερεύνηση γιατί παρόμοια συμπτώματα δίνουν και άλλες ασθένειες. Οι εργαστηριακές εξετάσεις που χρησιμοποιούνται βασίζονται στα εξής: α) στην ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων στον ορρό αίματος με τις μεθόδους της Elisa και του Έμμεσου Ανοσοφθορισμού, β) στην ανεύρεση της αμαστίγωτης μορφής του παράσιτου σε επιχρίσματα από λεμφογάγγλια, μυελό οστών και αίμα (λευκή στοιβάδα), γ) στην ανάπτυξη της προ-μαστιγωτής μορφής του παράσιτου σε ειδικά καλλιεργητικά υλικά στο εργαστήριο (in vitro), δ) στην ανίχνευση του DNA του παράσιτου στο μυελό των οστών (>95%), το αίμα (10%), τα λεμφογάγγλια, το δέρμα κ.ά. με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Η πρόγνωση του νοσήματος χωρίς φαρμακευτική αγωγή είναι δυσμενής (πεθαίνει το 80-90% των μολυσμένων ζώων, 3-24 μήνες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων). Για τη θεραπεία της νόσου μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα πεντασθενή αντιμονιακά φάρμακα, η αλλοπουρινόλη, η αμφοτερισίνη Β, η αμινοσιδίνη κ.ά. σε διάφορους συνδυασμούς και για μεγάλο χρονικό διάστημα (6-12 μήνες), ανάλογα με το θεραπευτικό πρωτόκολλο που ακολουθείται. Η παρακολούθηση του ζώου κατά τη διάρκεια, αλλά και μετά τη φαρμακευτική αγωγή γίνεται με την ορολογική εξέταση του ζώου 1, 2, 3, 6, 12, 18 και 24 μήνες μετά τη

λήξη της αγωγής (ανιχνεύονται φθίνουσες τιμές ειδικών αντισωμάτων ή αντιγόνων του παράσιτου συνήθως για 6-12 μήνες μετά τη λήξη της αγωγής). Όταν οι τιμές των ειδικών αντισωμάτων μειώνονται, η ορολογική εξέταση επαναλαμβάνεται κάθε 6 μήνες για 2 χρόνια. Όταν οι τιμές των ειδικών αντισωμάτων αυξάνονται, η φαρμακευτική αγωγή επαναλαμβάνεται. Παρά το γεγονός ότι με τη θεραπεία επιτυγχάνεται η εξάλειψη των κλινικών συμπτωμάτων στα σκυλιά, σπανίως αυτή έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη ίαση με αποτέλεσμα το ζώο να παραμένει φορέας και να υπάρχει ο κίνδυνος υποτροπών. Για το λόγο αυτό ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συστήνει ευθανασία των θετικών ζώων.

Προληπτική αντιμετώπιση

Σημαντικότατο ρόλο στη μείωση των κρουσμάτων λεϊσμανίασης στα ζώα αλλά και στην προστασία της δημόσιας υγείας έχει η προληπτική αντιμετώπιση της νόσου που συνίσταται κατά κύριο λόγο στη σωστή ενημέρωση και ευσυνειδησία των ιδιοκτητών σκύλων. Συγκεκριμένα:

- Όλα τα ζώα από το Μάρτιο μέχρι και τον Οκτώβριο τουλάχιστον πρέπει να είναι εφοδιασμένα με αντιπαρασιτικά κολάρα που θα ανανεώνονται συχνά. Χρειάζεται επίσης να ψεκάζονται συχνά με αντιπαρασιτικά spray ή να γίνεται χρήση αντιπαρασιτικών σκευασμάτων σε μορφή αμπουλών. Η αγορά πλέον αφθονεί από έξω-παρασιτοκτόνα προϊόντα, τα οποία είναι αξιόπιστα και ασφαλή.
- Ο χώρος διαμονής των ζώων πρέπει να είναι καθαρός, απαλλαγμένος από ακαθαρσίες, σωρούς ξύλων, σκουπιδιών κτλ έτσι ώστε να μην ευνοείται η παρουσία και ο πολλαπλασιασμός των σκνιπών.
- Σε ιδιαίτερα υγρούς, ζεστούς χώρους με πράσινο, καλό είναι τη νύχτα να τοποθετούνται εντομο-απωθητικά προϊόντα.
- Να γίνεται προληπτική εξέταση των σκύλων για λεϊσμανίαση κάθε Μάιο και Νοέμβριο έτσι ώστε να επιτυγχάνεται έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Στα αρχικά στάδια μόλυνσης η θεραπεία είναι ευκολότερη και αποτελεσματικότερη. Σε περίπτωση δε που η θεραπεία δεν είναι δυνατή, να γίνεται άμεσα ευθανασία και όχι να εγκαταλείπονται τα ζώα στο δρόμο. Κάθε μολυσμένο ζώο αποτελεί αποθήκη του παράσιτου στη φύση και εστία μόλυνσης για άλλα ζώα και τον άνθρωπο.

Το πρόβλημα στην Κύπρο

Στην Κύπρο η ασθένεια ήταν πολύ διαδεδομένη στο παρελθόν, κυρίως στις παράκτιες περιοχές. Η ελάττωση του πληθυσμού των σκύλων στο νησί από 46.000

σε 6.000 στην προσπάθεια ελέγχου της εχινοκοκκίασης (1970-1975) είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου. Όμως λόγω της ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού των σκύλων τα τελευταία χρόνια (ο αριθμός τους υπολογίζεται σε 80.000 στην ελεύθερη Κύπρο) αυξήθηκαν τα κρούσματα της ασθένειας στα σκυλιά, πράγμα που αυξάνει τον κίνδυνο μετάδοσης της νόσου στον άνθρωπο. Οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες με στόχο την πρόληψη του κινδύνου από τη νόσο αυτή υπέβαλαν κατά το έτος 2004 πρόταση ερευνητικού έργου προς το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας με θέμα τη διερεύνηση της κατάστασης σε ότι αφορά τη λεϊσμανίαση στο σκύλο και τον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα το ερευνητικό αυτό έργο το οποίο έχει ήδη εγκριθεί και τεθεί σε εφαρμογή και στο οποίο συμμετέχουν εκτός από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, η Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης και οι Ιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου, θα διαρκέσει 3 χρόνια και θα έχει σαν τελικό στόχο τον έλεγχο και την επιτήρηση της λεϊσμανίασης στην Κύπρο. Τέλος οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες μαζί με άλλες 20 χώρες συμμετέχουν στο ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα Leish-Med το οποίο έχει αποκλειστικό αντικείμενο τη νόσο λεϊσμανίαση.

γ) Η λεϊσμανίαση και η αντιμετώπιση της (Ραδιοφωνική εκπομπή «Η ώρα της Υπαίθρου» στο κρατικό κανάλι του ΡΙΚ, 2006)

Η **λεϊσμανίαση** είναι ζωονόσος με μεγάλη σημασία για τη Δημόσια Υγεία. Αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για 88 χώρες και η εξάπλωση της οφείλεται στην ανεξέλεγκτη αύξηση των πληθυσμών του εντόμου διαβιβαστή (λόγω ανάπτυξης αντοχής στα εντομοκτόνα), στην ανάπτυξη αντοχής του παράσιτου στα φάρμακα και στην ανυπαρξία εμβολίου κατά της ασθένειας. Τα σκυλιά λαμβάνουν μέρος στην επιδημιολογική αλυσίδα της Λεϊσμάνιας, παίζοντας το ρόλο της αποθήκης, δηλαδή στο περιβάλλον το παράσιτο υπάρχει στο σκύλο από τον οποίο είναι δυνατόν να μολυνθεί η σκνίπα (*Phlebotomus*) και να μεταδώσει την ασθένεια σε άλλα σκυλιά και στον άνθρωπο.

Στην Κύπρο η ασθένεια ήταν πολύ διαδεδομένη στο παρελθόν, κυρίως στις παράκτιες περιοχές. Η ελάττωση του πληθυσμού των σκύλων στο νησί από 46.000 σε 6.000 στην προσπάθεια ελέγχου της εχινοκοκκίασης (1970-1975) είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου. Όμως λόγω της ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού των σκύλων τα τελευταία χρόνια (ο αριθμός τους υπολογίζεται σε 80.000 στην ελεύθερη Κύπρο) αυξήθηκαν τα κρούσματα της

ασθένειας στα σκυλιά, πράγμα που εμπερικλείει κινδύνους μετάδοσης της νόσου και στον άνθρωπο.

Αιτία και μηχανισμός μόλυνσης

Αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι τα **πρωτόζωα του γένους Λεϊσμάνια**. Στον κύκλο ζωής του παράσιτου παίρνουν μέρος ένας σπονδυλωτός ξενιστής (σαρκοφάγα ζώα, τρωκτικά, άνθρωπος) και ένας ενδιάμεσος ξενιστής (ασπόνδυλο). Ενδιάμεσοι ξενιστές των διαφόρων ειδών *Leismania* είναι οι σκνίπες, μικρά δίπτερα έντομα του γένους ***Phlebotomus.*** Ο μηχανισμός μόλυνσης έχει ως εξής: Όταν ο Φλεβοτόμος τσιμπήσει μολυσμένα θηλαστικά, μαζί με το αίμα που ρουφάει παίρνει και κύτταρα του δικτυοενδοθυλιακού συστήματος (Δ.Ε.Σ) που περιέχουν Λεϊσμάνιες οι οποίες κατεβαίνουν στο στομάχι ή το μέσο έντερο του. Εκεί μετατρέπονται σε λεπτομονάδες πολλαπλασιαζόμενες με πολύ γρήγορο ρυθμό, ώστε την τρίτη μέρα από το γεύμα του εντόμου να υπάρχουν άφθονες , προσκολλημένες στα τοιχώματατου εντέρου. Την τέταρτη με πέμπτη μέρα ο πολλαπλασιασμός τους είναι τόσο έντονος, ώστε γεμίζουν τον οισοφάγο και το φάρυγγα που σχεδόν τον φράσσουν. Όταν το μολυσμένο έντομο, στην προσπάθεια του να τραφεί τσιμπήσει ένα νέο τελικό ξενιστή, το αίμα φθάνει στο σημείο που υπάρχει το παρασιτικό έμβολο και δεν μπορεί να προχωρήσει. Το έντομο έτσι βρίσκει εμπόδιο για να τραφεί και καταβάλλει ιδιαίτερες εισροφητικές προσπάθειες, οπότε από το δημιουργούμενο κυματισμό του αίματος αποσπώνται τμήματα του παρασιτικού εμβόλου τα οποία μπαίνουν με την προβοσκίδα μέσα στο θηλαστικό. Εκεί μεταπίπτουν στο στάδιο Λεϊσμάνια, οι οποίες προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα του Δ.Ε.Σ. μέσα στα οποία και πολλαπλασιάζονται. Όταν ο πολλαπλασιασμός φθάσει σε κάποιο οριακό σημείο, το κύτταρο σπάει, τα πρωτόζωα διασπείρονται και μπαίνουν μέσα σε άλλα κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται η πρώτη εστία.

Κατάταξη των λεϊσμανιάσεων

Οι λεϊσμανιάσεις κατατάσσονται σε τρεις βασικές κλινικές μορφές: α) **τη δερματική**, όπου δημιουργείται δερματική αλλοίωση που σταδιακά καταλήγει σε υπερκεράτωση του δέρματος ή μπορεί να ξεκινήσει σαν πομφός ο οποίος δεν υπερκερατώνεται και σταδιακά δίνει μεταστάσεις σε άλλες περιοχές του δέρματος, όπως το πρόσωπο και τα άκρα β) **τη βλεννογονοδερματική**, όπου αρχικά εμφανίζονται δερματικές αλλοιώσεις οι οποίες μετά από την πάροδο μηνών ή ετών

κάνουν μεταστάσεις και δημιουργούν παραμορφώσεις στα όργανα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και γ) **τη σπλαχνική ή *Kala-azar***, κατά τη διάρκεια της οποίας οι αμαστίγωτες μορφές του παράσιτου εισέρχονται και πολλαπλασιάζονται στα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα των οργάνων του Δ.Ε.Σ. όπως είναι ο σπλήνας, το ήπαρ, τα λεμφογάγγλια και ο μυελός των οστών.

Ο σκύλος παρουσιάζει τη σπλαχνική μορφή της νόσου. Σε 1 μήνα έως και 7 χρόνια μετά τη μόλυνση του παρατηρούνται μερικά από τα παρακάτω συμπτώματα: αδυναμία, ελαττωμένη φυσική δραστηριότητα, πυρετός, διόγκωση του ήπατος, διόγκωση του σπλήνα, λεμφαδενίτιδα, μυοπάθεια, νεφροπάθεια, ρινορραγία, υπέρμετρη αύξηση των νυχιών (ονυχογρύπωση), απίσχναση, αναιμία, δερματικές αλλοιώσεις (όπως ξηρή αποφολιδωτική δερματίτιδα που αρχικά αφορά την κεφαλή και ακολούθως εξαπλώνεται στο υπόλοιπο σώμα, εξέλκωση του δέρματος που αφορά κυρίως τις περιοχές των οστικών προεξοχών, τα μυοδερματικά όρια και τα άκρα, παρουσία πολλαπλών οζιδίων, γενικευμένη άσηπτη φλυκταινώδη δερματίτιδα). Συχνά παρατηρείται χρόνια επιπεφυκίτιδα, βλεφαρίτιδα και απόπτωση του τριχώματος γύρω από τα μάτια.

Η νόσος στον άνθρωπο

Ο άνθρωπος μπορεί να προσβληθεί είτε από τη δερματική, είτε από τη σπλαχνική μορφή της νόσου τα συμπτώματα των οποίων είναι τα εξής: α) Δερματική μορφή: Τα συμπτώματα της δερματικής μορφής εμφανίζονται σε 15 μέρες έως 2 μήνες περίπου μετά από τη μόλυνση και εξαρτώνται άμεσα από την εντόπιση και τον αριθμό των δερματικών αλλοιώσεων (έλκη), β) Σπλαχνική μορφή: Σε μερικές εβδομάδες έως και ένα χρόνο μετά τη μόλυνση παρατηρούνται μερικά από τα παρακάτω συμπτώματα: ακανόνιστος πυρετός, απώλεια βάρους, διόγκωση του σπλήνα, διόγκωση του ήπατος, λεμφαδενοπάθεια, εξασθένηση των δυνάμεων, δυσφορία, διάρροια, βήχας, νυχτερινή εφίδρωση, οίδημα και γκρίζος αποχρωματισμός του δέρματος, τριχόπτωση, αιμορραγία ούλων και ρινικών βλεννογόνων. Σε άτομα με ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα η Σπλαχνική Λεϊσμανίαση συνήθως δεν αναπτύσσεται, αποτελεί όμως σοβαρότατο πρόβλημα για μικρά παιδιά, άτομα μεγάλης ηλικίας και ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Η ασθένεια είναι θανατηφόρα αν δεν δοθεί έγκαιρα η σωστή θεραπευτική αγωγή.

Η κλινική διάγνωση της λεϊσμανίασης είναι δύσκολη γιατί τα ίδια κλινικά συμπτώματα μπορεί να χαρακτηρίζουν και πολλές άλλες ασθένειες. Μπορεί να τεθεί

εργαστηριακά μετά από τη διενέργεια ειδικών εξετάσεων, όπως είναι η αναζήτηση αντισωμάτων στον ορρό του αίματος με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και της ηλεκτροσυναίρεσης, με άμεση μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων από πολφό λεμφογαγγλίου, σπλήνα και μυελό των οστών και τέλος με καλλιέργεια παθολογικών υλικών σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα με σκοπό την απομόνωση του παράσιτου.

Θεραπεία της νόσου

Για τη θεραπεία της νόσου μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα πεντασθενή αντιμονιακά φάρμακα, η αλλοπουρινόλη, η αμφοτερικίνη Β και η αμινοσιδίνη σε διάφορους συνδυασμούς ανάλογα με το θεραπευτικό πρωτόκολλο που ακολουθείται. Μολονότι μέσω της θεραπείας επιτυγχάνεται η κλινική ίαση στα σκυλιά, σπανίως αυτή έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη εξάλειψη των παρασίτων με αποτέλεσμα οι υποτροπές να είναι συχνές. Για το λόγο αυτό οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, υιοθετώντας τις υποδείξεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, συστήνουν ευθανασία των θετικών ζώων.

Η πρόληψη της λεϊσμανίασης στηρίζεται στην αντιμετώπιση των εντόμων που τη μεταδίδουν και μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:

- Ψεκασμοί με εντομοκτόνα

Η καταπολέμηση των φλεβοτόμων σε επίπεδο Δήμου ή Κοινότητας μπορεί να γίνει με τοπικό ψεκασμό των καταφυγίων τους με εντομοκτόνα. Τέτοια καταφύγια είναι τα σκουπίδια, οι φωλιές των τρωκτικών, τα εσωτερικά τοιχώματα των πηγαδιών, οι τοίχοι παλιών ή εγκαταλελειμμένων κτιρίων και γενικότερα όπου υπάρχουν ρωγμές, σκιά και υγρασία που είναι δυνατόν να φιλοξενούν τους φλεβοτόμους κατά την διάρκεια της ημέρας.

- Χρήση συρμάτινων πλεγμάτων - κουνουπιέρων

- Σε περιοχές όπου υπάρχουν Φλεβοτόμοι είναι καλό να τοποθετούνται πολύ ψιλά συρμάτινα πλέγματα στα παράθυρα.
- Όσοι κοιμούνται στο ύπαιθρο μπορούν να χρησιμοποιούν ειδικές κουνουπιέρες με τρύπες μικρότερης διαμέτρου από τις συνηθισμένες, εμπλουτισμένες με κατάλληλα εντομοκτόνα.
- Όσοι εργάζονται στο ύπαιθρο, σε περιοχές όπου υπάρχουν Φλεβοτόμοι, μετά τη δύση του ήλιου πρέπει να φορούν μακριά παντελόνια, πουκάμισα, κάλτσες και να καλύπτουν με εντομοαπωθητικά τα μέρη του σώματος που

μένουν ακάλυπτα.

