**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

# ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΛΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *LEISHMANIA*

**ΑΝΔΡΕΑΔΟΥ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ**

**Συμβουλευτική επιτροπή:**

**Οικονομόπουλος Ι. Επ. Καθηγητής**

**Θεοδωρόπουλος Γ. Καθηγητής**

**Αντωνίου Μ. Επ. Καθηγήτρια**

**ΑΘΗΝΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

# ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΛΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *LEISHMANIA*

**ΑΝΔΡΕΑΔΟΥ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ**

**Εξεταστική επιτροπή:**

**Οικονομόπουλος Ι. Επ. Καθηγητής**
**Θεοδωρόπουλος Γ. Καθηγητής**
**Αντωνίου Μ. Επ. Καθηγήτρια**
**Γαζούλη Μ. Επ. Καθηγήτρια**
**Μπαλάσκας Χ. Επ. Καθηγητής**
**Παπαδομιχελάκης Γ. Επ. Καθηγητής**
**Χάγερ Α. Επ. Καθηγήτρια**

**ΑΘΗΝΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014**

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής κ. Ι. Οικονομόπουλο, Επ. Καθηγητή για την πολύτιμη βοήθεια, τις υποδείξεις του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Γ. Θεοδωρόπουλο, Καθηγητή και την κ. Μ. Αντωνίου, Επ. Καθηγήτρια για την καθοδήγηση και τα εύστοχα σχόλιά τους. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Μ. Γαζούλη, Επ. Καθηγήτρια, κ. Χ. Μπαλάσκα, Επ. Καθηγητή, κ. Γ. Παπαδομιχελάκη, Επ. Καθηγητή και κ. Α. Χάγερ, Επ. Καθηγήτρια για το χρόνο που μου αφιέρωσαν και τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, την οικογένειά μου, φίλους και συναδέλφους και ιδιαίτερα τους Ε. Λιανδρή και Β. Ντάφη που ο καθένας με τον τρόπο του με βοήθησαν ουσιαστικά για την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

# 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λεϊσμανίωση είναι μια παρασιτική νόσος του σκύλου που αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση της ασθένειας είναι καθοριστικής σημασίας στην εφαρμογή στοχευμένης θεραπείας και μειώνει τον κίνδυνο μετάδοσης, συμβάλλοντας στον περιορισμό του αριθμού των κρουσμάτων και της γεωγραφικής εξάπλωσης. Η χρήση βιονανοσυστημάτων θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στη διευκόλυνση της ανίχνευσης του συγκεκριμένου παθογόνου σε κλινικά δείγματα χωρίς τη χρήση εξειδικευμένων συσκευών υψηλού κόστους.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αναπτυχθεί μια εύκολα εφαρμόσιμη, γρήγορη, ειδική και αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης της *Leishmania* spp. χρησιμοποιώντας κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου και νανοσωματίδια χρυσού.

Αρχικά, έγινε συγκριτική αξιολόγηση τεσσάρων μεθόδων PCR για ανίχνευση της *Leishmania* spp. προκειμένου να επιλεχθεί η κατάλληλη περιοχή-στόχος του γενώματος της *Leishmania* που θα στόχευαν οι ολιγονουκλεοτιδικοί-ανιχνευτές και να αναδειχθεί μια επαρκής μέθοδος αναφοράς. Σχεδιάστηκαν στη συνέχεια 4 ολιγονουκλεοτιδικοί-ανιχνευτές που συνδέθηκαν με εμπορικά διαθέσιμα νανοσωματίδια χρυσού για την ανίχνευση του DNA της *Leishmania*. Για τον ίδιο σκοπό (ανίχνευση DNA της *Leishmania*) σχεδιάστηκαν δύο ολιγονουκλεοτιδικοί-ανιχνευτές, ένας για σύνδεση με κβαντικά κοκκία και ο άλλος για σύνδεση με μαγνητικά σφαιρίδια. Για την ανίχνευση ενός επιφανειακού αντιγόνου της *Leishmania*, τα κβαντικά κοκκία και τα μαγνητικά σφαιρίδια συνδέθηκαν με δύο ειδικά για το παράσιτο αντισώματα. Η αξιολόγηση των υπό μελέτη μεθόδων έγινε αναφορικά με την ευαισθησία τους, την ειδικότητά τους, το ελάχιστο όριο ανίχνευσής τους (Ε.Ο.Α.), και ειδικά για τις μεθόδους PCR, την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητά τους. Το υλικό αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε συνίστατο από στελέχη απομονωμένα σε καλλιέργεια και κλινικά δείγματα που συλλέχθηκαν από σκύλους που είχαν προσκομιστεί σε κτηνιατρικές κλινικές με υποψία λεϊσμανίωσης.

Με όλες τις μεθόδους PCR που εξετάστηκαν καταγράφηκαν παρόμοια αποτελέσματα κυρίως αναφορικά με τα καλλιεργημένα στελέχη. Το υψηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο Γ (58.1%). Με τις άλλες τρεις μεθόδους PCR, το ποσοστό θετικότητας ήταν σημαντικά χαμηλότερο και κυμάνθηκε σε όλες τις περιπτώσεις μεταξύ 19 και 25%. Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα εκτιμήθηκε αναφορικά με τη μέθοδο Γ, με την οποία ανιχνεύτηκε το υψηλότερο ποσοστό επιβεβαιωμένων θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Έτσι για τις μεθόδους Α, Β, και Δ, η ευαισθησία και ειδικότητα διαμορφώθηκε αντίστοιχα στο

50.7% (33/65), 43% (28/65), 40% (26/65) και 90.8% (69/76), 93.4% (71/76) 89.5% (68/76). Το μέσο ελάχιστο όριο ανίχνευσης των μεθόδων Α-Δ σε επτά επαναλήψεις υπολογίστηκε αντίστοιχα στα 30.7, 5, 3.7, και 5 προμαστιγωτά/ml. Η επαναληψιμότητα ήταν εξαιρετική για όλες τις μεθόδους αφού ήταν υψηλότερη από 0.75, κάτι που ήταν στατιστικά σημαντικό σε επίπεδο 5%, ενώ η αναπαραγωγιμότητα ήταν καλή έως εξαιρετική ανάλογα με τα αντιδραστήρια PCR που χρησιμοποιήθηκαν. Οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες ανιχνεύτηκαν σωστά και με τους τρεις συνδυασμούς νανοσωματιδίων. Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου ανίχνευσης DNA με τα νανοσωματίδια χρυσού συγκριτικά με τη μέθοδος αναφοράς, προσδιορίστηκε σε 92% και 100% αντίστοιχα αναλόγως του εξεταζόμενου υλικού, ενώ το Ε.Ο.Α., σε 11,5 ng/μl. Οι αντίστοιχες τιμές που καταγράφηκαν στο πλαίσιο του προσδιορισμού της ειδικότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου ανίχνευσης DNA με χρήση κβαντικών κοκκίων ήταν 3,125 ng/μl, ενώ η ειδικότητα της μεθόδου ανίχνευσης των κυττάρων του πρωτοζώου με κβαντικά κοκκία ήταν $10^3$ κύτταρα/ml.