- Προστασία των σκύλων

  - Τα σπιτάκια των σκύλων πρέπει να ψεκάζονται τακτικά με εντομοκτόνα από τα μέσα της άνοιξης μέχρι τα μέσα του φθινοπώρου (και όσο είναι ζεστός ο καιρός).
  - Τα ζώα πρέπει να προστατεύονται από τις σκνίπες με κατάλληλα εντομοαπωθητικά σκευάσματα (ιδίως το καλοκαίρι).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 15: Επιστημονικές ημερίδες. Διοργανώθηκαν τρεις επιστημονικές ημερίδες με σκοπό τη διαφώτιση των γιατρών και των κτηνίατρων για την λεϊσμανίαση και τους στόχους της μελέτης και τη δημιουργία δικτύου συνεργασίας. Επιπλέον, στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος LeishMed παρουσιάστηκε το θέμα «Leishmania infantum in Cyprus. Geographical distribution of disease and drug resistance in dogs and humans».

α) ***<u>Σημασία της λεϊσμανίασης στη Δημόσια Υγεία</u>***

7 Μαΐου 2005, ώρα 3:00 - 7:00 μμ

Αίθουσα Εκδηλώσεων Τράπεζας Κύπρου (Λεωφ. Αρχ. Μακαρίου 117, Λεμεσός)

3:00 - 3:15	Άνοιγμα ημερίδας- Προσφώνηση από τον Διευθυντή Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, Δρ. Φειδία Λουκαΐδη.
3:15 - 4:00	Σπλαχνική και Δερματική λεϊσμανίαση στον άνθρωπο και στο σκύλο (Μ. Αντωνίου)
4:00 - 4:30	Θεραπεία της λεϊσμανίασης (Μ. Αντωνίου, Α. Μαζέρης)
4:30 - 5:00	Διάλειμμα
5:00 - 5:30	Λεϊσμανίαση και Δημόσια Υγεία. Επιτήρηση και έλεγχος της νόσου. (Μ. Αντωνίου)
5:30 - 6:00	Προβολή βίντεο του Π.Ο.Υ. για τη λεϊσμανίαση. Συζήτηση
6:00 - 7:00	Εργαστηριακή διάγνωση της λεϊσμανίασης στον άνθρωπο και στο σκύλο. Προβολή βίντεο με επίδειξη δειγματοληψίας μυελού των οστών, εργαστηριακών τεχνικών και ζωντανού υλικού (Μ. Αντωνίου, Α. Μαζέρης, Ι. Μεσσαριτάκης)

β)

ΙΑΤΡΙΚΟΣ ΣΥΛΛΟΓΟΣ ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΥ "ΓΑΛΗΝΟΣ"

Αγαπητέ συνάδελφε,

Καλείσαι στην επόμενη επιστημονική εκδήλωση του Συλλόγου μας.

Χώρος	Αίθουσα διαλέξεων ξενοδοχείου Sun Hall Λάρνακα
Ημερομηνία	Πέμπτη 12 Οκτωμβίου 2006
Ώρα	7.45μ.μ.ακριβώς

- **Λεϊσμανίαση, μια επανεμφανιζόμενη απειλή.**
  Μαρία Αντωνίου
  Επίκουρος καθηγήτρια Παρασιτολογίας
  Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας Παρασιτολογίας,Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής
  Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης.

- **Ρικετσιώσεις,νέα διαγνωστική προσέγγιση.**
  Άννα Ψαρουδάκη
  Λέκτορας Μικροβιολογίας
  Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας Παρασιτολογίας,Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής
  Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης.

Συντονίστρια ***Μαρία Αλεξάνδρου***
Ιατρός Μικροβιολόγος - Γενικό Νοσοκομείο Λεμεσού/Λάρνακας

2 βαθμοί Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης.

Θα ακολουθήσει δείπνο.
Χορηγός της εκδήλωσης Φαρμακευτική Εταιρία REMEDICA

ΙΑΤΡΙΚΟΣ ΣΥΛΛΟΓΟΣ «ΓΑΛΗΝΟΣ» ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΥ ΙΔΡΥΘΕΙΣ 1959

Δρ Ανδρέας Παλλούρας
Πρόεδρος

Δρ Βάσος Οικονόμου
Γραμματέας

Διοικητικό Συμβούλιο

Πρόεδρος	Αντιπρόεδρος	Γραμματέα	Ταμίας	Μέλη
Ανδρέας Παλλούρας	Ρένος Χριστοδούλου	Βάσος Οικονόμου	Ανδρέας Αναξαγόρας	Κυριακή Τσόκκου Μαρία Αλεξάνδρου Χριστόδουλος Μαζέρης

γ) ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΝΤΟΠΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ 2006

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΕΜΕΣΟΥ

Θέμα: ***«ΠΑΡΑΣΙΤΩΣΕΙΣ, ΡΙΚΕΤΣΙΩΣΕΙΣ»***

Κύριες Ομιλήτριες:

1. ***ΜΑΡΙΑ ΑΝΤΩΝΙΟΥ***
   Επίκουρη καθηγήτρια παρασιτολογίας
   Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας,
   Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής
   Πανεπιστημίου Κρήτης,

2. ***ΑΝΝΑ ΨΑΡΟΥΛΑΚΗ***
   Λέκτορας Μικροβιολογίας
   Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας,
   Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής
   Πανεπιστημίου Κρήτης,

Συνεργάτες:

3. ***ΚΟΚΚΙΝΗ ΣΟΦΙΑ***
4. ***ΧΟΧΛΑΚΗΣ ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ***

Οργανωτές: Μικροβιολογικό Εργαστήριο Γενικού Νοσοκομείου Λεμεσού.

Υπεύθυνοι Προγράμματος: Μαρία Αλεξάνδρου
Βιοπαθολόγος, Μικροβιολόγος.
Υπεύθυνη Μικροβιολογικού Εργαστηρίου

Γεωργία Λαού
Λειτουργός Μικροβιολογικού Εργαστηρίου.

Χώρος διδασκαλίας: Αίθουσα Διαλέξεων Γενικού Νοσοκομείου Λεμεσού, (1ος όροφος)

Ημερομηνία: 12-13 Οκτ. 2006

Στους συμμετέχοντες θα δοθούν Πιστοποιητικά Παρακολούθησης.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Παρασκευή - 13 ΟΚΤ. 2006

08:30 - 09:00 Προσέλευση – Εγγραφές.

09:00 - 10:00 Η λεϊσμανίαση στη Μεσόγειο και στην Κύπρο (Μ. Αντωνίου, Α. Μαζέρης)

10:00 - 10:15 Συζήτηση.

10:15 - 10:45 Διάλειμμα- Καφές

10:45 - 11:45 Η τοξοπλάσμωση, ένα πρόβλημα στην εγκυμοσύνη (Μ. Αντωνίου)

11:45 - 12:00 Συζήτηση

12:00 - 12:15 Διάλειμμα – Καφές.

12:15 - 13:15 Πρωτόζωα του πεπτικού (Μ. Αντωνίου)

13:15 - 13:30 Συζήτηση.

Κατά τη διάρκεια του Σεμιναρίου
οι ομιλίες θα συνοδεύονται
με την επίδειξη σχετικών παρασκευασμάτων στο μικροσκόπιο
στο χώρο της διάλεξης.

δ)

WP6

Workshop on Leishmaniases chemotherapy and drug resistance

4 – 6 November 2006

Sandy Beach Hotel, Larnaca, Cyprus

Saturday 4 November: Plenary meeting 1

Introduction(chair: A.Mazeris)

09:00 Welcome: presentation of host institution (Apostolos Mazeris)

09:15 Official opening of the workshop (the Minister of Agriculture, Natural Resources and Environment of Cyprus)

09:30 Introduction of participants

09:40 Aim and agenda of the workshop (Jean-Claude Dujardin)

09:50 Mini-talk: challenges of Leishmaniases chemotherapy (Pierre Buffet)

Session 1. Monitoring and improving current treatment schemes (chair: H.Louzir)

10:10 Monitoring visceral leishmaniasis treatment in Italy (L.Gradoni)

10:30 Immunomodulation for treatment of leishmaniasis (J.Golenser, HUJI).

10:50 Two problematic Israeli CL foci (M.Ephros, Technion)

11:10 Coffee break

11:30 Clinical, serological and parasitological evaluation of 54 dogs naturally infected by *Leishmania infantum* submitted to treatment with meglumine antimoniate (A.Dakkak, IAV)

11:50 Assessment of dog infectivity to sandflies after conventional therapies against canine leishmaniasis (C.Cañavate, ISCIII)

12:10 New derivatives of amphotericin B (J.Golenser, HUJI)

12:30 Combination chemotherapy for Leishmaniasis? *In vitro* and *in vivo* interactions of anti-leishmanial drugs (K.Seifert, LSHTM)

12:50 General discussion

13:15 Lunch

Session 2. Drug resistance (chair: L.Gradoni)

14:30 *Leishmania infantum* in Cyprus. Geographical distribution of disease and drug resistance in dogs and humans (M.Antoniou, A. Mazeris, VS-Cyprus).

14:50 Treatment used in Algeria and drug resistance (N.Seridi, IPA)

15:10 Antimony treatment failure and SbV resistance: a comprehensive review (S.Decuypere, ITMA)

15:30 Coffee break

16:00 Study of resistance mechanisms to miltefosine (J.M. Perez-Victoria, CSIC)

16:20 What can be learned from studies on drug resistance in fungi? (G.Schonian, HUB)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 16: Δημοσιότητα

Κατά την διάρκεια εξέλιξης της μελέτης και με αφορμή τα πολύ σημαντικά αποτελέσματα της μελέτης όλες οι εφημερίδες, οι ραδιοφωνικοί και τηλεοπτικοί σταθμοί της Κύπρου έδωσαν μεγάλη σημασία στο θέμα της λεϊσμανίασης, το οποίο κάλυψαν με εκτενή ρεπορτάζ και βοήθησαν στην ενημέρωση των κατοίκων του νησιού.

α)

η σημερινή

30 χρόνια

ΟΠΟΙΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΣΥΛΛΟΓΑΤΑΙ ΣΥΛΛΟΓΑΤΑΙ ΚΑΛΑ

Νεκροί οι Κλέων Παπαδόπουλος και Χρίστος Λεβεντόπουλος

ΤΟΥΣ ΓΑΖΩΣΑΝ μέρα μεσημέρι

Εναντίον τους ρίχθηκαν 24 σφαίρες από κοντινή απόσταση

Φόβοι για νέο κύκλο αίματος μεταξύ βαρόνων της νύχτας

Είχε προσβληθεί και ο Μακάριος

Νέες καταγγελίες για τις Παγκύπριες

Συλλήψεις για το φόνο του Κινέζου

Επικρίσεις κατά της ΑΗΚ

Ανεπιθύμητος στο Προεδρικό ο Μπράιζα

ΠΡΟΣΟΧΗ ΑΠΟ ΤΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

ΖΩΗ ΣΤΟΝ 7ΧΡΟΝΟ ΛΕΥΤΕΡΗ

ΔΗΣΥ - ΔΗΚΟ για Δημοτικές

Η Εμπορική ενημερώνει

Απόβαινας κατά Κορκ

β)

Εξαπλώνεται επικίνδυνα τώρα η λεϊσμανίαση

Διπλασιάστηκαν τα κρούσματα σε σκύλους

Η νόσος, σύμφωνα με τη δρα Μαρία Αντωνίου, άρχισε να μεταδίδεται και σε άλλες απομακρυσμένες περιοχές της μεταφοράς σκυλιών.

ΤΟΥ ΚΩΣΤΑ ΣΑΒΒΑ

Δύο διπλασιάστηκαν σε πολύ σύντομο χρόνο τα κρούσματα λεϊσμανίασης στα σκυλιά της Λεμεσού και Πάφου, ενώ αρκετές νέες περιοχές εκτός αυτών μας τρομοκρατούν ακόμη περισσότερο, αφού δυνάδες συμπολίτες μας τα τελευταία χρόνια μεταφέρονται από ανυποψίαστους πολίτες και ελλάδες... σπίτια.

ΚΙΝΔΥΝΟΣ
Προσοχή στα μικρά παιδιά

Όπως μάθαμε πρόσφατα η επιδημιολόγος καθηγήτρια Παρασκευή Φλουρή στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Πάφου δρ Μαρία Αντωνίου, εάν δεν ληφθούν μέτρα, θα υπάρξει χρονοπρόβλεψη κρουσμάτων της νόσου σε ανθρώπους και ιδιαίτερα σε παιδιά κάτω των πέντε ετών.

Το πρόβλημα στην Κύπρο

Η λεϊσμανίαση στην Κύπρο υπήρχε από παλιά. Ωστόσο αντιμετωπίστηκε αποτελεσματικά, αφού ο κύκλος ζωής του παράσιτου δυσκόλευε στην προσπάθεια ελέγχου του ξυλοκόριζου, κατά την οποία ο πληθυσμός των σκυλιών από 40.000 μειώθηκε στις 5.000. Αυτήν τη στιγμή όμως υπολογίζεται ότι στην ελεύθερη Κύπρο υπάρχουν 100.000 σκυλιά.

Μελέτες που έγιναν το 1996, από ξένους ερευνητές σε συνεργασία με τις Κυπριακές Υπηρεσίες, δείχνουν ότι η λεϊσμανίαση υπάρχει ενδημικά στην Κύπρο και ιδιαίτερα στην περιοχή της Πάφου και Λεμεσού φιλοξενούσαν το παράσιτο. Τέτοιο ποσοστό ο ίδιος εμπειρίας Υπηρεσίες άρχισαν να διερευνούν σε βάθος το θέμα, με πληροφοριοδότηση του Κράτους Προϋπηγής Τρόπου Κύπρου.

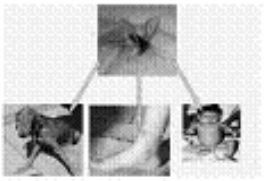
Σύμφωνα με τη δρα Αντωνίου, η σύμπτωση αμφίπλευρα σε σκυλιά από 20 μονά, σε 30 περιοχές, στις πέντε επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου άρχισε το καλοκαίρι του 2005. Τα

Τι είναι η λεϊσμανίαση

Η λεϊσμανίαση, σύμφωνα με τη δρα Αντωνίου, εκτιτίθεται κυρίως σε κάποιες δόσεις σκύλων μολυσμένες σκύλους σκυλιών και σκύλων κρυφά της σκύλου, η οποία κατοικεί το σκύλοπολύ κύριο για τα παιδιά δόσεις τα σε δόλια, ή στον ανθρώπινο οργανισμό.

Το παράσιτο λεϊσμανία είναι μικρό κοντυλόσχημο μέσα στα κύτταρα του σπονδυλικού και διαθέτει ο οργανισμός για να σκοτώνει τους εισβολείς. Όμως η λεϊσμανία δεν κάθεται στο σπίτι κάνει ένα ταξίδι στο σώμα τους, ή καλύτερα σε κάποιο κύτταρο και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται. Όταν δε τα κύτταρα ξεχειλίσουν από παράσιτα, σπάει και κυκλοφορεί κάτω μολύνοντας. Τότε μόνο τα κύτταρα αρχίζουν δεν είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν το παράσιτο, αποτελεσματικά νόσος.

η οποία σιγά-σιγά εκφυλίζεται υπό δύο μορφές: Τα δέρματα κάνει σπιλωματά, η οποία είναι η σοβαρότερη, αφού δεν δίνει δυσκολία και θεραπεύεται δύσκολα, μπορεί να σταθεί η νόσος.



■ Πώς μπορεί δοθεί η ασθ νόσο σε σκύλους και σε παιδιά.

Μέτρα πρόληψης

Οι ΕΚΗΠΕΣ είχαν τα δικαιώματα να πετύχουν 100 μέτρα απόστασης. Σκεφτείτε, δεν πιο πολλά είναι τα μεγάλα σκυλιά μας πεφτουν δίλεπτα κόστος μεγάλες είναι οι πιθανότητες τα τσιμπήσουν από κάποιο ρυπαρό σκυλί. Σε κάθε σε κοινή βρίσκεται το 50% των σκυλιών τα είναι ρυπαρά με τα παράσιτα.

Όπως σπουδάζουν οι ειδικοί, υπάρχουν μέτρα προφύλαξης από τα λεϊσμανιόζα. Μεταξύ αυτών είναι η εξοπλίζουν αντιπαρασιτικών για τα σκυλιά, η χρήση κατάλληλου το βάθη, η εξοπλίζουν αντιπαρασιτικών σκευασμάτων για τους ανθρώπους και η δίνει γιατί εξετάσεων στα σκυλιά και δεν φορές τη χρήσιμα.

Όταν οι σκύλοι δεν πάνε από τα χαμηλά κάνει τους στην αυλή τους δίνοντες και όταν κάνει πάει για λίγο το φαινόμενο. Δεν πρέπει στη σε γυρνάξουν σκυλιά εάν δεν κόστος 3.000 ευρώ και ότι είναι κοντά από τα παράσιτα κάτω φτιάχτε βοήθεια και Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, για αντιλεϊσμανιακή αντιμετώπιση της νόσου.

Engineering Vacancy
(Multinational Energy Leaders)

The Employers

The employers are multinational world-leaders and pioneers in the energy field. They implement enviable most-competitive employment and reward practices.

The Role

The role covers the following functions:

- Management of construction projects and execution of M&R through outside contractors
- Diligent oversight in areas of safety, quality and costing
- Project planning/permitting
- Customer interface and communication
- Other field engineering tasks as required

Person Specifications

- Civil or Mechanical Engineering degree from a competitive university
- Sound Technical skills and 2-5 years of field experience
- Sound business judgement and ability to negotiate
- Strong interpersonal skills
- Ability to work under pressure
- Drive and ambition to further develop into more senior positions
- Second degree in Management will be considered as an additional advantage
- Knowledge of computer systems ie. EXCEL, WORD, POWERPOINT
- Strong command of English Language (speaking, writing)

Declaration of interest

If you meet the above stringent requirements and are interested in the job please submit to us electronically your most recent C.V. as the interview/evaluation panel will be convening very soon.

Aris Petasis & Associates
(Management Consultants) Ltd
Tofarco House, 28 Hydrou Str., P.O.Box 25185 CY 1309 Nicosia,
Tel. 22 76 44 33, Fax: 22 76 84 48
e-mail: petasis@logos.cy.net www.petasisassociates.com

ΓΙΝΟΤΕ ΔΕΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙ ΣΩΣΤΑ

Παράπονα λουομένων στη Μακένζι

ΤΟΥ ΑΝΝΙΑ ΚΥΠΡΙΑΝΟΥ

Παρά πολλά ξενοδοχεία η λουόμενος στην παραλιακή περιοχή Μακένζι στη Λάρνακα, τα εξάρα προβλήματα που παρουσιάζονται ιδιαίτερα κατά τα Σαββατοκύριακα, όπου παρατηρείται σημαντική κίνηση στην περιοχή.

Όπως καταγγέλλουν στην εφημερίδα μας τοπικοί επιχειρηματίες στην περιοχή Μακένζι, το σύνθημα για σταθμεύση στο χώρο σταθμευσης ήρθε σταθμεύσει από 20 ευρώ σε μία λίρα και ύστερα ανήφοδοι τα παράπονά τους προς το Δήμο, ζητώντας μια μόνιμη λύση γι' αυτούς που κάθε μέρα είναι στην περιοχή ή μαν άλλη δυνατότητα. Πολλά από τα ιπτάμενα στην περιοχή δεν δουλεύουν την Κυριακή, αφού ο κόσμος τα κάνει γιαλιεμένα και οι αρμόδιες υπηρεσίες κάνουν τα τα σπεβρίσουν, αφού ο κόσμος τα λουσμένα και δημιουργεί μια ωραιότερη εικόνα για τη Λάρνακα. Παράπονα ακούγονται και για το ωράριο εργασίας των καταστημάτων της περιοχής, αφού στην περιοχή Μακένζι τηρείται στις 10.30 το πρωί και φτάνουν στις 8 το απόγευμα. Όπως ανέφεραν κάποιοι στην εφημερίδα μας, υπάρχει κόσμος που κάνει μπάνιο πιο νωρίς ή και αργά το απόγευμα, γι' αυτό και η Επαρχιακή Διοίκηση Λάρνακας θα μπορούσε να εκσυγχρονίσει τα ωράρια βάρδιας των καταστημάτων, έτσι ώστε η επιχείρηση όλες τις ώρες η παραλιακή περιοχή.

γ)

2/ΠΙΣΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ

Ο Φιλελεύθερος ΤΕΤΑΡΤΗ 12 ΙΟΥΝΙΟΥ 2006

Κινδυνεύουμε από τη λεϊσμανίαση

Μορφή χιονοστιβάδας αν δεν ληφθούν μέτρα

ΤΑ ΠΡΩΤΑ κρούσματα λεϊσμανίασης σε ανθρώπους στην Πάφο είναι μόνο η αρχή και οι αριθμοί προειδοποιούν πως σε περίπτωση που δεν ληφθούν μέτρα, ο αριθμός των ανθρώπων –ειδικά των παιδιών κάτω των πέντε ετών– που θα αναπτύξουν τη νόσο θα εξελιχθεί σε χιονοστιβάδα. Μάλιστα, όπως παραδέχονται, τα δύο κρούσματα που εμφανίστηκαν σε άνθρωπο (δερματική μορφή) και Λίγο αργότερα σε ένα παιδάκι (σπλαχνική μορφή της νόσου) δεν τους έπεσαν εξ ουρανού. Ανησυχητικό είναι ότι η μελέτη του παράσιτου που ο άνθρωπος νοσεύει από το παιδάκι με σπλαχνική λεϊσμανίαση έδειξε ότι ήταν εξαιρετικά ανθεκτικό στα φάρμακα.

Το Πανεπιστήμιο προγραμμάτιζε να ανακοινώσει στο Υπουργείο Υγείας τα αποτελέσματα έρευνας που καταδεικνύει το διπλασιασμό των κρουσμάτων σε σκυλιά μέσα σε έννιά χρόνια. Από ένα μέσο όρο 11% στις επαρχίες Πάφου και Λεμεσού έφτασαν στο 20%. Το πιο ανησυχητικό αποτέλεσμα όπως αναφέρεται σε μελέτη της Επίκουρου Καθηγήτριας Παρασιτολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κύπρου δρ Μαρίας Αντωνίου είναι ότι στις περιοχές Λευκωσίας, Αμμοχώστου και Λάρνακος τα μόνα θετικά σκυλιά που βρέθηκαν μέχρι σήμερα είναι σκυλιά που είχαν μεταφερθεί εκεί από την επαρχία Πάφου. Σε κάποιες περιοχές βρέθηκε το 33% των σκυλιών να είναι μολυσμένα με το παράσιτο.

Η νόσος ακμάζει σε περιοχές όπου το κλίμα ευνοεί την επιβίωση και αναπαραγωγή της σκνίπας

Τα σκυλιά αυτά αποτελούν πηγή μόλυνσης των περιοχών στις οποίες μεταφέρθηκαν και αναμένεται ότι, αν δεν παρθούν μέτρα, θα ξεκινήσουν καινούργιες εστίες της νόσου στις περιοχές αυτές. Όπως εξηγεί, για να εξαπλωθεί η νόσος το μόνο που χρειάζεται είναι ένα μολυσμένο σκυλί. Μελέτες που έγιναν σε πολλές χώρες του κόσμου, καταδεικνύουν ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των μολυσμένων σκυλιών σε μια περιοχή τόσο αυξάνεται ο αριθμός των ανθρώπινων κρουσμάτων.

Η λεϊσμανίαση είναι μια νόσος γνωστή από τα αρχαία χρόνια και απαντάται σε περιοχές όπου οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν την επιβίωση και αναπαραγωγή της σκνίπας. Η σκνίπα είναι έντομο μικρότερο και πιο ανοιχτόχρωμο από το κουνούπι και το πέταγμά της δεν ακούγεται. Η σκνίπα είναι ο αποφασιστικός κρίκος που συνδέει το ένα μολυσμένο ζώο με το άλλο.

ΑΓΓΕΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΥ

ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ

ΤΕΤΑΡΤΗ 12 ΙΟΥΛΙΟΥ

ΑΝΑΤΟΛΗ ΗΛΙΟΥ: 5.42' · ΔΥΣΗ: 7.03'
ΣΕΛΗΝΗ: 17 ημερών

ΕΟΡΤΟΛΟΓΙΟ

Των αγίων Πρόκλου και Ιλάριου

Οι άγιοι αυτοί έζησαν στα χρόνια του αυτοκράτορα Τραϊανού, στις αρχές του 2ου μ.Χ. αι. Η καταγωγή τους ήταν από ένα χωριό κοντά στην Λυκεόρα. Ο Πρόκλος είχε γεννηθεί τον Ιλάριο και ήταν ενωμένοι και με τη θερμή πίστη και αγάπη τους στον Χριστό. Οι δραστηριότητες των δύο αγίων έγιναν αιτία να σταλληθεί ο Πρόκλος και να οδηγηθεί μαρτυρικά στον Ένεμπρο που τον κατοδίκασε σε θάνατο. Στο θρύλο για την εκτέλεση τον αποκεφαλισμό υπάρχει ο Ιλάριος που ορκιζόταν και αυτός ότι ήταν χριστιανός. Τον μεν Πρόκλο σκότωσαν με θέλη τον δε Ιλάριο με αποκεφαλισμό.

ΑΥΡΙΟ: Του οσίου Στεφάνου

ΕΦΗΜΕΡΑ

Η αλυσίδα της τρομοκρατίας

ΗΤΑΝ ένος βάρβαρος, παράφρονας δολοφόνος. Δεν υπάρχουν δικαιολογητικά για ένα άνθρωπο που σκότωνε 300 σταθμά τόσο στο σκοπό τους

ΤΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ ΣΕ 5 ΛΕΠΤΑ — ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ · ΣΤΟΝ ΚΟΣΜΟ

Η ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΟΥΣ επιλέγει τα κυριότερα γεγονότα του 24ώρου · panagiota.charalambous@philelefheros.com

ΜΑΡΑΘΩΝΙΟΣ ΕΠΑΦΩΝ

Στην πρώτη γραμμή της επικαιρότητας η εποχές του Τ. Παποδόπουλου στην Αθήνα. Παπανδρέου και Παπαρήγα χθες στη λίστα του Προέδρου. Ευκαιρία για νέο οδικό κάρτη τύπου Ελούνκι «βλέπει» ο Πρόεδρος του ΠΑΣΟΚ και συνεχίζει τον Τ. Παπα-

ΣΤΗ ΔΙΝΗ ΤΗΣ ΒΙΑΣ

Για μία ακόμη ημέρα, τα όπλα «μίλησαν» στο Ιράκ. Τουλάχιστον 36 άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους σε νέα βίαια επεισόδια στη Βαγδάτη, μεταξύ των οποίων και δέκα Ιρακινοί στρατιώτες. Μεταπολεμική

ΣΑΝ ΣΗΜΕΡΑ

δ)

η σημερινή | ΠΕΜΠΤΗ 2 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2006 — Ειδήσεις 33

Λεϊσμανίαση εντός των πυλών

Ανησυχούν οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες

Μεθαύριο Σάββατο φιλοξενείται στην Κύπρο διεθνές εργαστήρι για τη θεραπεία της ασθένειας με φάρμακα. Στο συνέδριο θα λάβουν μέρος ερευνητές από 22 χώρες.

ΤΗΣ ΦΩΤΕΙΝΗΣ ΠΑΝΑΓΗ

Σε «σιωπηλό» συναγερμό παραμένουν οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, προκειμένου να αποτρέψουν τυχόν εξάπλωση των κρουσμάτων της λεϊσμανίασης σε σκύλους και στις επαρχίες Λευκωσίας, Λάρνακας και Αμμοχώστου. Η νόσος έχει «τρυπώσει» για τα καλά σε Πάφο και Λεμεσό, αφού τα τελευταία δέκα χρόνια παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη αύξηση των κρουσμάτων της ασθένειας σε σκύλους στις επαρχίες αυτές.

Σε δηλώσεις στη «Σ» ο κτηνιατρικός λειτουργός στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες Απόστολος Μαξέρης ανέφερε ότι έρευνα που βρίσκεται σε εξέλιξη εδώ και 2 ½ χρόνια κατέδειξε ότι το 20% των σκύλων σε Πάφο και Λεμεσό φιλοξενούν το παράσιτο της λεϊσμανίασης. Το ποσοστό αυτό καταδεικνύει ότι τα κρούσματα στους σκύλους έχουν διπλασιαστεί τα τελευταία δέκα χρόνια.

«Οι περισσότεροι μολυσμένοι σκύλοι ζουν στις περιαστικές περιοχές των επαρχιών αυτών», πρόσθεσε. Οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες ανησυχούν ότι η μεταφορά μολυσμένων σκύλων από Πάφο και Λεμεσό στις υπόλοιπες επαρχίες θα δημιουργήσει νέες εστίες μόλυνσης. «Δεν έχουμε όμως ενδείξεις ότι η νόσος εξαπλώθηκε, παρά το γεγονός ότι παρουσιάστηκαν μεμονωμένα κρούσματα σε άλλες επαρχίες. Οι μολυσμένοι σκύλοι είχαν μεταφερθεί από την Πάφο ή τη Λεμεσό», τόνισε.

Ως γνωστό, η λεϊσμανίαση είναι παρασιτική νόσος που μεταδίδεται με το τσίμπημα ορισμένων ειδών φλεβοτόμων (σκνίπες). Οι σκνίπες μολύνονται όταν προηγουμένως έχουν τσιμπήσει ένα μολυσμένο ζώο.

Στον άνθρωπο μεταδίδεται από το τσίμπημα μολυσμένων φλεβοτόμων. Η θεραπεία των μολυσμένων ζώων είναι χρονοβόρα και ενδέχεται να κρατήσει εφ' όρου ζωής. Η Λεϊσμάνια, σύμφωνα με επιστημονικές έρευνες, άρχισε να δείχνει αντοχή στα αντιμονιούχα φάρμακα.

Διεθνές εργαστήρι

Οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες θα φιλοξενήσουν το προσεχές Σαββατοκύριακο διεθνές εργαστήρι, για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης με φάρμακα, στο πλαίσιο του ευρωπαϊκού προγράμματος "Leish - Med", το οποίο ξεκίνησε πριν από δύο χρόνια, με χρηματοδότηση της ΕΕ. Στο εργαστήρι θα συμμετάσχουν επιστήμονες από τα σημαντικότερα ερευνητικά κέντρα και πανεπιστημιακά ιδρύματα 22 χωρών, ευρωπαϊκών και μεσογειακών. Οι εργασίες του εργαστηρίου θα ξεκινήσουν το Σάββατο με διαλέξεις, ενώ την Κυριακή θα πραγματοποιηθεί εκπαιδευτική εκδρομή σε περιοχές της επαρχίας Πάφου, η οποία παρουσιάζει και τα πιο ψηλά ποσοστά κρουσμάτων της νόσου σε σκύλους.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ
Η λεϊσμανίαση είναι ανθεκτική σε ορισμένα φάρμακα

■ **Ο άνθρωπος** προσβάλλεται από λεϊσμανίαση, όταν δεχτεί τσίμπημα από μολυσμένη σκνίπα. Τα κρούσματα όμως στον άνθρωπο είναι σπάνια.

ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΓΕΝΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΛΤΔ
ΕΡΓΟΛΑΒΟΙ ΟΙΚΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΕΡΓΩΝ ΟΔΟΠΟΙΙΑΣ
ESTABLISHED IN 1947

ΑΜΕΣΕΣ ΕΥΚΑΙΡΙΕΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΕΛΙΞΗΣ

Η Εταιρεία Γενικών Κατασκευών Λτδ., μία από τις πιο μεγάλες Εταιρείες Εργολάβων Οικοδομών και Έργων Οδοποιίας στην Κύπρο, ζητά να εργοδοτήσει το ακόλουθο προσωπικό για ΛΕΥΚΩΣΙΑ, ΛΑΡΝΑΚΑ ΛΕΜΕΣΟ και ΠΑΦΟ.

ΔΙΕΥΘΥΝΤΕΣ ΕΡΓΩΝ / ΑΝΩΤΕΡΟΙ ΜΗΧΑΝΙΚΟΙ
- Πολιτικοί Μηχανικοί Απόφοιτοι Πανεπιστημίου
- 10 χρόνια ελάχιστη πείρα σε μεγάλα έργα οικοδομών και οδοποιίας
- Άριστη γνώση της Αγγλικής γλώσσας για αλληλογραφία συμβολαίων
- Γνώση Ηλεκτρονικού Υπολογιστή σε προγράμματα χρονοδιαγραμμάτων κατασκευών
- Πείρα σε Συμβόλαια εξωτερικού θα θεωρηθεί επιπρόσθετο προσόν
- Οι προσληφθέντες θα είναι υπόλογοι στον Διευθυντή Κατασκευών

ΜΗΧΑΝΙΚΟΙ ΕΡΓΟΤΑΞΙΩΝ
- Απόφοιτοι Πανεπιστημίου / Κολεγίου στον κλάδο Πολιτικής Μηχανικής
- 3 χρόνια ελάχιστη εμπειρία σε οικοδομικά έργα
- Άριστη γνώση της Αγγλικής γλώσσας

ε)

ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ

Ο εφιάλτης ενός παιδιού και το κράτος

Του Άριστου Μιχαηλίδη

Τρεις κρατικές υπηρεσίες δεν κατάφεραν να σώσουν ένα κοριτσάκι

Σκύλοι στρατοπέδευσαν σε καταυλισμό αθιγγάνων

Ολοήμερη εκστρατεία αιμοληψίας και αναλύσεων στη Μακούντα

> Η λεϊσμανίαση δεν μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο
> Μόλυνση ίσως από τα κατεχόμενα

Εξιτήριο πήρε το βρέφος

Πιο ευπαθή τα άτομα με αδύναμο ανοσοποιητικό

ΧΑΙΡΕΤΙΣΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΕΞΟΥΣΙΑ

Του Γ. Σέρτη

Προς Αμήχανους

Τρόμος από θανατηφόρα λεϊσμανίαση

> Συναγερμός Ιατρικών και Κτηνιατρικών Υπηρεσιών
> Ένα τσίμπημα σκνίπας μπορεί να μας φορτώσει τη νόσο
> Μολυσμένα σκυλιά αθιγγάνων στην Πάφο

Μεγαλύτερος κίνδυνος μόλυνσης το απόγευμα

Πυρετός, αδυναμία, αναιμία, τα συμπτώματα

Μολυσμένο πάνω από 1,7% των σκύλων

Διάταγμα για υποχρεωτικά μέτρα προστασίας

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 17: Ενημερωτικό υλικό που εκδόθηκε από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες σε συνεργασία με τις Ιατρικές Υπηρεσίες και Υπηρεσίες Δημόσιας Υγείας για ενημέρωση του κοινού σχετικά με την λεϊσμανίαση.

από το ήπαρ). Παρουσιάζονται επίσης αναιμία, πτώση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Συνυπάρχει διόγκωση λεμφαδένων. Τα συμπτώματα αυτά μπορούν να παρατηρηθούν μερικές εβδομάδες έως ένα χρόνο μετά τη μόλυνση.

ΣΥΜΒΟΥΛΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΑΠΟ ΤΗ ΛΕΣΜΑΝΙΑΣΗ

- **Ψεκασμοί με εντομοκτόνα**

Η καταπολέμηση των φλεβοτόμων σε επίπεδο δήμου ή κοινότητας μπορεί να γίνει με τοπικό ψεκασμό πεδινών καταφυγίων τους, με εντομοκτόνα. Τέτοια καταφύγια είναι τα σκουπίδια, οι φωλιές τρωκτικών και πτηνών, τα εσωτερικά τοιχώματα των πηγαδιών, οι τοίχοι παλιών ή εγκαταλελειμμένων κτιρίων και οι χώροι που βρίσκονται προσδεδεμένοι σκύλοι. Γενικά, όπου υπάρχουν ρωγμές, σκιά και υγρασία είναι δυνατόν να φιλοξενούνται φλεβοτόμοι κατά τη διάρκεια της ημέρας.

- **Συρμάτινα πλέγματα-κουνουπιέρες**
  - Σε περιοχές που υπάρχουν φλεβοτόμοι είναι καλό να τοποθετούνται πολύ λεπτά και πυκνά συρμάτινα πλέγματα στα παράθυρα (15 τρύπες ανά γραμμικό εκατοστό).
  - Όσοι κοιμούνται στο ύπαιθρο μπορούν να χρησιμοποιούν ειδικές κουνουπιέρες με τρύπες μικρότερης διαμέτρου από τις συνηθισμένες, εμπλουτισμένες με κατάλληλα εντομοκτόνα (πυρεθροειδή).
  - Όσοι εργάζονται στο ύπαιθρο, μετά τη δύση του ήλιου πρέπει να φορούν μακριά παντελόνια, πουκάμισα, κάλτσες και να καλύπτουν με εντομοαπωθητικά τα μέρη του σώματος που μένουν ακάλυπτα.