Οι τρεις μέθοδοι που περιγράφηκαν στην παρούσα μελέτη παρέχουν έναν εύκολο, γρήγορο και οικονομικό τρόπο για την ανίχνευση μελών του γένους *Leishmania* με τη χρήση των συγκεκριμένου τύπου νανο-ανιχνευτών. Οι προτεινόμενες μέθοδοι μπορεί να αποτελέσουν βάση για την ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων ελέγχου για χρήση σε ενζωοτικές περιοχές ιδίως εάν λόγω διαθέσιμων πόρων δεν αποτελεί προτεραιότητα η ανίχνευση πολύ μικρής ποσότητας του παρασίτου.

# 1. ABSTRACT

Leishmaniosis is a parasitic zoonotic disease that represents a significant public health threat. The accurate diagnosis of the disease is of determinative importance in the application of targeted treatment and minimizes the danger of transmission contributing to the decrease of the number of cases and the limitation of their geographic distribution. The use of bio-nanoparticles could contribute significantly to the detection of the pathogen in clinical samples without the need of dedicated equipment.

The aim of this study was the design of an easily applicable, fast, specific and reliable technique for the detection of *Leishmania* spp. using cadmium selenide (CdSe) quantum dots and gold nanoparticles.

Initially, a comparative evaluation of four PCR methods was performed for the detection of *Leishmania* spp. in order to define the optimum target-DNA region of the *Leishmania* genome, and conclude to a reference methodology. Four (4) oligonucleotide-probes were designed to be conjugated with commercially available gold nanoparticles for the detection of *Leishmania* DNA. For the same reason (detection of *Leishmania* DNA) two oligonucleotide-probes were designed, the one to be conjugated with quantum dots and the other with magnetic beads. For the detection of surface antigen of *Leishmania*, quantum dots and magnetic beads were conjugated with two antibodies specific for parasite's surface antigens. The evaluation of the methods under study was performed in regard to their sensitivity, specificity, minimum detection limit (MDL), and specifically for the PCR methods, repeatability and reproducibility. The reference material used consisted of cultured isolates and clinical samples that were collected from dogs brought to veterinary clinics with suspicion of leismaniosis.

Similar results were recorded by all PCR methods with regard mainly to cultured isolates. The percentage of positive results recorded by method C was significantly higher compared to the other three (58.1%). The respective measurement for methods A, B, and D, was similar and varied in all cases between 19 and 25%. The relative sensitivity and specificity were referenced to method C that produced the highest percentage of confirmed positive and negative results. Effectively sensitivity and specificity of methods A, B, and D were defined to 50.7% (33/65), 43% (28/65), 40% (26/65) and 90.8% (69/76), 93.4% (71/76), 89.5% (68/76) respectively. The MDL of the methods A-D was calculated as the mean average of the measurement of seven repeats, at 30.7, 5, 3.7, and 5 promastigotes/ml, respectively. Repeatability was excellent for the all methods, as it was higher than 0.75, something that was

statistically significant at 5% level. Reproducibility was good to excellent depending on the PCR reagents that were used. The positive and the negative controls were correctly identified with all three combinations of nanoparticles. The relative sensitivity and specificity of the DNA detection method with gold nanoparticles referenced to PCR, were 92% and100% respectively depending on the material to be examined, while the MDL was defined at 11,5ng/ml. The MDL of the DNA detection method using quantum dots was 3.125ng/ml, while the specificity of cellular detection method with quantum dots was $10^3$ cells/ml.

The three methods described in the present study provide an easy, fast and economic way for the detection of members of genus *Leishmania* using nano-probes. The proposed methods can be used for the development of diagnostic methods for use particularly in enzootic regions where detection of very small amounts of parasite is not of top priority.

# 2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

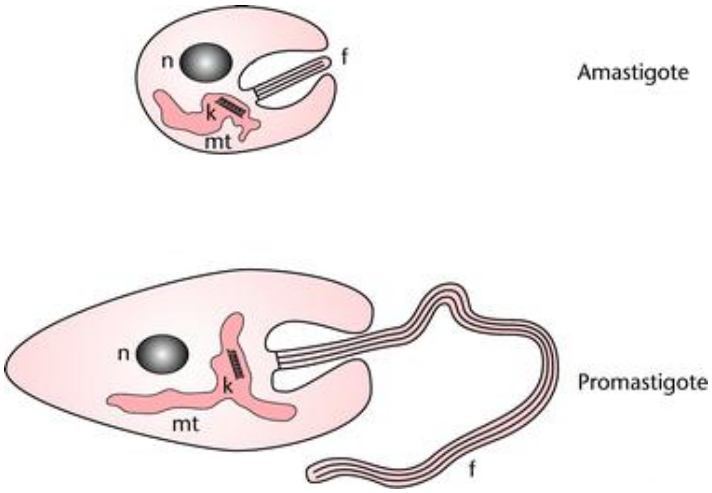
Η λεϊσμανίωση είναι μια παρασιτική νόσος του σκύλου που αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Χαρακτηρίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως μία από τις έξι πιο σημαντικές ασθένειες (World Health Organization, 2010). Περίπου 350 εκατομμύρια άνθρωποι θεωρείται ότι κινδυνεύουν να μολυνθούν, ενώ η νόσος πλήττει 14 εκατομμύρια άτομα σε 98 χώρες (Alvar et al., 2012). Η λεϊσμανίωση προκαλείται από 20 και πλέον είδη του γένους *Leishmania*, τα οποία μεταδίδονται με το τσίμπημα των θηλυκών φλεβοτόμων (*Phlebotomus* spp., Παλαιό Κόσμο ή *Lutzomyia* spp., Νέο Κόσμο). Ο σκύλος είναι ο κύριος ξενιστής του παρασίτου και η βασική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου (Alvar et al., 2004).