- **Προστασία των σκύλων**
  - Τα σπίτια των σκύλων πρέπει να ψεκάζονται τακτικά με εντομοκτόνα από τα μέσα της άνοιξης μέχρι τα μέσα του φθινοπώρου (και όσο ο καιρός είναι ζεστός).
  - Τα ζώα πρέπει να προστατεύονται από τους φλεβοτόμους με κατάλληλα εντομοαπωθητικά σκευάσματα (δίως το καλοκαίρι).
- **Μετακινήσεις μολυσμένων σκύλων**

Ζώα μολυσμένα με λεϊσμανίαση δεν πρέπει να μετακινούνται από τις περιοχές όπου διαβιούν, αλλά να τίθενται κάτω από αυστηρό περιορισμό, να προστατεύονται από τα τσιμπήματα των φλεβοτόμων (χρήση αντιπαρασιτικών σκευασμάτων εγγεγραμμένων για το σκοπό αυτό), να τους χορηγείται θεραπεία και να τίθενται υπό κτηνιατρική παρακολούθηση. Αν αυτό δεν είναι δυνατό, τότε θα πρέπει να γίνεται ευθανασία στα ζώα αυτά.

- **Κτηνιατρική εξέταση των σκύλων**

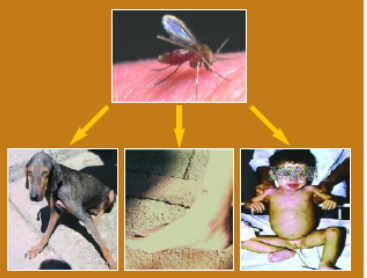
Οι σκύλοι, ιδίως αυτοί που ζουν στο ύπαιθρο σε περιαστικές περιοχές, πρέπει να εξετάζονται για λεϊσμανίαση 2 φορές το χρόνο (όταν ξυπνήσουν οι σκνίπες από τη χειμερία νάρκη τους, στην αρχή της άνοιξης, για να βεβαιωθούμε ότι ο σκύλος μας δεν είναι μολυσμένος και όρα μολυσματικός, και όταν πάνε οι σκνίπες και πάλι για ύπνο το φθινόπωρο, για να δούμε αν ο σκύλος μας έχει μολυνθεί)

Γ.Τ.Π. (2007— Εκδόθηκε από το Γραφείο Τύπου και Πληροφοριών Εκτύπωση).

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ

Ενημερωτικό φυλλάδιο για την προστασία από τη δερματική και σπλαχνική λεϊσμανίαση (καλά αζάρ)



Ιατρικές Υπηρεσίες και Υπηρεσίες Δημόσιας Υγείας - Υπουργείο Υγείας
Κτηνιατρικές Υπηρεσίες - Υπουργείο Γεωργίας Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος
2007

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ-ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Η λεϊσμανίαση είναι σοβαρή παρασιτική νόσος του ανθρώπου και των ζώων και οφείλεται στο παράσιτο Λεϊσμάνια. Οι σκύλοι θεωρούνται ότι είναι η σημαντικότερη δεξαμενή μόλυνσης του ανθρώπου. Το παράσιτο μεταδίδεται από σκύλο σε σκύλο ή από σκύλο σε άνθρωπο με το τσίμπημα ορισμένων ειδών φλεβοτόμων, τις σκνίπες, που είναι έντομα μικρότερα και πιο ανοικτόχρωμα από το κουνούπι, και το πέταγμά τους δεν ακούγεται: Η σκνίπα όταν τσιμπήσει μολυσμένο σκύλο παίρνει τα παράσιτα, τα οποία πολλαπλασιάζονται μέσα στο σώμα της, και στη συνέχεια με το τσίμπημα τα μεταφέρει σε άλλο ζώο ή στον άνθρωπο με αποτέλεσμα να τους μολύνει.

Οι σκνίπες δραστηριοποιούνται όταν ο καιρός είναι ζεστός (συνήθως από Μάιο έως Οκτώβριο) και τσιμπούν λίγο πριν τη δύση έως λίγο μετά την ανατολή του ήλιου. Ορισμένα είδη σκνιπών δεν είναι ενδοφιλικά έντομα, έται δεν μπαίνουν εύκολα μέσα στα σπίτια, ιδίως όταν μπορούν να απομυζούν αίμα από σκύλους ή άλλα ζώα γύρω από τις κατοικίες των ανθρώπων.

Φλεβοτόμος (σκνίπα)

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ

Σε ορισμένες περιοχές της Κύπρου, όπως και στις υπόλοιπες μεσογειακές χώρες, η λεϊσμανίαση είναι ένα από τα συχνότερα νοσήματα του σκύλου και το ποσοστό των ορολογικά θετικών σκύλων κυμαίνεται από 1-42%. Στους ανθρώπους το ποσοστό μόλυνσης είναι φαινομενικά μικρό. Από τυχαίες, όμως, ορολογικές εξετάσεις διαπιστώνεται ότι υπάρχει μεγάλος αριθμός ενηλίκων μολυσμένων από το παράσιτο, οι οποίοι όμως δεν εκδηλώνουν συμπτώματα. Συνεπώς δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η έκταση της ασθένειας στους ανθρώπους. Από το έτος 2007 η λεϊσμανίαση είναι υποχρεωτικά δηλούμενο λοιμώδες νόσημα.

ΠΙΘΑΝΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΚΥΛΟ

Τα σημαντικότερα συμπτώματα περιλαμβάνουν την αδυναμία, την ελαττωμένη φυσική δραστηριότητα, τη δερματοπάθεια (τριχόπτωση, πityρίδα, οζίδια, έλκη στα αυτά, βλέφαρα, αγκώνες κ.λ.π.) τη διόγκωση των λεμφαδένων και την απώλεια βάρους. Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί υπερμετρη ανάπτυξη και παραμόρφωση των νυχιών, διόγκωση του σπλήνα, διόγκωση του ήπατος, πυρετός, λεβαργικότητα, ανορεξία, αναιμία, χρόνια επιπεφυκίτιδα, βλεφαριτίδα και απόπτωση του τριχώματος γύρω από τα μάτια.

Προχωρημένη μορφή λεϊσμανίασης σε σκύλο

Υπέρμετρη αύξηση και παραμόρφωση των νυχιών σε σκύλο με λεϊσμανίαση

ΠΙΘΑΝΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Στον άνθρωπο συναντούμε τρεις μορφές της νόσου, τη δερματική, τη βλεννογονοδερματική και τη σπλαχνική.

- **Δερματική μορφή**

Τα συμπτώματα της δερματικής λεϊσμανίασης μπορεί να εμφανιστούν σε 15 μέρες έως και 2 μήνες μετά τη μόλυνση. Οι βλάβες μπορούν να είναι μία ή περισσότερες, επώδυνες ή ανώδυνες. Συνήθως πρόκειται για ερυθηματώδη κηλίδα ή οζίδιο που τυπικά σχηματίζει ένα ρηχό έλκος με υπερυψωμένο όχθο. Μπορεί να συνυπάρχει διόγκωση λεμφαδένων κοντά στις βλάβες (π.χ. κάτω από τη μασχάλη στην περίπτωση που οι βλάβες εντοπίζονται στο χέρι ή στο βραχίονα). Σε μερικά άτομα μπορεί να ακολουθήσει η εμφάνιση βλαβών στον βλεννογόνο.

- **Σπλαχνική μορφή**

Η σπλαχνική μορφή είναι παγκόσμια γνωστή ως «καλά-αζάρ» και αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή της νόσου. Προσβάλλει κυρίως παιδιά μικρής ηλικίας, ηλικιωμένα άτομα και ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Χαρακτηρίζεται από πυρετό, ανορεξία, απώλεια βάρους και διόγκωση του ήπατος και του σπλήνα (συνήθως ο σπλήνας είναι περισσότερο διογκωμένος

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 18: Η Νομοθεσία που καθορίζει τα μέτρα ελέγχου και καταπολέμησης της λεϊσμανίασης στα σκυλιά, η οποία εκδόθηκε από τον Υπουργό Γεωργίας (Υπουργικό Διάταγμα) με αφορμή τα αποτελέσματα της μελέτης.

Αριθμός 55

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΖΩΩΝ ΝΟΜΟΙ ΤΟΥ 2001 ΚΑΙ 2003

Διάταγμα δυνάμει του άρθρου 7(γ)

Ο Υπουργός Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος ενασκώντας τις εξουσίες που του παρέχει η παράγραφος (γ) του άρθρου 7 των περί της Υγείας των Ζώων Νόμων του 2001 και 2003, εκδίδει το ακόλουθο Διάταγμα. 109(I) του 2001 82(I) του 2003

1. Το παρόν Διάταγμα θα αναφέρεται ως το περί της Υγείας των Ζώων (Μέτρα για τον Έλεγχο και την Καταπολέμηση της Λεισμανίασης) Διάταγμα του 2007. Συνοπτικός τίτλος.

2.—(1) Στο παρόν Διάταγμα, εκτός αν από το κείμενο προκύπτει διαφορετική έννοια— Ερμηνεία.

«αντιπαρασιτικό σκεύασμα» σημαίνει εγκεκριμένο κτηνιατρικό προϊόν σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 10 του περί Κτηνιατρικών Φαρμακευτικών Προϊόντων (Έλεγχος Ποιότητας, Εγγραφής, Κυκλοφορίας, Παρασκευής, Χορήγησης και Χρήσης) Νόμου του 2006, που περιέχει ουσίες οι οποίες είναι ικανές να σκοτώνουν ή να απωθούν τους φλεβοτόμους (σκνίπες)· 10(I) του 2006

«απομόνωση» σημαίνει τον περιορισμό του ζώου σε κλουβί με δικτυωτό πλέγμα ικανό να παρεμποδίζει την είσοδο των φλεβοτόμων, από τη δύση έως την ανατολή του ηλίου·

«εργαστηριακή επιβεβαίωση» σημαίνει θετικά ορολογικό αποτέλεσμα ή/και απομόνωση του παρασίτου·

«ζώο» σημαίνει το σκύλο·

«ιδιοκτήτης ή κάτοχος» σημαίνει το φυσικό ή νομικό πρόσωπο το οποίο έχει στην κυριότητα του ζώα ή έχει αναλάβει τη συντήρηση τους, επ΄αμοιβή ή δωρεάν και περιλαμβάνει και το πρόσωπο το οποίο έχει στην κατοχή του ζώα για σκοπούς φύλαξης ή συντήρησής τους, επ΄αμοιβή ή δωρεάν·

«κτηνίατρος» σημαίνει οποιοδήποτε εγγεγραμμένο κτηνίατρο με βάση τις διατάξεις των περί Ασκήσεως της Κτηνιατρικής και της Εγγραφής Κτηνιάτρου Νόμων του 1990 έως 2004· 169(I) του 1990 10(I) του 1997 93(I) του 2000 176(I) του 2002 145(I) του 2003 233(I) του2004.

«λεισμανίαση» σημαίνει τη νόσο λεισμανίαση του σκύλου η οποία προκαλείται από παράσιτα του γένους λεισμάνια και μεταδίδεται με τσίμπημα των φλεβοτόμων·

«μολυσμένο με λεισμάνια ζώο» σημαίνει το ζώο το οποίο παρουσιάζει την κλινική μορφή της νόσου ταυτόχρονα με εργαστηριακή επιβεβαίωση ή χωρίς κλινική εικόνα αλλά με εργαστηριακή επιβεβαίωση·

«Νόμος» σημαίνει τους περί της Υγείας των Ζώων Νόμους του 2001 και 2003. 109(I) του 2001 82(I) του 2003

(2) Οποιοιδήποτε όροι δεν ορίζονται ειδικά στο παρόν Διάταγμα, έχουν την έννοια που αποδίδει σ΄αυτούς ο Νόμος.

3. Το παρόν Διάταγμα καθορίζει τα μέτρα ελέγχου και καταπολέμησης της νόσου λεισμανίασης στους σκύλους, με σκοπό την προστασία της υγείας των ζώων και της δημόσιας υγείας. Σκοπός.

Υποχρεωση γνωστοποιησης ενημερωσης

4 Οποιοσδηποτε κτηνιατρος διαπιστωσει η υποπτευθει την υπαρξη λεισμανιασης υποχρεουται—

(α) Να θεσει το ζωο υπο περιορισμο , και

(β) να ειδοποιησει παραυτα, χρησιμοποιωντας το γρηγοροτερο μεσο επικοινωνιας που εχει στη διαθεση του, το Διευθυντη η τον Επαρχιακο Κτηνιατρικο Λειτουργο της επαρχιας οτην οποια διαπιστωσε η υποπτευθηκε την εκδηλωση της πιο πανω νοσου

Μετρα σε περιπτωση διαπιστωσης προσβολης, απο τη λεισμανιαση

5 —(1) Απο τη στιγμη που θα επιβεβαιωθει με εργαστηριακη εξεταση η μολυνση σκυλου με λεισμανιαση, ο οποιοσδηποτε κτηνιατρος θα πρεπει να πραξει ενα απο τα πιο κατω

(α) Να θανατωσει το ζωο, με τη γραπτη συγκαταθεση του ιδιοκτητη, με μεθοδους ευθαναοιας, η

(β) να χορηγησει θεραπευτικη αγωγη, με ταυτοχρονη προστασια του ζωου απο τα δηγματα (τσιμπηματα) των φλεβοτομων

Μετρα σε περιπτωση απομονωσης και θεραπειας

6 —(1) Στην περιπτωση της χορηγιας θεραπευτικης αγωγης, οπως αναφερεται στο σημειο (β) της παραγραφου 5, ο ιδιοκτητης οφειλει υπο την επιβλεψη κτηνιατρου που υποδεικνυεται απο τον ιδιο στην Αρμοδια Αρχη, να εφαρμοσει τα ακολουθα μετρα

(α) Να θεσει το ζωο σε απομονωση και να μην πωλησει η μετακινησει απο τον τοπο διαμονης του σε αλλη περιοχη χωρις την γραπτη εγκριση του Διευθυντη

(β) Να χορηγησει στο ζωο εγκεκριμενο αντιπαρασιτικο σκευασμα για απωθηση η θανατωση των φλεβοτομων Τα αντιπαρασιτικα σκευασματα πρεπει να χρησιμοποιουνται συμφωνα με τις οδηγιες του κατασκευαστη και ο ιδιοκτητης πρεπει να ειναι σε θεση ανα πασα στιγμη να αποδεικνυει τουτο

(γ) Να χορηγησει καταλληλη φαρμακευτικη αγωγη η οποια θα γινεται υπο την αυστηρη επιβλεψη και ευθυνη του κτηνιατρου και με εγγραφη υποχρεωση του ιδιοκτητη για πιστη εκτελεση του θεραπευτικου πρωτοκολλου κατα τροπο που να αποκλειεται η μεταδοση της ασθενειας σε αλλα ζωα η και τον ανθρωπο

(2) Η θεραπεια που αναφερεται στην υποπαραγραφο (1) μπορει να διακοπει μονο στις περιπτωσεις που δυο διαδοχικες εξετασεις, με διαφορα 6 μηνων η μια απο την αλλη, με τη μεθοδο της αλυσιδωτης αντιδρασης πολυμεραση (PCR) απο δειγμα μυελου των οστων δωσουν αρνητικο αποτελεσμα Τα εξοδα της εξετασης επιβαρυνουν τον ιδιοκτητη

(3) Η Αρμοδια Αρχη δυναται, καθ οιονδηποτε χρονο κρινει αναγκαιο, να ελεγχει την εφαρμογη των μετρων περιορισμου και τη σωστη εφαρμογη του θεραπευτικου πρωτοκολλου Σε οποιανδηποτε περιπτωση μη τηρησης των πιο πανω μετρων τα μολυσμενα ζωα θα θανατωνονται

Νοειται οτι, ο ιδιοκτητης οφειλει, οποτε του ζητηθει, να παρεχει καθε διευκολυνση στους εξουσιοδοτημενους, με βαση το αρθρο 8 του Νομου, επισημους κτηνιατρους και κτηνιατρικους επιθεωρητες για την πραγματοποιηση των ελεγχων

ΦΩΤΗΣ ΦΩΤΙΟΥ,
Υπουργος Γεωργιας, Φυσικων Πορων και Περιβαλλοντος

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 19: Πόστερς σε επιστημονικά συνέδρια.

α) Η γεωγραφική διασπορά της *L. infantum* στην Κύπρο και η αντοχή της στα φάρμακα. 32ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα.

Η γεωγραφική διασπορά της *L.infantum* στην Κύπρο και η αντοχή της στα φάρμακα

Μ. Αντωνίου[1], Β. Χριστοδούλου[1], Ι. Μεσσαριτάκης[1], Α. Μαζέρης[2], Α. Τσάτσαρης[3], Π. Ηλιοπούλου[3], Ε. Κουταλά[1], Ε. Σβυρινάκη[1], Ι. Τσελέντης[1].

1. Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης - Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής.
2. Κτηνιατρικές Υπηρεσίες Κύπρου, Αθαλάσσα, Λευκωσία, Κύπρος
3. Τμήμα Τοπογραφίας, ΤΕΙ Αθήνας - Τομέας Γεωπληροφορίας & Αναπτυξιακών Έργων - Εργαστήριο Γεωπληροφορικής Ομάδα Έρευνας "Γεωγραφία & Ανάλυση του Χώρου"

Εικόνα 1: Αδέσποτο σκυλί μολυσμένο με το παράσιτο *Leishmania*. Σαν ξενιστές παρασιτάβει του παρασίτου, τα σκυλιά μπορούν να μεταδίδουν την νόσο ακόμα και όταν είναι ασυμπτωματικά.

Εικόνα 2: Η σκνίπα (*Phlebotomus* spp), διαβιβαστής ξενιστής, μεγέθους 2-4mm σπαρμαζί σίμα στα πιν μολυσμένο σκύλο και μεταδίδει την νόσο.

Εικόνα 3: Σπλαχνική Λεϊσμανίαση (Kala Azar) σε παιδί. Συμπτώματα όπως η σπληνομεγαλία και η ηπατομεγαλία είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου.

Εικόνα 4: Αναζωπύρωση δερματικής Λεϊσμανίασης σε άτομο το οποίο μολύνθηκε αρχικά πριν 60 χρόνια (σε ηλικία 4 ετών).

Εικόνα 5: Σπλαχνική Λεϊσμανίαση σκύλου σε προχωρημένο στάδιο. Η σπώλια τριχόμενης, τα έλκη και οι κηλίδες, καθώς και η τριφασής αδυναμία του ζώου είναι κάποια από τα συμπτώματα της νόσου στο σκυλί.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η μελέτη της γεωγραφικής διασποράς της αντοχής στελεχών της *Leishmania infantum*, που απομονώθηκαν από μολυσμένα σκυλιά, στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *L.infantum* προκαλεί Σπλαχνική και Δερματική Λεϊσμανίαση στον άνθρωπο στη Λεκάνη της Μεσογείου.

Επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι η αύξηση της συχνότητας κρουσμάτων λεϊσμανίασης στον άνθρωπο σχετίζεται με την αύξηση των κρουσμάτων στα σκυλιά. Η ελάττωση του πληθυσμού των σκυλιών στην Κύπρο από 46,000 σε 6,000 κατά την προσπάθεια ελέγχου της Εχινοκοκκίασης (1970-1975), είχε σαν αποτέλεσμα την σχεδόν εξαφάνιση της νόσου.

Η Κύπρος κατέστη μια λανθάνουσα εστία της λεϊσμανίασης η οποία τώρα φαίνεται να επανενεργοποιείται λόγω της ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού των σκυλιών. Τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των σκυλιών υπολογίζεται στις 100,000 και αυτός των μολυσμένων με λεϊσμανίαση μέχρι 26.2% σε ορισμένες περιοχές[1], γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο μετάδοσης της νόσου και στον άνθρωπο.

Η *Leishmania* διαθέτει το γονίδιο mdr, υπεύθυνο για την πολλαπλή αντοχή του παρασίτου στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα. Το γονίδιο αυτό ευθύνεται για την ενεργοποίηση μιας αντλίας (της γλυκοπρωτεΐνης Pgp170) η οποία αδειάζει το σώμα του παρασίτου από χημικές ουσίες-φάρμακα και έτσι αποφεύγεται η καταστροφή του. Η χρωστική Rhodamine-123 δε συσσωρεύεται μέσα σε κύτταρα τα οποία διαθέτουν το γονίδιο mdr, γιατί οι αντλίες Pgp170 αδειάζουν το σώμα του παρασίτου από χημικές ουσίες-φάρμακα. Ο ρυθμός εκροής της χρωστικής (και του φαρμάκου), καθορίζει την αντοχή του στελέχους στα φάρμακα και εξαρτάται από τον αριθμό των αντλιών που διαθέτει το κάθε στέλεχος. Η διασπορά ανθεκτικών στελεχών του παρασίτου σε μια περιοχή είναι μια σημαντική πληροφορία για το γιατρό γιατί είναι ο παράγοντας που καθορίζει την θεραπευτική αγωγή που πρέπει να ακολουθηθεί ώστε να αποφευχθεί η αναζωπύρωση της νόσου στον άνθρωπο και στο σκύλο.

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΗΣ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣ ΣΤΑ ΣΚΥΛΙΑ

Εικόνα 6: Γεωγραφική κατανομή της Leishmania στα σκυλιά των επαρχιών της Κύπρου. Στον χάρτη είναι καταγραμμένα τα στελέχη ανάλογα με την περιοχή που απομονώθηκαν και κατάλληλα σημασμένα ανάλογα με τον ρυθμό εκροής της Rhodamine-123.

Εικόνα 8: Απεικόνιση του ρυθμού εκροής της Rhodamine-123 από 30 λεπτά της 2 πρώτες ώρες της κυτταρομέτρησης. Όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός εκροής, τόσο πιο ανθεκτικό υποδηλώνεται το στέλεχος.

Εικόνα 7: Εκροή Rhodamine-123 στο ανθεκτικό στο αντιλεϊσμανιακό φάρμακο στέλεχος *L.infantum*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πραγματοποιήθηκε επιδημιολογική μελέτη σε σκυλιά από 30 αντιπροσωπευτικές περιοχές της ελεύθερης Κύπρου σε τυχαία επιλεγμένα ζώα. Κάθε δείγμα συνοδευόταν από ερωτηματολόγιο, που περιελάμβανε επιδημιολογικά και κλινικά στοιχεία, χρήσιμα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τα δείγματα ελέγχθηκαν με τις ορολογικές δοκιμές της ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), του Εμμεσου Αντισωματοσφαιρισμού (IFA) και της Ηλεκτροσυναίρεσης (ES). Επίσης με τη μοριακή τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και με καλλιέργειες για την απομόνωση του παρασίτου.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν τυποποιήθηκαν βάση του ενζυμικού τους προφίλ[2].

Με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής μελετήθηκε η αντοχή των προμαστιγωτών, εξωκυττάριων μορφών, του κάθε στελέχους του παρασίτου στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα. Μελετήθηκε ο ρυθμός εκροής (efflux) της Rhodamine-123 από το παράσιτο σε χρόνο 0-120 λεπτά για να εκτιμηθεί η αντοχή του κάθε στελέχους στα φάρμακα[3].

Με τη χρήση εξειδικευμένου λογισμικού GIS (Geographic Information System - Γεωγραφικό Σύστημα Πληροφοριών) έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων και χαρτογράφηση των στελεχών του παρασίτου βάση της αντοχής τους στα φάρμακα καθώς και χαρακτηρισμός των περιοχών ανάλογα με τον κίνδυνο μόλυνσης και πιθανής αναζωπύρωσης της νόσου μετά από απλή φαρμακευτική αντιμετώπιση. Η χαρτογράφηση έγινε σε περιβάλλον GIS, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα συσχέτισης χαρακτηριστικών των κρουσμάτων με τα χαρακτηριστικά του χώρου.

Εικόνα 9: Αδυναμία εκροής Rhodamine-123 από ευαίσθητο σε αντιλεϊσμανιακά φάρμακα στέλεχος *L.infantum*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εξετάστηκαν 808 σκυλιά από 75 χωριά και πόλεις από 30 τυχαία επιλεγμένες περιοχές και από τις 5 επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου. Απομονώθηκαν και τυποποιήθηκαν 31 στελέχη *L.infantum*. Και τα 31 στελέχη είχαν το ισοενζυμικό προφίλ MON-1. Με βάση το ρυθμό εκροής (efflux) της Rhodamine-123 και της αρχικής συγκέντρωσης της χρωστικής στο σώμα του παρασίτου, το κάθε στέλεχος *L.infantum* χαρακτηρίστηκε για την αντοχή του στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα. Η αντοχή των διαφόρων στελεχών κυμαινόταν από 2.45 μέχρι 34.27, με 9 ανθεκτικά και 22 ευαίσθητα στέλεχη στα φάρμακα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Και τα 31 στελέχη που απομονώθηκαν είχαν το ισοενζυμικό προφίλ MON-1, το πιο κοινό στην περιοχή της Μεσογείου. Παρόλο που όλα τα στελέχη διαθέτουν το ίδιο ισοενζυμικό προφίλ παρουσιάζαν διαφορετική αντοχή στα φάρμακα. Βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση της αρχικής συγκέντρωσης της Rhodamine-123 με το ρυθμό εκροής της από το σώμα του παράσιτου. Όσο αυξάνεται η απώλεια φθορισμού κατά την εκροή της χρωστικής, τόσο πιο ανθεκτικό είναι το στέλεχος στα αντιλεϊσμανιακά φάρμακα.

Η λεϊσμανίαση είναι ένα αναδυόμενο πρόβλημα στο νησί και υπάρχει ορατός κίνδυνος να καταστεί ενδημική.

Στις επαρχίες Πάφου και Λεμεσού παρατηρήθηκε συσσώρευση ανθεκτικών στελεχών L.infantum. Στις περιοχές της Λευκωσίας και της Αμμοχώστου (μη ενδημικές περιοχές) εντοπίστηκαν σκυλιά με υψηλό βαθμό αντοχής τα οποία όμως είχαν μεταφερθεί από την επαρχία της Πάφου (ενδημική περιοχή).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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. 15;71(2):169-78.
2. Eresh., 1990. Field studies in North Cyprus and subsequent analysis of human biopsy; blood samples from humans and dogs; and sandfly samples: final report of a project supported by the socio-economic research committee; TDR in 1967-1968 (SERC Training Grant No. 8700335; TDR-Project No. 880163). WHO, Geneva.
3. Rioux, J.A., 1990. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, 1990; 65:111-25.
4. Gueiros-Filho F.J, Viola JP, Gomes FC, Farina M, Lins U, Berthe AL, Wirth DF, Lopes UG. Leishmania amazonensis: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a Leishmania mdr1 gene. Exp Parasitol. 1995 Dec;81(4):480-90.

β) Evaluation of drug resistance of *Leishmania infantum* isolates from Cyprus, 2006. 3rd COST B22 Annual Congress on "Drug Discovery and Development for Parasitic Diseases", Αθήνα.

Evaluation of drug resistance of *Leishmania infantum isolates from Cyprus*

Maria Antoniou[1*], Apostolos Mazeris[3], Vasiliki Christodoulou[1], Ippokratis Messaritakis[1], Andreas Tsatsaris[4], Eleni Koutala[1], Eleni Svirinaki[1], Joanna Moschandreas[2], Avramaki Chrysoula[1], Yannis Tselentis[1]

1. Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete, P.O. Box 2208, 71003 Heraklion, Crete, Greece.
2.Dept of Social Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete, P.O. Box 2208, 71003 Heraklion, Crete, Greece.
3. The Veterinary Services of Cyprus, Nicosia, Cyprus
4. GeoInformatics Laboratory, Technological Educational Institution of Athens

Aims

To isolate the *Leishmania* parasite from dogs and humans in order to calculate the drug resistance of each isolate; to map the isolates according to their drug resistance characteristics so as to relate the geographical distribution of drug resistance to epidemiological factors.

Introduction

Leishmania infantum causes human and canine visceral leishmaniasis in the Mediterranean basin. Epidemiological studies have shown that the number of infected dogs in an area is related to the number of human cases. During the last 20 years, this parasite is spreading, in the dog population of the island of Cyprus, with alarming speed rendering areas endemic[1]. In the last two years, human cases of visceral and cutaneous leishmaniasis are reported from such areas. Resistance of *Leishmania* to antileishmanial drugs is associated with a multidrug-resistance (MDR) phenotype, characterised by the over expression of a P-glycoprotein (PGP)[2]. The PGP, a transmembrane efflux pump for a diverse group of lipophilic compounds including many chemically dissimilar drugs and fluorescent dyes[3], is a member of the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters. The result of this pleiotropic effect, is a reduced drug accumulation inside the cell, and so the survival of the parasite[3]. The aim of the project was to study the geographical distribution of the MDR phenotype in dogs and humans and to observe its spread in space and time.

Materials and Methods

Nine hundred dogs, randomly selected from 30 different areas covering the Government controlled part of Cyprus, were examined serologically (ELISA, IFA, ES), by PCR and culture. A questionnaire completed for each animal provided epidemiological and clinical information on each animal and the exact coordinates of the place the animal lives, using a GPS. Samples from patients with suspected leishmaniasis were also tested and all clinical and epidemiological information gathered. The resistance to drugs of 49 *Leishmania* isolates was studied by flow cytometry. The fluorescent probe Rhodamine 123 (RH 123) was used to measure the rates of Rh123 influx and efflux in the promastigotes[4], with and without the effect of the PGP reversal agent verapamil, every 30 minutes for 2 hours. Each isolate's performance during the Rh123 test was evaluated by considering the influx value (mean of fluorescence at time zero), the rate of efflux with and without verapamil (b and a respectively). Correlations between influx and rate of efflux (with and without verapamil) were assessed using the non-parametric Spearman rank correlation method. The Wilcoxon signed rank test was used to examine possible differences in the average rate of efflux, according to the presence or absence of verapamil. Non-parametric techniques were applied because the differences in rate of efflux did not appear to be normally distributed. The isolates were placed on the map of Cyprus using the Geographic Information System software in relation to their "a" value and "a" was related to epidemiological data.

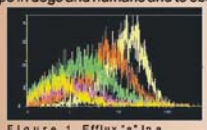


Figure 1. Efflux "a" in a resistant isolate.

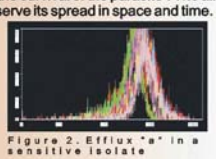


Figure 2. Efflux "a" in a sensitive isolate

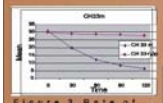


Figure 3. Rate of efflux "a" and "b" in a resistant isolate

Group	ΔG	Number of isolates
1	-6.00 - -4.51	17
2	-4.52 - -1.85	17
3	-1.84 - -0.34	11
4	>-0.33	4

Table 1. Rate of efflux values for the 49 isolates studied.

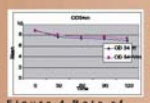


Figure 4. Rate of efflux "a" and "b" in a sensitive

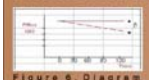


Figure 6. Diagram to show "b"

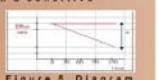


Figure 5. Diagram to show "a"

Results

Nine hundred randomly selected dogs from 75 towns and villages from 30 different areas of the Government controlled part of the island of Cyprus were examined. These areas covered all 5 provinces. Seropositivity in dogs ranged from 0 to 33% (Maps 1&2). Forty nine isolates of *Leishmania* from patients (2 with visceral and 2 with cutaneous leishmaniasis) and dogs (45) were isolated and typed. All were *L. infantum* and presented the MON-1 enzymatic profile[5].

The Rh 123 rate of efflux "a" of the different isolates varied from -6 to 0.0, the higher the rate of efflux the higher the resistance of the isolate to drugs (Table 1). The geographical distribution of "a" is shown on Map 2, in connection with dog seropositivity in the area the dogs live. Influx was found to be highly positively correlated to the rate of efflux of Rh-123, both in the absence and presence of verapamil, r=0,82 ($p<0.0001$) and 0.65 ($p<0.001$) respectively (n=42). Also, there was strong evidence that efflux rate differed according to the presence or absence of verapamil (Z=-3.73, p=0.0002), with median efflux rates 0.71 (min 0.03, max 4.3) and 0.42 (min 0.10, max 2.5) [units/30min] respectively.

Two human isolates were found in the 2nd group, with low efflux rate and were isolated from the cutaneous leishmaniasis cases; one in the 3rd and 1 in the 4th. The human isolate presented the highest Rh 123 efflux rate (-6) (Map 2).

Map 1. Seropositivity in dogs in the 5 perfectures

Map 2. Geographical distribution of drug resistance of *L.infantum* and seropositivity in dogs

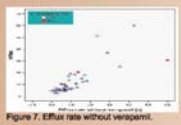


Figure 7. Efflux rate without verapamil

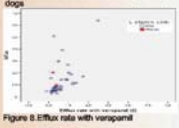


Figure 8.Efflux rate with verapamil

Conclusions

Despite the fact that all isolates were *L. infantum* MON-1, the rate of influx and efflux of the promastigotes of each isolate were different. In a first glance, this rate does not appear to be related to the dog seropositivity in the area the animal came from. However, from the epidemiological data we suspect that this may not be the case. The two dogs in the Nicosia area, for example which has a low seropositivity, presented a high efflux rate. Both these dogs were introduced to Nicosia recently from the Paphos area which has a very high seropositivity (33%). Mapping the "a" value after a number of years will provide a valuable comparison with today's results. From map 2 it is clear that drug resistance (measured as high rate of Rh 123 efflux) is scattered in nearly all areas of the island. In all isolates verapamil blocked a percentage of the Rh 123 efflux. In some the blockage was higher than in others (Figs 1 & 2). The difference between "a" and "b", a-b would represent the rate of PGP replacement by the parasite, as a reaction to verapamil blockage of the functioning pumps. This is the first presentation of the results of drug resistance in the promastigotes. The analysis of more isolates is under investigation and parallel to this work, the analysis of drug resistance of the amastigotes in situ is carried out.

References

1. 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. 15;71(2):169-78.
2. Chiquero MJ, Perez-Victoria JM, O'Valle F, Gonzalez-Roe JM, del Moral RG, Ferragut JA, Castanys S, Gamarro F. 1998. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant Leishmania tropica line. Biochem Pharmacol. 1998 Jan 15;55(2):131-9
3. Cornwell MM, Tsuruo T, Gottesman MM, Pastan I. 1987. ATP-binding properties of P glycoprotein from multidrug-resistant KB cells. FASEB J. 1987 Jul;1(1):51-4.
4. Gocires-Filho FJ, Viola JP, Gomes FC, Farina M, Lins U, Bertho AL, Wirth DF, Lopes UG. Leishmania amazonensis: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a Leishmania mdr1 gene. Exp Parasitol. 1995 Dec;81(4):480-90.
5. Pratlong F., Dereure J., Ravel C., Dedet JP. Enzymatic polymorphism during *Leishmania*/HIV co-infection : a study of 381 strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. Ann Trop Med Parasitol, 2003, 97, suppl 1, S47-S56.

γ) *LEISHMANIA DONOVANI* MON-37: ΕΝΑ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ. 35ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα.

LEISHMANIA DONOVANI MON-37: ΕΝΑ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ

Μαζέρης Α.[1], Σωτηριάδου Κ.[2], Τσάτσαρης Α.[3], Dedet Jean Pierre[4], Μεσσαριτάκης Ι.[5], Χριστοδούλου Β.[5], Λουκαΐδης Φ.[1], Αντωνίου Μ.[5]

1. Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, Λευκωσία, Κύπρος
2. Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα
3. Τμήμα Τοπογραφίας, ΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα
4. Πανεπιστήμιο Montpellier, Montpellier, Γαλλία
5. Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης/ Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, Ηράκλειο

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η διερεύνηση της λεϊσμανίασης στην Κύπρο και ο καθορισμός του βαθμού κινδύνου για τη Δημόσια Υγεία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *L. donovani* MON-37 προκαλεί την σοβαρότερη μορφή λεϊσμανίασης με σοβαρές επιπτώσεις για τη Δημόσια Υγεία και θεωρείται ανθρωπονόσος, δηλαδή ο άνθρωπος είναι η μόνη γνωστή αποθήκη/δεξαμενή του παρασίτου και η σκνίπα μολύνεται από μολυσμένους ανθρώπους για να μολύνει εν συνεχεία άλλους ανθρώπους. Η λεϊσμανίαση από *L. donovani* MON-37 αναπτύσσεται σε ενήλικες και παιδιά και είναι υπεύθυνη για την Post-kala-azar δερματική λεϊσμανίαση, μια άσχημη μορφή δερματικής λεϊσμανίασης η οποία εμφανίζεται στο 15-25% των ασθενών μερικά χρόνια μετά από επιτυχή θεραπεία σπλαχνικής λεϊσμανίασης. Το είδος αυτό της Λεϊσμάνια είναι γνωστό ότι προκαλεί ευρείες επιδημίες στις περιοχές όπου ενδημεί (Ινδία και τη Δυτική Αφρική). Αντίθετα, το είδος που απαντάται στην Ευρώπη, το *L. infantum* MON-1, προκαλεί σποραδικά κρούσματα στον άνθρωπο ακόμα και σε περιοχές όπου υπάρχει υψηλό ποσοστό μολυσμένων σκύλων.