## 2.2 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Το γένος *Leishmania* ανήκει στο Βασίλειο *Eukaryota*, στο Φύλο *Euglenozoa*, στην Οικογένεια *Trypanosomatidae*. Το κύριο χαρακτηριστικό των μελών αυτής της οικογένειας είναι η ύπαρξη ενός κινετοπλάστη, που είναι η μοναδική μορφή μιτοχονδριακού DNA (Morris et al., 2001). Ανάλογα με το είδος της *Leishmania* που προκαλεί τη νόσο υπάρχουν τρεις μορφές λεϊσμανίωσης, η δερματική, η βλεννογονική και η σπλαχνική (καλαάζάρ). Η δερματική μορφή προκαλείται από τα είδη: *L. tropica, L. major, L. aethiopica, L. mexicana*. Οι περισσότερες περιπτώσεις της βλεννογονικής μορφής συνδέονται με τα παράσιτα που ανήκουν στο *Leishmania braziliensis complex* (*L. braziliensis braziliensis, L. braziliensis panamensis, L. braziliensis guanensis*), ενώ η σπλαχνική λεϊσμανίωση προκαλείται από τα παράσιτα που ανήκουν στο *Leishmania donovani complex* (*L. donovani* και *L. infantum* στον Παλαιό Κόσμο και *L. chagasi* στο Νέο Κόσμο). Ο Παλαιός Κόσμος περιλαμβάνει τις Μεσογειακές χώρες, τη Μέση Ανατολή και την Αφρική, ενώ ο Νέος Κόσμος το Μεξικό, την Κεντρική Αμερική και τη Νότια Αμερική.

Η *Leishmania* είναι ένα διφασικό παράσιτο που ολοκληρώνει τον κύκλο ζωής του σε δύο ξενιστές, έναν θηλυκό φλεβοτόμο ο οποίος φιλοξενεί την εξωκυτταρική προμαστιγωτή μορφή (επίμηκες, διαμέτρου 10-20 μm, κινητό, με μαστίγιο) του παρασίτου και ένα θηλαστικό μέσα στο οποίο αναπτύσσεται η ενδοκυτταρική αμαστιγωτή μορφή του (στρογγυλό, διαμέτρου, 3-7 μm, ακίνητο), (Εικόνα 1). Η τελική προμαστιγωτή μορφή που ονομάζεται μετακυκλικό προμαστιγωτό,

μεταφέρεται σε έναν καινούριο σπονδυλωτό-ξενιστή ολοκληρώνοντας τον κύκλο ζωής του παρασίτου.




**Εικόνα 1:** Σχηματική απεικόνιση των δύο μορφών της *Leishmania* spp. (όπου n: πυρήνας, mt: μιτοχόνδριο, k: κινετοπλάστης, f: μαστίγιο).

Οι θηλυκοί φλεβοτόμοι του γένους *Phlebotomus* (Παλαιό Κόσμο) ή *Lutzomyia* (Νέο Κόσμο) είναι οι βασικοί φορείς της *Leishmania* (Lainson and Shaw, 1987). Υπάρχουν 800 περίπου γνωστά είδη αλλά μόνο περίπου 70 από αυτά μεταφέρουν τη *Leishmania*. Στην Ελλάδα, οι φλεβοτόμοι που θεωρούνται πιθανοί μεταδότες της λεϊσμανίωσης ανήκουν στα είδη *Phlebotomus neglectus, P. perfiliewi, P. tobbi, P. simici, P. balcanicus, P. Alexandri, P. similis* και *P. mascitti* (Chaniotis et al., 1994; Papadopoulos and Tselentis, 1994; Christodoulou et al., 2012; Ntais et al., 2013). Οι φλεβοτόμοι είναι έντομα (1-4mm) που αναπτύσσονται σε σκοτεινούς χώρους, ζουν 14-40 ημέρες, δραστηριοποιούνται μετά τη δύση του ηλίου από νωρίς την άνοιξη μέχρι το τέλος του φθινοπώρου στις Μεσογειακές χώρες και όλο το χρόνο στη νότια Αμερική (Lainson and Shaw, 1987). Το θερμοκρασιακό εύρος δραστηριότητας τους είναι 15-28°C σε συνδυασμό με υψηλή σχετική υγρασία και απουσία ανέμου ή βροχής (Killick-Kendrick, 1999). Οι σκνίπες διανύουν αποστάσεις από 200 μέτρα μέχρι 2.5 χιλιόμετρα και έλκονται στα σπίτια τη νύχτα εξαιτίας θετικού φωτοτροπισμού (Lainson and Shaw, 1987). Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών της σκνίπας φαίνεται παρακάτω (Πίνακα 1).

| Είδος *Leishmania* | Γεωγραφική εξάπλωση | Σκνίπες-φορείς |
|---|---|---|
| *L. infantum* | Μεσογειακές χώρες, Μέση Ανατολή | *Phlebotomus perniciosus, P. ariasi, P. perfiliewi, P. neglectus, P. langeroni, P. tobbi* |
| | Νότια Ασία, Ιράν, Αρμενία, Αφγανιστάν | *P. kandelakii* |
| | Κεντρική Ασία, Κίνα | *P. chinensis, P. alexandri* |
| *L. chagasi* (συνώνυμο της *L. infantum*) | Κεντρική και Νότια Αμερική | *Lutzomyia longipalpis, Lu. evansi, Lu. olmeca olmeca* |
| *L. donovani* | Ανατολική Αφρική, Ινδία, Κύπρος, Τουρκία | *P. orientalis, P. Martini, (P. tobbi* |
| *L. tropica* | Βόρεια Αφρική, Ελλάδα | *P. sergenti, P. Arabicus, P. similis* |
| *L. braziliensis* | Κεντρική και Νότια Αμερική | *Lu. wellcomei, Lu. spinicrassa, Lu. whitmani, Lu. yucumensis, Lu. carrerai carrerai, Lu. llanosmartinsi, Lu. ovallesi, Lu. intermedia, Lu. gomezi, Lu. trapidoi, Lu. ylephiletor, Lu. umbratilis* |
| *L. peruviana* | Περουβιανές Άνδεις | *Lu. peruensis, Lu. verrucarum, Lu. ayacuchensis* |
| *L. panamensis* | Κεντρική Αμερική | *Lu. trapidoi, Lu. ylephiletor, Lu. gomezi, Lu. panamensis, Lu. hartmanni* |

**Πίνακας 1:** Γεωγραφική εξάπλωση των ειδών της *Leishmania* που μολύνουν τον σκύλο και τον άνθρωπο, και οι σκνίπες φορείς τους.