Στην Κύπρο η λεϊσμανίαση θεωρείτο μέχρι πρότινος σαν πρόβλημα του σκύλου, αφού δεν είχε καταγραφεί επίσημα κανένα ανθρώπινο κρούσμα, παρά το γεγονός ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο της μη δήλωσης περιστατικών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Περιοχή μελέτης

Οι ελεύθερες περιοχές της Κύπρου που αποτελούν το νότιο τμήμα του νησιού και καλύπτουν έκταση 5,896 τετρ. χλμ, χωρίστηκαν σε χάρτη σε 82 ίσα τετράγωνα. Από αυτά επιλέχθηκαν τυχαία με κλήρωση τα 30. Μια περιοχή-τετράγωνο μπορούσε να περιλαμβάνει 1,2,3 ή και περισσότερα χωριά ή πόλεις. Από αυτά επιλέχθηκαν με κλήρωση τα χωριά στα οποία πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από σκύλους.

Δείγματα από σκύλους

Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από 900 τυχαία επιλεγμένους σκύλους από τα 30 τετράγωνα (30 σκύλοι ανά τετράγωνο) κατά τα έτη 2005 και 2006. Οι σκύλοι εξετάστηκαν κλινικά και λήφθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος (900 δείγματα) και πολφός λεμφογαγγλίων από ζώα με ύποπτα κλινικά συμπτώματα. Για όλα τα ζώα συμπληρώθηκαν ερωτηματολόγια με λεπτομερή ατομικά, επιδημιολογικά και κλινικά στοιχεία. Επιπλέον αριθμός ορών αίματος (2056) που λήφθηκε από ιδιώτες κτηνίατρους για σκοπούς εξετάσεων ρουτίνας, εξετάστηκε με ορολογικές μεθόδους για παρουσία αντισωμάτων εναντίον της *Leishmania*.

Δείγματα από ανθρώπους

Με βάση τα αποτελέσματα του οροεπιδημιολογικού ελέγχου στους σκύλου επιλέγηκαν δύο τετράγωνα με το ψηλότερο ποσοστό οροθετικότητας (μεγαλύτερος κίνδυνος μόλυνσης του ανθρώπου) και ένα με το χαμηλότερο ποσοστό (μικρός κίνδυνος). Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία περιφερικού αίματος από 200 κατοίκους από κάθε ένα τετράγωνο (ηλικίας από 10- 88 χρονών) και συμπληρώθηκαν ερωτηματολόγια με λεπτομερή ατομικά, επιδημιολογικά και κλινικά στοιχεία για κάθε άτομο. Επιπρόσθετα εξετάστηκαν 35 δείγματα αίματος, 4 δείγματα δέρματος και 4 δείγματα μυελού των οστών που λήφθηκαν στα Νοσοκομεία της χώρας, από 35 ασθενείς με ύποπτα κλινικά συμπτώματα.

Φλεβοτόμοι

Πραγματοποιήθηκε σύλληψη και ταυτοποίηση του είδους των Φλεβοτόμων στις τρεις περιοχές (δύο περιοχές υψηλού και μιας χαμηλού κινδύνου). Παγιδεύτηκαν ζωντανοί φλεβοτόμοι από 20 χωριά με/ή χωρίς ανθρώπινα κρούσματα και/ ή κρούσματα στους σκύλους, με την χρήση φωτεινών παγίδων CDC. Οι παγίδες τοποθετήθηκαν για μία ή περισσότερες νύχτες κοντά σε σπίτια με ανθρώπινα περιστατικά και/ ή περιστατικά σε σκύλους (αν υπήρχαν στην περιοχή), συνήθως κοντά στις εγκαταστάσεις των ζώων.

Ορολογικές εξετάσεις

Τα 900 δείγματα ορών αίματος από τους σκύλους και τα 635 δείγματα ορών αίματος από τους ανθρώπους εξετάστηκαν με την τεχνική της ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG εναντίον της *Leishmania*. Όσα δείγματα αντέδρασαν θετικά εξετάστηκαν επιπλέον με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFAT).

Εικ.2: Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Εικ.3 ELISA

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Τα 900 δείγματα (αίμα, λεμφαδένας, σπλήνα) από τους σκύλους και τα 35 δείγματα (αίμα, δέρμα, μυελός οστών) από τους ανθρώπους εξετάστηκαν με την τεχνική της PCR. Για εξαγωγή DNA από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το DNA Blood Mini kit (QIAGEN) και για τον πολλαπλασιασμό του DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές T2 και B4.

Εικ.4 PCR

Απομόνωση του παράσιτου

Έγινε προσπάθεια για απομόνωση του παρασίτου από τους 35 ασθενείς και τους 900 σκύλους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα καλλιεργητικά υλικά NNN και RPMI 1640.

Φλεβοτόμοι

Συνολικά παγιδεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν 1716 φλεβοτόμοι (649 αρσενικοί, 1067 θηλυκοί).

Επαρχία	Υψόμετρο	Αρ. τετραγώνου	P. papatasi	P. tobbi	P. galilaeus	P. sergenti	P. alexandri	P. mascittii	P. economidesi	S. minuta	S. azizi	S. fallax
Πάφος	75	10	[illegible]	345	220	[illegible]	0	0	0	39	18	3
Λευκωσία	[illegible]	20	453	6	3	0	0	[illegible]	0	27	31	7
Λεμεσός	[illegible]	14	118	[illegible]	0	1	2	0	[illegible]	74	0	1
Αμμόχωστος	[illegible]	[illegible]	133	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Σύνολο			910	363	223	[illegible]	2	[illegible]	[illegible]	144	49	[illegible]

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα στους σκύλους

Από τις δοκιμασίες της ELISA, του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της PCR προέκυψαν 134 (14,9%), 106 (11,8%) και 229 (25%) θετικοί σκύλοι αντίστοιχα, από τους 900 που εξετάστηκαν, ενώ το παράσιτο απομονώθηκε σε 62 διαφορετικές περιπτώσεις. Τα στελέχη που απομονώθηκαν τυποποιήθηκαν σαν *L. infantum* MON-1 (61/62), *L. infantum* MON-98 (1/62), ενώ σε ένα σκύλο τυποποιήθηκαν ταυτόχρονα *L. infantum* MON-1 και *L. donovani* MON- 37.

Τεχνικές	ELISA	IFAT	PCR	Απομόνωση παράσιτου
Αριθμός θετικών σκύλων	134 14.9%	106 11.8%	229 25%	62 6,9%

Αποτελέσματα στους ανθρώπους

Από τις δοκιμασίες της ELISA στα 600 ανθρώπινα δείγματα δεν υπήρξε καμιά θετική αντίδραση. Από τους 35 ασθενείς των νοσοκομείων, με κλινικά συμπτώματα (ψηλός πυρετός ή δερματικές αλλοιώσεις) δύο ασθενείς εκδήλωσαν ΣΛ και τέσσερεις ΔΛ. Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους ασθενείς τυποποιήθηκαν σαν *L. donovani* MON- 37.

Τεχνικές	ELISA	IFAT	PCR	Απομόνωση παράσιτου
Αριθμός θετικών ανθρώπων	3/6 (50%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	5/6 (83,3%)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής είναι πολύ ανησυχητικά γιατί δείχνουν ότι: 1) υπάρχει επιδημία (outbreak) λεϊσμανίασης από *L. donovani* MON-37 στην Κύπρο, 2) στελέχη που έχουν απομονωθεί από ασθενείς παρουσιάζουν αντοχή στα φάρμακα in vitro, 3) είναι γεγονός ότι το είδος αυτό του παράσιτου, το πιο επικίνδυνο είδος Λεϊσμάνιας που είναι γνωστό, έχει σπάσει το γεωγραφικό φραγμό που το απομόνωνε, από τα παλιά χρόνια, στην Ινδία, Σρι Λάνκα, Κένυα και Αιθιοπία, όπου δημιουργεί επιδημίες, και έφτασε στην Ευρώπη.

Η κατάσταση που αφορά στη λεϊσμανίαση στην Κύπρο παρουσιάζει δυο σημαντικά σημεία επιστημονικής αβεβαιότητας αφού δεν είναι γνωστή: 1) η επιδημιολογική συμπεριφορά της *L. donovani MON-37* σε ένα νέο τόπο εγκατάστασης όπου ο πληθυσμός δεν έχει ανοσιακή κάλυψη, και 2) η επιδημιολογική συμπεριφορά των υβριδίων, εάν δημιουργηθούν με την σύμπραξη της *L. infantum* MON-1 και της *L. donovani* MON-37.

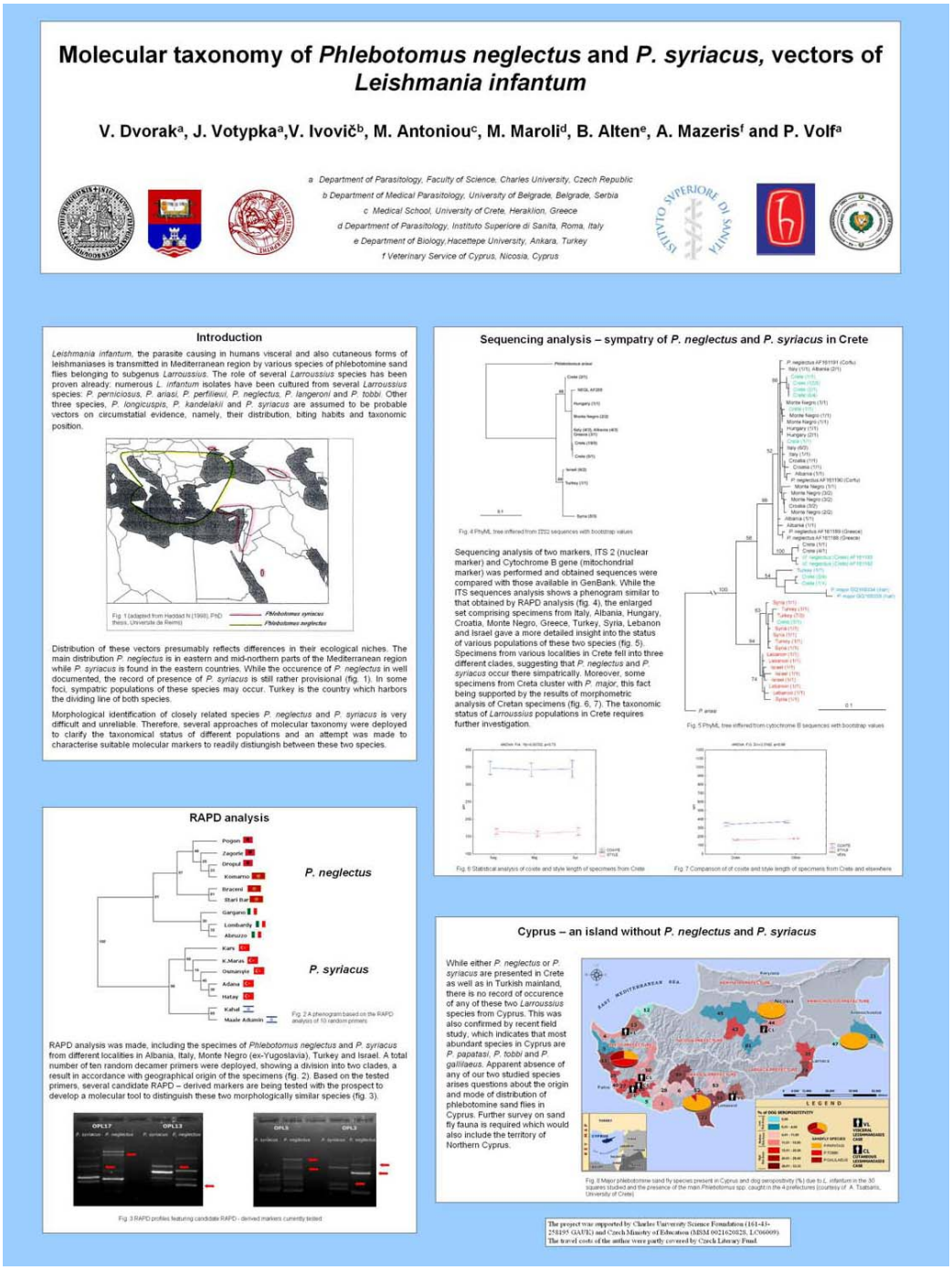
Η Κύπρος αποτελεί μοναδικό παράδειγμα ταυτόχρονης παρουσίας δύο διαφορετικών κύκλων μετάδοσης της λεϊσμανίασης: στους σκύλους λόγω της *L. infantum* MON-1 και στους ανθρώπους λόγω της *L. donovani* MON-37 με το P. tobbi να αποτελεί τον πιο πιθανό μεταδότη και για τα δύο είδη. Η χαρτογράφηση της οροθετικότητας στους σκύλους και της διασποράς των ανθρώπινων κρουσμάτων δείχνει ότι η *L. donovani* βρίσκεται στις περιοχές όπου το ποσοστό των οροθετικών σκύλων (στην *L. infantum*) είναι υψηλό. **Τα αποτελέσματα τεκμηριώνουν ότι η είσοδος, η εγκατάσταση και η εξάπλωση «εξωτικών ειδών» του παράσιτου Λεϊσμάνια στην Κύπρο και άρα και στην Ευρώπη είναι πραγματικότητα.**

Πιθανοί κύκλοι μετάδοσης της λεϊσμανίασης στην Κύπρο

Βιβλιογραφία

1. Minter D.M., Eitrem U.R., in: D.T. Hart (Ed.) Leishmaniasis: The current status and new strategies for control, NATO ASI series: Series A: Life sciences, Plenum Press, New York, 1989, pp. 207-216.
2. Adler S., The sandflies of Cyprus (Diptera), Bull. Entomol. Res. 36 (1945) 497-511.
3. Deplazes P., Grimm F., Papaprodromou M., Cavaliero T., Gramiccia M., Christofi G., Christofi N., Economides P., Eckert J., Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1, Acta Trop. 71 (1998) 169-178.
4. World Health Organization, Basic laboratory methods in medical Parasitology, WHO, Geneva, (1991).
5. Haralambous C., Antoniou M., Pratlong F., Dedet J.P., Soteriadou K., 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 (2008) 33-42.
6. Antoniou M., Haralambous C., Mazeris A., Pratlong F., Dedet J.P., Soteriadou K., *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. Lancet Infect. Dis. 8 (2008) 6-7.
7. Antoniou M., Haralambous C., Mazeris A., Pratlong F., Dedet J.P., Soteriadou K., *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus, Lancet Infect. Dis. 9 (2009) 76-77.
8. Minodier P., Piarroux R., Gambarelli F., Joblet C., Dumon H., Rapid identification of causative species in patients with Old World Leishmaniasis, J. Clin. Microbiol. 35 (1997) 2551-2555.

δ) Molecular taxonomy of *Phlebotomus neglectus* and *P. syriacus*, vectors of *Leishmania infantum,* 2009. 5th International Congress of Vector Ecology, SOVE meeting, Belek, Turkey



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 20: Επιστολή που στάλθηκε στους κυβερνητικούς ιατρούς, υπεύθυνους για την έκδοση Πιστοποιητικών Υγείας σε μετανάστες από ενδημικές για λεϊσμανίαση χώρες, με την οποία γίνεται ευαισθητοποίηση και τονίζεται η ανάγκη για προσεκτική εξέταση τους, για τυχόν δερματικές αλλοιώσεις λόγω λεϊσμανίασης.

ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Αρ. Φακ.:21.11.029
Τηλ.: 22400146
Φαξ:22400223

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΥΠΗΡΕΣΙΕΣ ΚΑΙ
ΥΠΗΡΕΣΙΕΣ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΛΕΥΚΩΣΙΑ 1449

16 Αυγούστου 2007

Δρ. Χαραλάμπο Κακογιάννη
Αν. Διευθυντή Κτηνιατρικών Υπηρεσιών

Μέσω Γενικού Διευθυντή
Υπουργείου Υγείας

Θέμα: Πρόγραμμα ΥΓΕΙΑ 0104/09 «Έλεγχος και Επιτήρηση της Λεϊσμανίασης στην Κύπρο»

Σε σχέση με την επιστολή σας με αριθμό φακέλου 18/93/8 και ημερομηνίας 14 Ιουνίου 2007 που αφορούσε το πιο πάνω θέμα καθώς και σε συνέχεια της συνάντησης της Διευθύντριας Ιατρικών Υπηρεσιών και Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας και Λειτουργών των Υπηρεσιών με τη Δρ. Αντωνίου, Επίκουρο Καθηγήτρια Παρασιτολογίας και το Διευθυντή Κτηνιατρικών Υπηρεσιών στις 17/5/2007, θα ήθελα να σας πληροφορήσω για τα μέτρα δημόσιας υγείας που έχουν λάβει οι Υπηρεσίες μας:

1. Έγινε υπενθύμιση και ευαισθητοποίηση των Παιδιάτρων, Παθολόγων, Δερματολόγων, Γενικών Ιατρών και Ιατρών για το γεγονός ότι υπάρχουν σποραδικά κρούσματα Λεϊσμανίασης στην Κύπρο και πρέπει να την λαμβάνουν υπόψη στη διαφορική διάγνωσή τους. Ταυτόχρονα τους απεστάλη ενημερωτικό έντυπο που έχει ετοιμασθεί σε συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες και αφορά τη Λεϊσμανίαση.
2. Κατόπιν συνάντησης με τις Υγειονομικές Υπηρεσίες στις 21/5/2007 αποφασίστηκε όπως παράλληλα με το πρόγραμμα καταπολέμησης των κουνουπιών εφαρμοστεί και πρόγραμμα καταπολέμησης των Φλεβοτόμων.
3. Απεστάλησαν ενημερωτικά έντυπα που αφορούν τη Λεϊσμανίαση και τους τρόπους πρόληψής της σε ταξιδιωτικά γραφεία με στόχο την ενημέρωση των Κυπρίων που ταξιδεύουν σε ενδημικές χώρες του εξωτερικού (Ασία Αφρική).

4. Έχει σταλεί επιστολή προς τους κυβερνητικούς ιατρούς, υπεύθυνους για την έκδοση Πιστοποιητικών Υγείας σε μετανάστες από ενδημικές για Λεϊσμανίαση χώρες, με την οποία γίνεται ευαισθητοποίηση και τονίζεται η ανάγκη για προσεκτική δερματολογική τους εξέταση, για τυχόν δερματικές αλλοιώσεις λόγω Λεϊσμανίασης.
5. Έγινε επιδημιολογική διερεύνηση των πέντε περιστατικών Λεϊσμανίασης που παρουσιάστηκαν το 2005-2006. Αυτή έχει πραγματοποιηθεί από τους θεράποντες κλινικούς ιατρούς των περιστατικών αυτών σε συνεργασία με τους Υγειονομικούς Επιθεωρητές των περιοχών που αυτοί κατοικούν. Από τα πέντε περιστατικά εντοπίστηκαν τα τέσσερα, αφού το πέμπτο αφορά αθίγγανο ο οποίος μετακινείται μεταξύ των ελεύθερων και των περιοχών που βρίσκονται κάτω από την τουρκική κατοχή. Η διερεύνηση έγινε με βάση τυποποιημένο ερωτηματολόγιο που έχει ετοιμασθεί από τη Μονάδα Επιδημιολογικής Επιτήρησης των Ιατρικών Υπηρεσιών και Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας σε συνεργασία μαζί σας. Από τη διερεύνηση προέκυψε ότι δύο από τα τέσσερα περιστατικά είχαν ιστορικό ταξιδιού σε περιοχή με πρόβλημα Λεϊσμανίασης. Στα άλλα δύο υπάρχει μόνο ιστορικό επαφής με σκύλο στη γειτονιά τους. Κανένα πρόβλημα δεν έχει παρουσιαστεί σε άτομα του άμεσου περιβάλλοντος ή της γειτονιάς τους και τα κρούσματα αυτά δεν συνδέονται μεταξύ τους.

Για το όλο θέμα οι Ιατρικές Υπηρεσίες και Υπηρεσίες Δημόσιας Υγείας θα ζητήσουν εξειδικευμένη εμπειρογνωμοσύνη μέσω του Ευρωπαϊκού Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης των Ασθενειών (ECDC) και/ ή της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας με στόχο την ακριβή αξιολόγηση του κινδύνου που υπάρχει για την ανθρώπινη δημόσια υγεία καθώς και της ανάγκης λήψης επιπλέον μέτρων.

Για Διευθύντρια Ιατρικών Υπηρεσιών
και Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας

ΟΠΚ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 21: Η πρόταση που κατατέθηκε στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες και στις Ιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου για την εγκατάσταση μιας ενεργής επιδημιολογικής επιτήρησης, η οποία θα βοηθήσει στην αντιμετώπιση αυτής της απειλής που έχει πολιτικο-οικονομικές και κοινωνικές προεκτάσεις.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ
ΖΩΝΟΣΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ

WHO Collaborating Center
for Research and Training in
Mediterranean Zoonoses
Διευθυντής Ι. Τσελέντης

**Εθνικό Κέντρο Αναφοράς
Παρασιτώσεων, Ζωονόσων
και Τροπικών Νόσων.**

5 Ιουνίου, 2007

Προς: Διευθυντή Κτηνιατρικών Υπηρεσιών Κύπρου

Θέμα: Αποτελέσματα προγράμματος Υγεία 0104/09 «Έλεγχος και Επιτήρηση της Λεϊσμανίασης στην Κύπρο» που αφορούν στον άνθρωπο.

Κύριε διευθυντά,
Όπως σας έχουμε ήδη ενημερώσει, προφορικά, τα στελέχη του παράσιτου Λεϊσμάνια που απομονώθηκαν από τους πέντε ασθενείς, με δερματική και σπλαχνική λεϊσμανίαση στην Κύπρο, τυποποιήθηκαν σαν *L. donovani* MON-37 σε αντίθεση με τα στελέχη από σκυλιά που ήταν *L. infantum* MON-1. Τα απομονωθέντα στελέχη εστάλησαν για περαιτέρω τυποποίηση, ως είθισθαι, σε 2 Εργαστήρια Αναφοράς και η τυποποίηση τους έγινε με 2 διαφορετικές τεχνικές (με μοριακή τεχνική με τη χρήση του marker K26-PCR από το Εργαστήριο Παρασιτολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Δρ. Καίτη Σωτηριάδου, και με την ισοενζυμική μέθοδο MLEE που πραγματοποιήθηκε από το Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier, Professeur Jean-Pierre Dedet,). Το είδος αυτό της Λεϊσμάνια απομονώνεται πρώτη φορά στην Ευρώπη και είναι γνωστό ότι προκαλεί ευρείες επιδημίες στις περιοχές όπου ενδημεί. Αντίθετα, το είδος που απαντάται στην Ευρώπη, το *L. infantum* MON-1, προκαλεί σποραδικά κρούσματα στον άνθρωπο ακόμα και σε περιοχές όπου υπάρχει υψηλό ποσοστό μολυσμένων σκυλιών.
Η τυποποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν από σκυλιά συνεχίζεται και τα αποτελέσματα θα ανακοινωθούν με τη λήξη του προγράμματος. Εν τούτοις, το τελευταίο μέχρι στιγμής αποτέλεσμα δείχνει ότι ένα στέλεχος, που απομονώθηκε από σκύλο ο οποίος ζούσε στην ίδια περιοχή με τρία ανθρώπινα περιστατικά δερματικής λεϊσμανίασης από *L. donovani* MON-37, έδωσε ένα ξεχωριστό προφίλ στο PCR. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το σκυλί είχε μολυνθεί και με τα δύο είδη παρασίτων (*L. infantum* MON-1 και *L. donovani* MON-37). Η ανάλυση με την τεχνική MLMT έδειξε την παρουσία πολλαπλών αλληλομόρφων, ένδειξη ότι το ένα από τα δύο στελέχη

ενδέχεται να είναι υβρίδιο. Η μελέτη του στελέχους αυτού συνεχίζεται. Εάν αποδειχθεί ότι πράγματι το στέλεχος αυτό είναι υβρίδιο λογχεύει ο κίνδυνος αυτό το «νέο» είδος να μολύνει τον άνθρωπο μέσω της σκνίπας. Τέλος, η *in vitro* μελέτη της «αντοχής», μέχρι στιγμής 2 εκ' των 5 στελεχών, έδειξε ότι το ένα στέλεχος που απομονώθηκε από ασθενή με σπλαχνική λεϊσμανίαση είναι ανθεκτικό τόσο στο SbV όσο και στο SbIII (η μεταβολικώς ενεργή μορφή του φαρμάκου Glucantime που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της λεϊσμανίασης).

Κλωνοποίηση των απομονωθέντων στελεχών και εφαρμογή και άλλων πολυμορφικών μικροδορυφορικών αλληλουχιών και της τεχνικής Multilocus Sequence Typing, MLST, αναμένονται να διαλευκάνουν εάν οι ενδείξεις που έχουμε, ότι πρόκειται για υβρίδιο, είναι πραγματικές. Πρέπει να σημειωθεί ότι τέτοια φαινόμενα παρατηρούνται σε περιοχές όπου ενδημούν περισσότερα του ενός είδη Λεϊσμάνια, και πρόσφατα ένα υβρίδιο *L. major/L. infantum* απομονώθηκε στην Πορτογαλία το οποίο μάλιστα παρουσιάζει αυξημένη μολυσματικότητα για τον άνθρωπο.

Το γεγονός ότι τα πέντε άτομα, τα οποία έχουν νοσήσει, είναι κάτοικοι της Κύπρου και ότι στο ιστορικό τους δεν αναφέρεται ταξίδι σε χώρες όπου ενδημεί η *L. donovani* MON-37, δείχνει ότι η μετάδοση της νόσου πραγματοποιήθηκε στην Κύπρο (αυτόχθονα κρούσματα).

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής είναι πολύ ανησυχητικά γιατί δείχνουν ότι: 1) υπάρχει επιδημία (outbreak) λεϊσμανίασης από *L. donovani* MON-37 στην Κύπρο, 2) στέλεχος που έχει απομονωθεί από ασθενή παρουσιάζει αντοχή στα φάρμακα *in vitro*, 3) είναι γεγονός ότι το είδος αυτό του παράσιτου, το πιο επικίνδυνο είδος Λεϊσμάνιας που είναι γνωστό, έχει σπάσει το γεωγραφικό φραγμό που το απομόνωνε, από τα παλιά χρόνια, στην Ινδία, Σρι Λάνκα, Κένυα και Αιθιοπία, όπου δημιουργεί επιδημίες, και έφτασε στην Ευρώπη.

Η *L. donovani* MON-37 προκαλεί την σοβαρότερη μορφή λεϊσμανίασης με σοβαρές επιπτώσεις για τη Δημόσια Υγεία και θεωρείται ανθρωπονόσος, δηλαδή ο άνθρωπος είναι η μόνη γνωστή αποθήκη/δεξαμενή του παρασίτου και η σκνίπα μολύνεται από μολυσμένους ανθρώπους για να μολύνει εν συνεχεία άλλους ανθρώπους, και από ότι φαίνεται στην Κύπρο και σκυλιά, γεγονός που δίνει την ευκαιρία στο παράσιτο να δημιουργεί υβρίδια. Η λεϊσμανίαση από *L. donovani* MON-37 είναι μια νόσος που αναπτύσσεται σε ενήλικες και παιδιά και είναι υπεύθυνη για την Post-kala-azar δερματική λεϊσμανίαση, μια άσκημη μορφή δερματικής λεϊσμανίασης η οποία εμφανίζεται στο 15-25% των ασθενών μερικά χρόνια μετά από επιτυχή θεραπεία σπλαχνικής λεϊσμανίασης.

Η κατάσταση που αφορά στη λεϊσμανίαση στην Κύπρο παρουσιάζει δυο σημαντικά σημεία επιστημονικής αβεβαιότητας: 1) δεν γνωρίζουμε ποια θα είναι η επιδημιολογική συμπεριφορά της *L. donovani* MON-37 σε ένα νέο τόπο εγκατάστασης όπου ο πληθυσμός δεν έχει ανοσιακή κάλυψη, και 2) ποια θα είναι η επιδημιολογική συμπεριφορά του υβριδίου, εάν η ύπαρξή του επιβεβαιωθεί. Πιστεύουμε ότι τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να γνωστοποιηθούν στον Υπουργό Υγείας, στους αρμόδιους Ιατρικούς φορείς της Κύπρου, στη Π.Ο.Υ. και όπου αλλού κρίνετε αναγκαίο για το συντονισμό μέτρων απαραίτητων για την αναχαίτιση αυτού του παράσιτου. Ο κίνδυνος το MON-37 να εξαπλωθεί στην Κύπρο και από εκεί στην Ευρώπη είναι υπαρκτός και η αντιμετώπισή του απαιτεί την οργάνωση ταχείας απαντητικής

ετοιμότητας προκειμένου να ελεγχθεί η έξαρση και να προληφθεί η εξάπλωσή του.

Για την αντιμετώπιση αυτής της ΑΠΕΙΛΗΣ, που έχει πολιτικο-οικονομικές και κοινωνικές προεκτάσεις, απαιτείται η εγκατάσταση μιας ενεργής επιδημιολογικής επιτήρησης για 1) να ανιχνευθούν όλα τα υπάρχοντα περιστατικά και να αξιολογηθεί η υπάρχουσα διασπορά της νόσου στο νησί, 2) να παρθούν ενέργειες (απομόνωση, τυποποίηση στελεχών με μοριακές τεχνικές και μελέτη της «αντοχής» των στελεχών στο SbV και/ή στην Αμφοτερισσίνη Β), 3) τον προσδιορισμό των πληθυσμών υψηλού κινδύνου και των περιοχών «hot spots». Τα παραπάνω θα συμβάλουν στην α) αποτίμηση της πραγματικής επιδημιολογικής εικόνας της νόσου και β) στην επιλογή και χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας και εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της όπως και γ) τον έλεγχο της εγκατάστασης και εξάπλωσης ειδών που ΑΠΕΙΛΟΥΝ τη Δημόσια Υγεία.

Ιωάννης Τσελέντης, Καθηγητής, Διευθυντής του WHO Collaborating Center,

Μαρία Αντωνίου, Επίκουρος Καθηγήτρια Παρασιτολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΕΡΓΑΣ. ΚΛΙΝ. ΒΑΚΤΗΡ. ΠΑΡΑΣ. ΖΩΩΝ & ΓΕΩΡΓ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ
WHO CC CRETE
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

71003 Ηράκλειο, Κρήτη. Τηλ. 2810 394746, 2810 394572, 2810 392600,
fax 2810 394740. e-mail: antoniou@med.uoc.gr

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L,Schnur LF, Jaffe CL, 1991a. An experimental mondel for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol 13:* 537--550.
2. Abranches P, Silva- Pereira MC, Conceicao- Silva FM, Santos- Gomes GM, Janz JG, 1991b. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing trasmission of infection. *J Parasitol 77:* 557--561.
3. Acedo Sanchez C, Martin Sanchez J, Vezel Bernal I, Sanchis Marin MC, Louassini M, Maldonado JA, Morillas MF, 1996. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int J Parasitol 26:* 303--310.
4. Adler S, 1945. The sand flies of Cyprus (Diptera). *Bull Entomol Res 36:* 497--511.
5. Alam MZ, Haralambous C, Kuhls K, Gouzelou E, Sgouras D, Soteriadou K, Schnur L, Pratlong F, Schönian G, 2009. The paraphyletic composition of *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing. *Microbes Infect 11:* 707--715.
6. Al-Jurayyan NAM, Al-Nasser MN, Al-Fawaz IM, Al Ayed IH, Herbish ASA, Al-Mazrou AM, Al Sohaibani MO, 1995. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. *Journal of Tropical Pediatrics 41 (3):* 143--148.
7. Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J, 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: The first 10 years. Clin Microb Rev 10: 298--319.
8. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet J-P, Gradoni L, Horst RT, Lopez-Velez R, Moreno J. 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews 21 (2):* 334--359.
9. Alvar J, Yactayo S, Bern C, 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology 22 (12):* 552—557.

10. Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachon I, Canavate C, Alvar J, 1995. Epidimiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Epidemiol 11:* 157--161.
11. Anderson DC, Buckner RG, Glenn BL, MacVean DW, 1980. Endemic canine leishmaniasis. *Vet Pathol 17: 94*--96.
12. Andrade HM, Toledo VPCP, Mayrink, Genaro O, 1999. Evaluation of the Immune Response and Production of Infection in Canine Visceral Leishmaniasis. *Rev Med Vet 150:* 809--814.
13. Antoniou M, Doulgerakis C, Pratlong F, Dedet JP, Tselentis Y, 2004. Short report: Treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite Leishmania infantum. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 71(1):71--72.
14. Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K, 2008. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis 8:* 6-7.
15. Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K, 2009. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis 9:* 76--77.
16. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Redd SG, Barral A, Teixeira R, Johnson JrWD, 1996. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases 154:* 1003--1011.
17. Baneth G, 2005. Leishmaniasis. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 3rd ed. GE Greece (eds), *Saunders company, Philadelphia,* pp. 685--695.
18. Berman JD, 1997. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic and Chemotherapeutic Developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases 24(4):* 684--703.
19. 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.
20. Bettini S and Gradoni L, 1986. Canine leishmaniasis in the Mediteranian area and its implications for human leishmaniasis. *Insect Sci Appl 7:* 241--245.

21. Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L, 1997a. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol 59:* 21--30.
22. Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol J P, Saint-André I, Chabanne L, 1997b. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol 56:* 345--351.
23. Bravo L, Frank LA, Brenneman KA, 1993. Canine Leishmaniasis in the United States. *Comp Cont Ed Pract Vet 15:* 69--71.
24. Bray RS and Alexander J, 1987. *Leishmania* and the magrophage. In: the Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol I Biology and Epidemiology, Peters W and Killick-Kendrick R (eds). Academic Press, London, pp. 211--233.
25. Bucheton B, Kheir MM, El-Safi SH, Hammad A, Mergani A, Mary C, Abel L, Dessein A, 2002. The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Microb Infect 4:* 1449--1457.
26. Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E, 1988. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. *J Small Anim Pract 38:* 29--30.
27. Cabral M, O´Grady J, Alexander J, 1992. Demostration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol 14:* 531--539.
28. Cabral M, O´Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J, 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asyptomatic dogs. *Vet Parasitol 76:* 173--180.
29. Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A, 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum. Vet Rec 141:* 539--543.
30. Constantinou K, 1998. Anopheles (malaria) eradication in Cyprus. *Parassitologia 40:* 131--135.

31. Cortese L, Oliva G, Ciaramella P, Persechino A, Restucci B, 1999. Primary hypothyroidism associated with leishmaniasis in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc 35:* 487--492.
32. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH, 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews 19 (1):* 111--126.
33. Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodriguez A, Alvar J, 2002. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *The Lancet 359(9312):* 1124-1125.
34. Daher EF, Evagelista LF, Silva Junior GB, Lima RSA, Aragao EB, Arruda GAJC, Galeano NMF, Mota RMS, Oliveira RA, Silva SL, 2008. Clinical presentation and renal evaluation of human visceral Leishmaniasis (Kala-azar): A retrospective study of 57 patients in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases 12 (4):* 329--332.
35. Day MJ, 2005. Interaction of the host immune system with arthropods and arthropod- borne infectious agents. In: Arthropod- borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. Shaw S and Day MJ (eds), Manson Publishing, London, UK, pp. 30--40.
36. Den Boer M, Davidson RN, 2006. Treatment options for visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther 4:* 187--197.
37. 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.
38. Dereure J, Pratlong F, Dedet JP. Geographical distribution and the identification of parasites cousing canine leishmaniasis in the Mediteranean Basin, 1999. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, pp. 18--25.
39. Desjeux P, 1991. Information on the epidemiology and control of the leishmanioses by country or territory. WHO/LEISH/91.30. WHO Geneva.
40. Desjeux P, 1992. Human leishmaniases: epidemiology and public health aspects. *World Health Statistics Quarterly 45:* 267--275.
41. Desjeux P, 1996. Leishmaniasis : Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology 14(5):* 417--423.

42. Desjeux P, Alvar J, 2003. Leishmania/HIV co-infections: Epidemiology in Europe. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 97(1): S3--S15.
43. Diaz-Espineira MM and Slappendel RJ, 1997. A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands. *Vet Q 19:* 69--71.
44. Dujardin JC, 2006. Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology 22(1):* 4--6.
45. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Y. Ozbel, M. Boelaert, 2008. Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis 14:* 1013--1018.
46. Duprey ZH, Steurer FJ, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM, 2006. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis 12:* 440--446.
47. Engwerda CR and Kaye PM, 2000. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today 21:* 73--77.
48. Eresh., 1990. Field studies in North Cyprus and subsequent analysis of human biopsy; blood samples from humans and dogs; and sandfly samples: final report of a project supported by the socio-economic research committee; TDR in 1987-1988 (SERC Training Grant No. 8700335; TDR-Project No. 880163). WHO, Geneva.
49. Ferrer L, 1992. Leishmaniasis. In: Kirk's current veterinary therapy XI, Kirk RW and Bonagura JD (eds), *Saunders company,Philadelphia,* pp. 266--270.
50. Ferrer L, 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, pp. 6--10.
51. Ferrer L, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M, 1988a. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract 29:* 381--388.
52. Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D, 1988b. Idendification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci 44:* 194--196.
53. Ferroglio E, Romano A, Passera S, D'Angelo A, Guiso P, Ghiggi E, Bolla C, Trisciuoglio A, Biglino A, 2006. Dog's parasite and zoonotic risk: From old to new "emergencies" in the North-West of Italy. *Parassitologia 48 (1-2):*15--116.

54. Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M, 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): The example of the Priorat focus. *Veterinary Parasitology 83 (2):* 87--97.
55. Gállego M, Pratlong F, Fisa R, Riera C, Rioux JA, Dedet JP, Portús 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 95(3):* 269--271.
56. Gradoni L, Gramiccia M, 1994. *Leishmania infantum* Tropism: Strain genotype or host immune status? *Parasitology Today 10(7):* 264--267.
57. Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A, 2003. Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerg Infect Dis 9:* 1617--1620.
58. Gramiccia M and Gradoni L, 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol 35:* 1169--1180.
59. Gramiccia M, Gradoni L, Di Martino L, Romano L, Ercolini D, 1992. Two syntopic zymodenes of *Leishmania infantum* cause human and canine visceral leishmaniasis in the Naples area, Italy. *Acta Trop 50:*357--359.
60. Groulade P and Person JM, 1987. Incidence and significance of monoclonal gammopathies in dogs. Comparison with those in humans. *Bull Acad Natl Med 171:* 1013-1015.
61. Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Grasia MJ, Peribanez MA, Alvar J, Castillo JA, 2000. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Reasearch in Veterinary Science 69:* 249--253.
62. Haralambous C, Antoniou M, Pratlong F, Dedet JP, 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:* 33--42.

63. Hide M, Bañuls AL, Tibayrenc M, 2001. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology123:* 425--432.
64. Howard MK, Ogunkolade W, Bryceson AD, Davidson RN, Moody AH, Miles MA, 1992. A DNA probe for human visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg 86:* 35--36.
65. Karunaweera ND, Pratlong F, Siriwardane HV, Ihalamulla RL, Dedet JP, 2003. Sri Lankan cutaneous leishmaniasis is caused by *Leishmania donovani* zymodeme MON-37. *Trans R Soc Trop Med Hyg 97:* 380--381.
66. Kassai T, Cordero del Campillo M, Euzeby J, Gaafa S, Hiepe Th, Himonas E, 1998. Stadardize nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol 29:* 299--326.
67. Kemp M, Kharazmi T, Kharazmi A, 1996. The contrasting roles of $CD4^+$ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis is an example. *Immunol Today 17:* 13--16.
68. Killick- Kendrick R, 1990. The life cycle of *Leishmania* in the sundfly with special reference to the form infective to the verterbrate host. *Ann Parasitol Hum Comp 65:* 37—42.
69. Killick- Kendrick R and Killick- Kendrick M, 1999. Biology and sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, pp. 26--31.
70. Koechler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schönian G, Zahner H, Burkhardt E, 2002. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by Leishmania infantum. *Vet. Parasitol. 109:* 9--17.
71. Koliou M, Soteriades ES, Mazeris A, Antoniou M, Elia A, Novelli V, 2008. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with Epstein Barr virus and *Leishmania infantum* co-infection in a child from Cyprus. *J Pediatr Hematol Oncol 30:* 704--707.
72. Kontos Vj and koutinas AF, 1993. Old World Canine Leishmaniasis. *Comp Cont Ed Pract Vet 15:* 949--959.
73. Koutinas AF, Kontos VI, Kaldrimidou H, Lekkas S, 1995. Canine leishmaniasis-associated nephropathy: a clinical clinicopathologic and

patologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria. *Europ J Comp Anim Pract 5:* 31--38.

74. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG, 1999. Clinical Considerations on Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) in Greece: A Retrospective Study of 158 Spontaneous Cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc 35:* 376--383.
75. Koutinas AF, Scott DW, Kontos VI, Lekkas S, 1993. Skin Lesions in Canine Leishmaniasis (Kala-Azar): A Clinical and Histopathological Study on 22 Spotaneous Cases in Greece. *Vet Dermatol 3:* 121--130.
76. Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreithr S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, Schönian G, 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and Infection 9:* 334--343.
77. Lainson R and Shaw JJ. Evolution, 1987. Classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in biology medicine. Vol I Biology and Epidemiology, Peters W and Killick- Kendrick R (eds), *Academic Press, London*, pp. 1--120.
78. Leger N, Depaquit J, 2008 . *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis 8:* 402.
79. Leger N, Depaquit J, Ferté H, Rioux JA, Gantier JC, Gramiccia M, Ludovisi A, Michaelides A, Christophi N, Economides P, 2000. Phlebotomine sand flies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. II—Isolation and typing of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Nicolle, 1908 (zymodème MON-1) from *Phlebotomus* (*Larroussius*) *tobbi* Adler et Theodor, 1930. *Parasite 7:* 143--146.
80. Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J, 1999. Ocurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. J Clin Microbiol 37: 1953--1957.
81. Lemerse JL, Darcy F, Kweider M, Capron A, Santoro F, 1988. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Acta Trop 45(2):* 99--108.

82. Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME, 2002. A cross-sectional study of Leishmania spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology 109:* 19--27.
83. Lewis J and Ward R, 1987. Trasmissions and vectors, p. 235-262 In: R. Killick-Kendrick (ed), The leishmaniases in biology and medicine. Academic Press, London.
84. Liew FY and O´Donnell CA, 1993. Immunology of Leishmaniasis. *Adv Parasitol 32:* 161--259.
85. Lightner LK, Chulay JD, Bryceson AD, 1983. Comparison of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* from splenic aspirates. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. *Am J Trop Med Hyg* 32(2)*:296*--299.
86. Lobetti R, 2002. Infectious causes of anaemia. Proceedings of the 27th WSAVA Congress, volume I, Gordoba, Spain, pp. 277--278.
87. Longstaffe JA, Jefferies AR, Kelly DF, Bedford PGC, Herrtage ME, Darke PGG, 1983. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potencial human health hazard. *J Small Anim Pract 24:* 23--30.
88. Lukes J, Mauricio I, Schönian G, Dujardin JC, Kuhls K, Tintaya K, Jirku M, Chocholova E, Haralambous C, Pratlong F, Obornik M, Horak A, Ayala F, Miles M, 2007. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with revesion of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:* 9375--9380.
89. Lyons S, Veeken H, Long J, 2003. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Tropical Medicine and International Health 8 (8):* 733--739.
90. Mancianti F, Gradini L, Gramiccia M, Pieri S, Marconcini A, 1986. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trop Med Parasitol 37:* 110--112.
91. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L, 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health 13:* 256--264.

92. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA, 1999. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology 119:* 237--246.
93. Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilici M, 1992. Western blot analysis of antibodies to Leishmania infantum antigens: Potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. Am J Trop Med Hyg 47: 764--771.
94. Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, Tsatsaris A, Moschandreas J, Messaritakis I, Christodoulou V, Papadopoulos B, Ivović V, Pratlong F, Loucaides F and Antoniou M, in press. Leishmaniases and the Cyprus paradox. *Am J Trop Med Hyg*.
95. Minodier P, Piarroux R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H, 1997. Rapid identification of causative species in patients with Old World Leishmaniasis. *J Clin Microbiol 35:* 2551--2555.
96. Minter DM, Eitrem UR, 1989. Leishmaniasis. Hart DT, ed. The current status and new strategies for control, NATO ASI series: Series A. Life sciences, Plenum Press, New York, 207--216.
97. Molleda JM, Novales M, Ginel PJ, Fernadez A, Lopez R, 1993. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Isr J Vet Med 48:* 173--178.
98. Molyneux DH and Killick- Kendrick R, 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: The Leishmaniasis in biology medicine. Vol I Biology and Epidemiology, Peters W and Killick- Kendrick R (eds), *Academic Press, London*, pp. 121--176.
99. Moral L, Rubio EM, Moya M, 2002. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacantí Region (Spain): Implications for the epidemiology of Leishmania infantum infection in southern Europe. Trans R Soc Trop Med Hyg 96: 129--132.
100. Moreno G, 1989. Les complexes *Leishmania donovani* et *Leishmania infantum*. Implications taxinomiques, biogĕographiques et ĕpidĕmiologiques. A propos de l' analyse enzymatique de 548 souches de l'Ancient et du Nouveau Monde. PhD thesis. University of Montepellier France.

101. Moreno G, Rioux JA, Lanotte G, Pratlong F, Serres E, 1986. Leishmania, Toxonomie, Phylogénèse, Applications éco-épidémiologiques. (J.A. Rioux Edt.) Le complexe *Leishmania donovani* s.l . Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe Leishmania infantum. Corollaires biogĕographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde, IMEEE, Montpellier 105--117.
102. Moreno J and Alvar J, 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology 18(9):* 399--405.
103. Moreno J, Nieto J, Chamizo C, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC, Alva J, 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol 71:*181--195.
104. Murray W, Berman J, Davies C, Saravia N, 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet 366:* 1561--1577.
105. Musa AM, Khalil EAG, Raheem MA, Zijlstra EE, Ibrahim ME, El Hassan IM, Mukhtar MM, El Hassan AM, 2002. The natural history of Sudanese post-kala-azar dermal leishmaniasis: clinical, immunological and prognostic features. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology 96:* 765--772.
106. Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O, Rallis T, Fytianou A, 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol 91:* 197--204.
107. Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P, 2007. A lipophosphoglycan –independent development of Leishmania in permissive sandflies. *Microbe Infect 9:* 317--324.
108. Nawaratna SS, Weilgama DJ, Wijekoon CJ, Dissanayake M, Rajapaksha K, 2007. Cutaneous leishmaniasis, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis 13:* 1068--1070.
109. Neave HR, 1978. Statistics Tables. London: Unwin Hyman, 27.
110. Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E, 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection. *Veterinary Parasitology 45:* 33--47.

111. Nieto CG, Vinuelas J, Blanco A, Garcia-Alonso M, Verdugo SG, Navarrete I, 1996. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroids plexus. *Vet Rec 139:* 346--347.
112. Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G, 2006. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of Leishmania infantum MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology 44 (2):* 495--503.
113. Olivier M, Badaró R, Medrano FJ, Moreno J, 2003. The pathogenesis of Leishmania/HIV co-infection: Cellular and immunological mechanisms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology 97 (SUPPL. 1):* S79--S98.
114. Oumeish Y, 1999. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clinics in Dermatology 17(3):* 249--254.
115. Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U, 2001. Trasmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc 219:* 1076--1083.
116. Ozbilgin A, Ozbel Y, Alkan MZ, Atambay M, Ozcel MA, 1995. Cultivation of *Leishmania* sp. in nutrient broth. *J Egypt Soc Parasitol 25(2):* 437--441.
117. Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, Chang K-P, Reed SG, Ozcel MA, 1998. Recombinant K39 antigen for sero-diagnosis and epidemiology of human and canine visceral Leishmaniasis in western turkey. *Parasitology International 47(1):* 227.
118. Pampiglione S, Manson Bahr PEC, La Placa M, 1975. Studies in Mediterranean leishmaniasis. III. The leishmanin skin test in kala azar . Trans R Soc Trop Med Hyg 69: 60--68.
119. Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJP, Rutten VP, Gebhard D, del Real G, Ruitenberg J, 1995. *Leishmania infantum* – specific T cell lines derived fromasyptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex- restricted manner. *Eur J Immunol 25:* 1594--1600.
120. Pinelli E, Killick- Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenberg J, 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs

experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum. Infect Immun 62:* 229--235.

121. Pinelli E, Rutten VPMG, Ruitenberg J, 1999. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, pp. 60--64.
122. Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A, 1991. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistocemical and electron-microscopic study. *Nephron 57:* 444--452.
123. Polydorou K, 1984. A short history of echinococcosis control in Cyprus. *Hist Med Vet 9:* 61--64.
124. Pozio E, Gradini L, Bettini S, Gramiccia M, 1981. Leishmaniasis in Tuscany (Italy) V. Further isolation of *Leishmania* from Rattus rattus in the Province of Grosseto. *Ann Trop Med Parasitol 75:* 393--395.
125. Prasad R, Muthusami S, Pandey N, Tilak V, Shukla J, Mishra OP, 2009. Unusual Presentations of Visceral Leishmaniasis. *Indian Journal of Pediatrics,* pp. 1--3. Article in Press.
126. Pratlong F, Dereure J, Deniau M, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dedet JP,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:* 47--56.
127. Ramesh V and Mukherjee A, 1995. Post kala-azar dermal leishmaniasis**.** *Int J Dermatol 34:*85--91.
128. Rastgeldi S, Özbel Y, Özensoy TS, Ertabaklar H, Göcmen B, 2005. Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae) of the northern part of Cyprus island. *Arch Inst Pasteur Tunis 82:* 121.
129. Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Detet JP, 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.
130. Reiner SL, 1994. Parasites and T Helper Cell Development: Some Insights. *Parasitology Today 10:* 485--488.

131. Reithinger RR, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez CP, Alexander B, Brooker S, 2007. Cutaneous leismaniasis. *THE LANCET Infectious Diseases 7(9):* 581--596.
132. Ribeiro JM, 1989. Role of saliva in tick/host interactions. *Exp Appl Acarol 7:* 15--20.
133. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M, 2004. Detection of Leishmania infantum crytic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Island, Spain) by different diagnostic methods. Trans R Soc Trop Med Hyg 98: 102--110.
134. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J, 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 65:* 111--125.
135. Rioux JA, Leger N, Haddad N, 1998. Natural infestation of *Phlenotomus tobbi* (Diptera, Physholidae) by *Leishmania donovani* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in Syria. *Parassitologia 10:* 148.
136. Romero HD, Silva LDA., Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, Alecrim W, Moraes-Souza H, Prata A, 2009. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. Am J Trop Med Hyg 81: 27--33.
137. Rose K, Curtis J, Baltwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, Spurck T, Low Choy J, Handman E, 2004. Cutaneous leishmaniasis in red Kangarous: isolation and characterisation of the caussative organism. Int. J. Parasitol. 34: 655--664.
138. Sacks DL and Perkins PV, 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science 223:* 1417--1419.
139. Salotra P, Sreenivas G, Beena KR, Mukherjee A and Ramesh V, 2003. Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *Journal of Clinical Pathology 56:* 840--843.
140. Schnur LF, Eisenberger CL, Naseredeen A, Dedet JP, Pratlong F, Jaffe CL, Benami R, 2001. Adult visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* sensu stricto acquired locally in Israel. 2nd World Congress on

Leishmaniasis; proceedings of the congress, 20-24 May, Hersonissos, Crete, Greece, Abstract 76.

141. Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin JC, 2008. Leishmaniases in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. Trends in Parasitology 21(3): 135--142.
142. Scott P, 1989. The Role of TH1 and TH2 Cells in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Exp Parasitol 68:* 369--372.
143. Sellon RK, Menard MM, Meuten DJ, Lengerich EJ, Steurer FJ, Breitshwerdt EB, 1993. Endemic visceral leismaniasis in a dog from Texas. *J Vet Intern Med 7:* 16--19.
144. Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E, 1999. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol 15:* 271--276.
145. Slappendel RJ and Ferrer L, 1998. Leishmaniasis. In: Infectious diseases of dog and cat, 2nd ed. Greene CE (eds), *Saunders company,Philadelphia,* pp. 450--458.
146. Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands, 1988. *Vet Q 10:* 1--16.
147. Solano-Gallego L, Llull J, Arboix M, Ferrer L, Alberola J, 2001. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asyptomatic dogs. *Veterinary Parasitology 102 (1-2):* 163--166.
148. Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L, 2000. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. *Veterinary Parasitology 90):* 37--45.
149. Steele JH, Polydorou K, Orphanides A, Crowther R, Markides AA. 1976. Zoonoses in Cyprus. Past and present including a comment on the public health. Int J Zoonoses *3(2):*65--76.
150. Sundar S, Rai M, 2005. Treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy 6 (16):* 2821--2829.
151. Swenson CL, Silverman J, Stromberg PC, Johnson SE, Wilkie DA, Eaton KA, Kociba GJ, 1988. Visceral leishmaniasis in an English foxhound from an Ohio research colony. *J Am Vet Med Assoc 193:* 1089--1092.

152. Takken W and Bart Knols GJ, 2007. Emerging pests and vector- borne diseases in Europe. In: The leishmaniases of Southern Europe. Vol I Ecology and control of vector-borne diseases, Gramiccia M and Gradoni L (eds). Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 75--95.
153. Trees A and Shaw S, 1999. Imported diseases in small animals. *In practice* pp. 482--490.
154. Tremblay M, Olivier M, Bernier R, 1996. Leishmania and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitology Today 12 (7):* 257--261.
155. Valkoun A, Nádvorník V, Kostrhun L, 1985. A case of visceral leishmaniasis imported from the Mediterranean. *Cas Lek Cesk 124:* 1582--1585.
156. Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M, 2000. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (Leishmania infantum). *Vet Rec 146:* 698--703.
157. Velo E, Bino S, Kuli-Lito G, Pano K, Gradoni L, Maroli M, 2003. Recrudescence of visceral leishmaniasis in Albania: retrospective analysis of cases during 1997 to 2001 and results of an entomological survey carried out during 2001 in some districts. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 97(3): 288--290.
158. Vinuelas J, Garcia-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Miron C, Carcelen J, Alonso C, Nieto CG, 2001. Menigeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol 101:* 23--27.
159. Wheatley T, Sacks S, Flemans RJ, Rubenstein D, 1983. Visceral leishmaniasis: a rare imported disease. *J Infect 7:* 166--167.
160. Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG, 1991. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. Am J Trop Med Hyg 44: 260--271.
161. World Health Organization, 1990. Control of Leishmaniases. Technical Report Series No 793 ed. WHO, Geneva.
162. World Health Organization, 1991. Basic laboratory methods in medical Parasitology. WHO Geneva.

163. Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P, Mignone W, 1999. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). *Veterinary Parasitology 81 (1):* 11--19.
164. Zijlstra EE, El Hassan AM, Ismail A, Ghalip HW, 1994. Endemic kala-azar in Eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and sub-clinical infection and post kala-azar dermal leishmaniasis**.** *Am J Trop Med Hyg 51:*826--36.
165. Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, El Hassan IM, El Hassan AM, 2003. Post-kala-azar dermal leishmaniasis**.** *Lancet Infect Dis 3:*87--98.