## 2.3 ΕΠΙΖΩΤΙΟΛΟΓΙΑ

Παγκοσμίως, ο πιο συνηθισμένος τρόπος μετάδοσης είναι μέσω των θηλυκών σκνιπών (οι αρσενικές σκνίπες δεν τρέφονται με αίμα), οι οποίες φέρουν τις προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, τις οποίες μεταδίδουν με κάθε νύγμα κατά τη μύζηση αίματος. Μερικές φορές, το παράσιτο μεταδίδεται με τη μετάγγιση μολυσμένου αίματος, ενώ πιθανολογείται και η μέσω τραυμάτων και ελκών μηχανική μετάδοση από σκύλο σε σκύλο χωρίς να μεσολαβεί ενδιάμεσος ξενιστής (Enserink,

2000; Owens et al., 2001; Giger et al., 2002; Rosypal et al., 2003; Baneth et al., 2005). Βέβαια υπάρχουν και άλλοι πιθανοί τρόποι μετάδοσης, όπως παρεντερικά π.χ. με βελόνες (επαγγελματική νόσος), κάθετη μετάδοση ή και κατά τη συνουσία (αφροδίσια μετάδοση), (Sivakumar, 2004). Η λεϊσμανίωση μπορεί να μεταδοθεί με τις σκνίπες κατευθείαν στον άνθρωπο χωρίς την εμπλοκή ενδιάμεσου ξενιστή (ανθρωπονόσος). Αυτός ο τρόπος μετάδοσης έχει αναφερθεί για τα είδη είδη *L. tropica* complex και *L. donovani* complex αλλά όχι για τη *L. infantum* (Mauricio, 2007).

Ο σκύλος αποτελεί τον κύριο ξενιστή για την *L. infantum*, ενώ η ασθένεια εξαπλώνεται κυρίως σε τρεις περιοχές, την Κίνα, τις Μεσογειακές χώρες και τη Βραζιλία. Το παράσιτο έχει βρεθεί και σε άλλα είδη ζώων όπως η γάτα, το άλογο, το πρόβατο, τα άγρια τρωκτικά, αλλά και σε λύκους, αλεπούδες και τσακάλια. Εξαιτίας όμως του μικρού αριθμού των ζώων αυτών και της μικρής πυκνότητάς τους δεν θεωρούνται βασικοί ξενιστές (Alvar et al., 2004). Πρόσφατα λαγοί και κουνέλια έχουν εμπλακεί στο βιολογικό κύκλο του παράσιτου στην Ισπανία (Molina et al., 2012). Στην Ιταλία και τη Νότια Ισπανία έχει βρεθεί *L. infantum* σε αρουραίους (Bettini et al., 1980; Morillas et al., 1985**)**, ενώ το ίδιο παράσιτο έχει ανιχνευτεί σε ερπετά, κοτόπουλα, άλογα, μαρσιποφόρα, μαϊμούδες και γάτες (World Health Organization, 1990; Desjeux, 2001; Desjeux, 2004; Ready, 2008). Οι γάτες μπορεί να είναι ο δευτερεύων ξενιστής της *L. infantum* στη Νότια Ευρώπη (Marty et al., 2007), δεδομένου ότι μολύνονται πειραματικά με τις σκνίπες (Maroli et al., 2007).

Το ποσοστό οροθετικότητας των σκύλων είναι παρόμοιο στις χώρες της δυτικής Μεσογείου, διαφοροποιούμενο από περιοχή σε περιοχή βάσει περιβαλλοντικών συνθηκών. Τα ορολογικά στοιχεία δείχνουν ότι από τα 15 εκατομμύρια σκύλων που υπάρχουν στην Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία και Πορτογαλία, τα 2.5 εκατομμύρια (16.7%) είναι μολυσμένα (Alvar, 2001). Υψηλότερο ποσοστό οροθετικότητας έχει αναφερθεί στη Νότια Αμερική και συγκεκριμένα 33% στη Βενεζουέλα (Zerpa et al., 2000) και 36% στη Βραζιλία (Ashford et al., 1998). Βέβαια, είναι πιθανό η οροθετικότητα να είναι υπερεκτιμημένη, διότι η ειδικότητα των ορολογικών τεχνικών είναι χαμηλή λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης με άλλα παράσιτα (*Babesia* spp. ή *Trypanosoma* spp.), (Alvar et al., 2004).

Στην Ελλάδα και σε άλλες Μεσογειακές χώρες η λεϊσμανίωση είναι το συχνότερο παρασιτικό νόσημα του σκύλου, αφού το ποσοστό των PCR θετικών ζώων φτάνει το 80% του συνολικού πληθυσμού (Berrahal et al., 1996; Dereure et al., 1999; Zaffaroni et al., 1999; Solano – Gallego et al., 2001; Leontides et al., 2002),

γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύνολο σχεδόν των σκύλων ενδέχεται να μολυνθεί κατά τη διάρκεια της ζωής του, χωρίς απαραιτήτως να εκδηλώσουν συμπτώματα ή να αναπτύξουν αντισώματα έναντι του παρασίτου. Οι οροθετικοί αλλά ασυμπτωματικοί σκύλοι εξακολουθούν να αποτελούν δεξαμενή του παρασίτου στη φύση (Molina et al., 1994; Travi et al., 2002), αν και σε μικρότερο ποσοστό σε σύγκριση με τους συμπτωματικούς (Moreno and Alvar, 2002).

Σε επιδημιολογικές μελέτες έχει μελετηθεί η σημασία του γένους, της ηλικίας και της φυλής του ξενιστή σε σχέση με την εμφάνιση της ασθένειας. Το γένος συνήθως δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα (Amela et al., 1995; Acedo-Sánchez et al., 1996; Morillas et al., 1996), αλλά έχει παρατηρηθεί ότι ανάμεσα σε ηλικιωμένα σκυλιά, τα αρσενικά μολύνονται πιο συχνά (Fisa et al., 1999). Η εκδήλωση της λεϊσμανίωσης σε σχέση με την ηλικία παρουσιάζει διμερή κατανομή με το 80 % των μολυσμένων σκύλων να βρίσκονται σε ηλικία μικρότερη των τριών ετών και τα υπόλοιπα στην ηλικία που αρχίζει η εκδήλωση καταστολής του ανοσοποιητικού τους συστήματος, δηλαδή μεταξύ 8 και 10 ετών (Amela et al., 1995; Acedo-Sánchez et al., 1996).

Θεωρητικά, όλες οι φυλές των σκύλων είναι ευπαθείς. Εντούτοις, κάποιες φυλές όπως ο κυνηγητικός της Ίμπιζα (Ibizan hound) και τα ημίαιμα (mongrels) έχει διαπιστωθεί ότι έχουν αναπτύξει ένα ιδιαίτερα υψηλό επίπεδο αντοχής σε περιοχές που χαρακτηρίζονται ενζωοτικές (Solano-Gallego et al., 2000).

Σε αγροτικές και ημι-αγροτικές περιοχές το 3 % των σκύλων μολύνονται σε κάθε περίοδο που μεταδίδεται η ασθένεια ενώ τα σκυλιά-φύλακες έχουν 70% μεγαλύτερη πιθανότητα να μολυνθούν (Amela et al., 1995). Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των σπιτιών με σκύλους στα προάστια και στα χωριά, όπου το μικροκλίμα είναι ιδανικό για την επιβίωση των σκνιπών. Οι σκύλοι που ζουν έξω από το σπίτι κινδυνεύουν περισσότερο από αυτούς που ζουν μέσα σε αυτό (πιο εκτεθειμένοι).

## 2.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Ο κύκλος ζωής της *Leishmania* ξεκινάει όταν το παράσιτο με την προμαστιγωτή μορφή του εισέρχεται στο δέρμα του θηλαστικού ξενιστή μετά από το τσίμπημα της σκνίπας. Συνήθως ενοφθαλμίζονται 100-1.000 παράσιτα, τα οποία προσκολλώνται πάνω στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων του Langerhans, των δενδριτικών κυττάρων και των μακροφάγων. Τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα παράσιτα ενώ παράλληλα αυτά μετατρέπονται στην αμαστιγωτή μορφή τους, η οποία είναι

ανθεκτική σε όξινο pH και έτσι προστατεύονται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα με τις πρωτεάσες επιφανείας τους, κυριότερη από τις οποίες είναι η γλυκοπρωτεΐνη gp63 (Solbach and Laskay, 2000). Επίσης, έχει βρεθεί ότι ακόμα και η έκθεση των μακροφάγων στο παράσιτο προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης του ενζύμου όξινης φωσφατάσης, επιτρέποντας έτσι την επιβίωσή του μέσα στο φαγολυσόσωμα (Theodoropoulos and Theis, 1989).

Η ανοσοποιητική αντίδραση του ξενιστή εκφράζεται με τη μορφή δύο Τ-λεμφοκυτταρικών αντιδράσεων από τις οποίες θα καθοριστεί αν το παράσιτο θα εξουδετερωθεί, θα παραμείνει σε λανθάνουσα μορφή ή θα προκαλέσει κλινική νόσο. Στην πρώτη περίπτωση (λανθάνουσα) πολλαπλασιάζονται και ενεργοποιούνται τα Th1 λεμφοκύτταρα με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυτταρικής ανοσίας και την αποτροπή εκδήλωσης συμπτωμάτων (ανθεκτικότητα έναντι στη νόσο). Στη δεύτερη περίπτωση (κλινική νόσος) ενεργοποιούνται τα Th2 λεμφοκύτταρα και αναπτύσσεται χυμική ανοσία, με αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων ύστερα από μια περίοδο επώασης που κυμαίνεται στο σκύλο από 3 μήνες έως και 7 χρόνια (ευαισθησία έναντι στη νόσο), (Slappendel and Ferrer, 1998; Barbiéri, 2006; Castellano et al., 2009).

## 2.5 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Η τυπική λεϊσμανίωση του σκύλου εκδηλώνεται ως μια χρόνια καχεξιογόνος νόσος με μείωση της όρεξης, εύκολη κόπωση, χωλότητα, αναιμία, δερματικές αλλοιώσεις, γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια, επίσταξη, ονυχογρύπωση, πυρετός, χρόνια κολίτιδα, αρθρίτιδα, οφθαλμικές και περιοφθαλμικές αλλοιώσεις και υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (Chapman and Hanson, 1984; Chang et al., 1985; Ferrer et al., 1991; Ciaramella et al., 1997; Blavier et al., 2001; Tafuri et al., 2001).

Η δερματική λεϊσμανίωση του σκύλου συνήθως εκδηλώνεται με δερματικές αλλοιώσεις χωρίς κνησμό, άτονα έλκη, δερματικά οζίδια, ενώ έχει περιγραφεί ότι εμφανίζεται αλωπεκία και αποφολιδωτική και φλυκταινώδης δερματίτιδα (Solano-Gallego et al., 2004; Ordeix et al., 2005). Η αποφολιδωτική δερματίτιδα είναι η πιο συχνή δερματική εκδήλωση της δερματικής λεϊσμανίωσης του σκύλου, με αναφερθείσα συχνότητα 56-91% (Koutinas et al., 1992; Ciaramella et al., 1997).

Η περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία, η απώλεια του σωματικού βάρους, η ηπατομεγαλία και η σπληνομεγαλία, περιλαμβάνονται επίσης στα κλινικά ευρήματα που εμφανίζονται αρκετά συχνά στην πράξη (Denerolle, 1996; Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Baneth et al., 2005).

Εντούτοις, η πλειοψηφία των σκύλων που είναι μολυσμένοι με *Leishmania* δεν εμφανίζουν κανένα από τα παραπάνω συμπτώματα (Moreno and Alvar, 2002; Barbiéri, 2006; Moshfe et al., 2009).

## 2.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Για τη θεραπεία της λεϊσμανίωσης του σκύλου χρησιμοποιούνται σήμερα τα ίδια φάρμακα με αυτά που χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο από τα μέσα του 20$^{ου}$ αιώνα. Τα φάρμακα πρώτης επιλογής είναι τα πεντασθενή αντιμονιακά, τα οποία έχουν αρκετές παρενέργειες και για τα οποία έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα του παρασίτου λόγω της ευρείας χρήσης τους. Η θεραπεία δεύτερης επιλογής περιλαμβάνει την αμφοτερικίνη Β και την πενταμυδίνη με παρόμοια μειονεκτήματα. Νεότερες προσεγγίσεις στη θεραπεία βασίζονται στη χορήγηση παραμομυκίνης και ιντερφερόνης-γ, ενώ πρόσφατα χρησιμοποιείται με επιτυχία η μιλτεφοσίνη (Alvar et al., 2004).

Επειδή η θεραπεία της λεϊσμανίωσης του σκύλου μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες πρέπει να εφαρμόζεται μόνο μετά από επιβεβαιωμένη διάγνωση. Πριν την έναρξη της θεραπείας είναι καλό να εκτιμάται η γενική κατάσταση του σκύλου και η επάρκεια της ηπατικής και της νεφρικής του λειτουργίας). Κατά τη διάρκεια της θεραπείας θα πρέπει να παρακολουθούνται η ηπατική, καρδιακή και νεφρική λειτουργία. Η ανταπόκριση στη θεραπεία είναι συνήθως γρήγορη. Λίγες μέρες μετά την έναρξη του θεραπευτικού σχήματος ο πυρετός υποχωρεί, το βάρος αυξάνει, η σπλαχνική διόγκωση και οι δερματικές αλλοιώσεις μειώνονται, οι αιματολογικές παράμετροι επανέρχονται σε φυσιολογικό επίπεδο, ενώ διαπιστώνεται συνήθως και μια γενικότερη βελτίωση στην κατάσταση του ζώου. Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας θα πρέπει να διενεργηθούν βιοχημικές, κλινικές και παρασιτολογικές εξετάσεις. Σκύλοι που έχουν θεραπευτεί θα πρέπει να εξετάζονται περιοδικά για τυχόν υποτροπή.

Είναι γνωστό ότι οι περισσότεροι σκύλοι παραμένουν μολυσμένοι και μετά το τέλος της θεραπείας (Miró et al., 2008). Ακόμα όμως και σε αντίθετη περίπτωση, η πιθανότητα αναμόλυνσης είναι πολύ μεγάλη εφόσον συνεχίζουν να ζουν σε περιοχή στην οποία το νόσημα ενζωοτεί (Gradoni, 2002; Miró et al., 2008).

## 2.7 ΕΛΕΓΧΟΣ-ΠΡΟΛΗΨΗ

Η πρόληψη για τη λεϊσμανίωση εξαρτάται από τα τοπικά επιδημιολογικά/επιζωοτιολογικά χαρακτηριστικά. Έτσι, σε περιοχές όπου οι σκνίπες είναι κυρίως ενδόφιλες (παραμένουν σε εσωτερικό χώρο μετά τη λήψη γεύματος) ο ψεκασμός εντός των σπιτιών με εντομοκτόνα είναι αρκετά αποτελεσματικός (Davies et al., 2000; Reyburn et al., 2000). Σε περιοχές όπου οι σκνίπες είναι ενδοφαγικές (τρέφονται κυρίως σε εσωτερικό χώρο) η χρήση κουνουπιέρων με οπές μικρής διαμέτρου στα κρεβάτια είναι πολύ αποτελεσματική (Bern et al., 2000). Ειδικά για τον σκύλο ο ψεκασμός με εντομοκτόνο και η εφαρμογή εντομοαπωθητικών περιλαιμίων χρησιμοποιούνται με καλά αποτελέσματα (Davies et al., 2003).

Στη Βραζιλία, τα σκυλιά θανατώνονται αν είναι θετικά στη *Leishmania* (Courtenay et al., 2002), αλλά αυτή η στρατηγική δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Σε ένα πιλοτικό πρόγραμμα στο νησί Έλβα της Ιταλίας, ο συνδυασμός της θανάτωσης και της θεραπείας μείωσε το ποσοστό των μολυσμένων σκύλων από 11.6% σε 4.6% σε δύο χρόνια (Gradoni et al., 1988).

Η πρόληψη της λεϊσμανίωσης με ένα αποτελεσματικό εμβόλιο δεν έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα. Η ασφάλεια και η απόδοση των ζωντανών εξασθενημένων και των νεκρών εμβολίων είναι αμφιλεγόμενη. Αρχικά υπήρξε προτίμηση στα νεκρά εμβόλια (δεκαετία του ’90), εξαιτίας των προβλημάτων ασφάλειας των ζωντανών εξασθενημένων εμβολίων. Οι πρόσφατες όμως εξελίξεις στο χειρισμό του γονιδιώματος της *Leishmania* υποδηλώνουν ότι είναι εφικτή η ανάπτυξη ζωντανών εξασθενημένων εμβολίων που να είναι επαρκώς ασφαλή (Handman, 2001).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται έρευνα για τη δημιουργία εμβολίων με χρήση νανοσωματιδίων, οι οποίες έχουν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι τα κατιονικά στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια μπορεί να αποτελέσουν ένα ιδανικό μέσο μεταφοράς των αντιγόνων της *Leishmania*, βελτιώνοντας παράλληλα την ανοσοποιητική απόκριση του ξενιστή (Doroud et al., 2011; Saljoughian et al., 2013).

Πρόσφατα κυκλοφόρησε στην Ελλάδα το πρώτο εμβόλιο για την πρόληψη της λεϊσμανίωσης του σκύλου. Το CaniLeish (Virbac) περιέχει τις πρωτεΐνες ESP (απεκκρινόμενες-εκκρινόμενες πρωτεΐνες), οι οποίες παράγονται από το παράσιτο και διευκολύνουν την προσβολή του κυττάρου από αυτό, τον επακόλουθο ενδοκυτταρικό πολλαπλασιασμό του και την καταστολή της ανοσιακής απόκρισης του ξενιστή. Το συγκεκριμένο εμβολιακό σκεύασμα έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την εμφάνιση των

κλινικών συμπτωμάτων σε ποσοστό 92% (Lemesre et al., 2007), αλλά δεν εμποδίζει τη μετάδοση του παρασίτου αφού το ζώο παραμένει μολυσμένο. Ένα από τα μειονεκτήματα του εμβολίου είναι ότι υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση του. Πρέπει να χορηγείται μόνο σε υγιείς σκύλους ηλικίας άνω των 6 μηνών, γεγονός που απαιτεί διαγνωστικό έλεγχο του σκύλου πριν τον εμβολιασμό, το οποίο σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος του εμβολίου δημιουργεί προβληματισμό.

## 2.8 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Οι εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης της λεϊσμανίωσης μπορεί να χωριστούν σε αυτές που αποσκοπούν στην ανίχνευση του παρασίτου (άμεσες) και στις ανοσολογικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση δεικτών της κυτταρική και χυμικής ανταπόκρισης του ξενιστή στη λοίμωξη (έμμεσες).

### 2.8.1 Ανίχνευση παρασίτου

Η απομόνωση του παρασίτου αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς στην εργαστηριακή διάγνωση της λεϊσμανίωσης εξαιτίας της υψηλής ειδικότητάς της (Herwaldt, 1999). Όμως, οι τεχνικές αυτής της κατηγορίας είναι πολύπλοκες και επεμβατικές γιατί συνήθως εφαρμόζονται σε δείγματα μυελού των οστών ή προϊόντος παρακέντησης λεμφαδένων.

#### 2.8.1.1 Μικροσκοπική εξέταση

Η διάγνωση βασίζεται στην παρατήρηση της αμαστιγωτής μορφής του παρασίτου σε βαμμένα επιχρίσματα λεμφογγαγλίων, μυελού των οστών ή σπλήνα. Η χρώση που χρησιμοποιείται κυρίως είναι η Giemsa, με την οποία το κυτταρόπλασμα του πρωτοζώου εμφανίζεται απαλό μπλε με ένα σχετικά μεγάλο πυρήνα ο οποίος βάφεται μωβ. Στο ίδιο επίπεδο με τον πυρήνα, δίπλα του βρίσκεται ένα πιο βαθύ μωβ μόρφωμα, ο κινετοπλάστης. Η μικροσκόπηση παρέχει τα πλεονεκτήματα της υψηλής ειδικότητας η οποία φθάνει το 100% και της δυνατότητας τιτλοποίησης του παρασίτου σε λογαριθμική κλίμακα (Chulay and Bryceson, 1983). Αλλά, όπως και όλες οι άλλες μέθοδοι μικροσκόπησης χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία, η

οποία κυμαίνεται μεταξύ 40-75% ανάλογα με το προς εξέταση υλικό, το παρασιτικό φορτίο και το επίπεδο εξειδίκευσης του προσωπικού που εφαρμόζει την τεχνική.

### 2.8.1.2 Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια για την απομόνωση της *Leishmania* spp. γίνεται σε ειδικά καλλιεργητικά υλικά (NNN και RPMI) και αποτελεί μια δύσκολη και χρονοβόρα τεχνική, της οποία η επιτυχία εξαρτάται από την τεχνική κατάρτιση του προσωπικού.

Στις καλλιέργειες των θετικών δειγμάτων είναι πιθανή η ανίχνευση του πρωτοζώου από την πρώτη εβδομάδα επώασης των θρεπτικών υλικών στους 26 $^{o}$C. Καλλιέργειες στις οποίες δεν ανιχνεύεται ανάπτυξη του μικροβίου εντός διαστήματος ενός μηνός, θεωρούνται αρνητικές.

Η ευαισθησία της καλλιέργειας για απομόνωση της *Leishmania* spp. είναι αυξημένη κατά 20% σε σχέση με τη μικροσκόπηση, αλλά η δυσκολία απομόνωσης στελέχους, η καθυστέρηση στην ανάδειξη του αποτελέσματος και η συχνότητα των επιμολύνσεων καθιστούν τη μέθοδο δύσχρηστη.

### 2.8.1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Ανάμεσα στις μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εργαστηριακή διάγνωση, η PCR έχει αποδειχθεί ότι είναι η πιο ευαίσθητη και ειδική μέθοδος, εντούτοις η χρήση της περιορίζεται συνήθως σε εργαστήρια αναφοράς. Η ειδικότητα της PCR ποικίλει ανάλογα με της περιοχής-στόχου που επιλέγεται κάθε φορά. Η PCR έχει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με παραδοσιακές τεχνικές γιατί είναι εξαιρετικά ευαίσθητη, γρήγορη, έχει πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης και μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα είδη κλινικών δειγμάτων (Tavares et al., 2003). Αντίθετα με τις ορολογικές μεθόδους, στην PCR δεν απαιτούνται ειδικά αντιδραστήρια ανάλογα με το είδος του ξενιστή, αλλά τα αντιδραστήρια είναι ίδια τόσο για τον άνθρωπο όσο και τον σκύλο και για τους υπόλοιπους ξενιστές (Schallig and Oskam, 2002). Κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι με την PCR μπορεί να ανιχνεύθει παρασιταιμία μερικές βδομάδες πριν την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων (Martin-Sanchez et al., 2004; Riera et al., 2004). Στην PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες περιοχές στόχοι. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι το 18S-rRNA, η μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (small subunit rRNA/SSU rRNA), μια επαναλαμβανόμενη γονιδιωματική αλληλουχία του DNA, το γονίδιο της β-τουμπουλίνης, ενδιάμεσα

μεταγραφόμενα διαστήματα (internal transcribed spacer/ITS regions), μικροδορυφορικές αλληλουχίες και το DNA του κινετοπλάστη (Pizzuto et al., 2001; Wortman et al., 2001; Gangneux et al., 2003; da Silva et al., 2004). Τα είδη δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στην PCR είναι ο μυελός των οστών, επιχρίσματα λεμφογαγγλίων, βιοψία δέρματος και δείγματα αίματος (Otero et al., 2000; Liarte et al., 2001; Pizzuto et al., 2001; Wortman et al., 2001; de Oliveira et al., 2003; Gangneux et al., 2003; da Silva et al., 2004; Gannavaram et al., 2004; Martin-Sanchez et al., 2004). Η ειδικότητα της PCR σε δείγματα μυελού των οστών έχει αναφερθεί ότι φθάνει το 100% (Martin-Sanchez et al., 2004)**,** ενώ η ευαισθησία της κυμαίνεται από 80 έως 93.3%, συγκρινόμενη με το 50-60 % της ευαισθησίας της καλλιέργειας (Tavares et al., 2003).

Οι χρόνια ασθενείς με δερματική λεϊσμανίωση αποτελούν τη μεγαλύτερη διαγνωστική πρόκληση γιατί συνήθως δεν παρουσιάζουν κάποια τυπική εικόνα της νόσου. Συνήθως έχουν χαμηλό ή μηδενικό τίτλο αντισωμάτων έναντι της *Leishmania* και γι’ αυτό οι ορολογικές μέθοδοι δεν βοηθούν στην εντόπισή τους. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η PCR έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί το πιο σημαντικό εργαλείο για διάγνωση. Η ευαισθησία της PCR στη δερματική λεϊσμανίωση έχει βρεθεί ότι είναι 100% (de Oliveira et al., 2003). Μια σχετικά πρόσφατη ανάπτυξη στην τεχνολογία της PCR, η PCR αληθούς χρόνου (real time PCR) έχει αυξημένη ειδικότητα και εξασφαλίζει την άμεση ανάγνωση του αποτελέσματος. Σ’ αυτήν την τεχνική προστίθεται ένας ανιχνευτής (probe), ο οποίος φέρει στα άκρα του δύο χημικές ενώσεις, μία που παράγει φθορισμό και μία που τον απορροφά. Όσο ο ανιχνευτής είναι ανέπαφος, οι δύο χημικές ενώσεις βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη και η παραγωγή φθορισμού καταστέλλεται. Όταν ο ανιχνευτής υβριδίσει με την αλληλουχία στόχο και ενσωματωθεί στο παραγόμενο αντίγραφο, οι δύο χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα άκρα του αποδεσμεύονται και απομακρύνονται η μία από την άλλη, παράγοντας φθορισμό που μπορεί να ανιχνευθεί από ειδικά όργανα. Καθώς αυξάνονται τα παραγόμενα αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, αυξάνονται και τα μόρια της φθορίζουσας χημικής ένωσης που αποδεσμεύονται και το σήμα φθορισμού ενισχύεται. Όμως η μέθοδος απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και ακριβό εξοπλισμό.

## 2.8.2 Ορολογικές Μέθοδοι

Η ορολογική διάγνωση της λεϊσμανίωσης βασίζεται στην ανίχνευση της ειδικής χυμικής απόκρισης. Υπάρχει μεγάλος αριθμός ορολογικών δοκιμών, οι οποίες διαφέρουν σε ευαισθησία και ειδικότητα.

### 2.8.2.1 Ενδοδερμική δοκιμή με λεϊσμανίνη (Leishmanin skin test /LST)

Η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της δερματικής μορφής της λεϊσμανίωσης και μπορεί να μετρηθεί με το Leishmanin test (LST), γνωστό και ως αντίδραση Montenegro. Η δοκιμή αυτή βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της δερματικής αντίδρασης μετά από ενδοδερμική έγχυση εναιωρήματος νεκρών προμαστιγωτών. Μετά από 24-48 ώρες παρατηρείται η περιοχή της έγχυσης και μετράται η δερματική διόγκωση. Το LST θεωρείται θετικό όταν το πάχος του δέρματος στο σημείο της έγχυσης είναι μεγαλύτερο από 5 mm. Μειονεκτήματα της δοκιμής είναι ότι παραμένει θετική και μετά την ίαση (Mauel and Behin, 1982), δεν αποτελεί ακριβή ποσοτική μέθοδο, εκθέτει τον εξεταζόμενο οργανισμό σε λεϊσμανιακά αντιγόνα και υπάρχει η πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης (Alvar et al., 2004).

### 2.8.2.2 Δοκιμή Έμμεσου ανοσοφθορισμού (Indirect Fluorescent Antibody Test, IFAT)

Είναι μια από τις πιο διαδεδομένες δοκιμές για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *Leishmania*. Βασίζεται στη χρήση μονιμοποιημένων προμαστιγωτών και θεωρείται ως η μέθοδος αναφοράς των ορολογικών τεχνικών (Alvar et al., 2004). Η δοκιμή βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων τα οποία εμφανίζονται στον ορό του αίματος σε πολύ πρώιμο στάδιο της μόλυνσης και δεν είναι ανιχνεύσιμα 6-9 μήνες μετά τη θεραπεία (Srivastava et al., 2011). Η ευαισθησία της IFAT κυμαίνεται από 28.4% (Boelaert et al., 2004) έως 86.6% (Iqbal et al., 2002), ενώ υπάρχει και πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης με το *Trypanosoma* (Boelaert et al., 2004; Singh et al., 2005).

### 2.8.2.3 Δοκιμή οροσυγκόλλησης (Direct agglutination test, DAT)

Είναι μια δοκιμή με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Είναι χαμηλού κόστους, απλή στην εφαρμογή και κατάλληλη για χρήση στο εργαστήριο αλλά και σε εξωτερικό χώρο. Έχει βρεθεί σε διάφορες μελέτες ότι η ευαισθησία της DAT είναι 91-100% και η ειδικότητά της 72-100 % (Liarte et al., 2001; Tavares et al., 2003). Για πολύ καιρό παρέμενε η μέθοδος επιλογής σε περιοχές με ανεπαρκείς οικονομικούς πόρους. Στη μέθοδο χρησιμοποιούνται ολόκληρα βαμμένα προμαστιγωτά είτε ως εναιώρημα είτε κατεψυγμένα και μπορεί να εφαρμοστεί σε πλάσμα και ορό αίματος. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο μεγάλος χρόνος επώασης (18 ώρες) και ότι απαιτούνται διαδοχικές αραιώσεις του αίματος ή του ορού. Επίσης η DAT δεν έχει καμία προγνωστική αξία για την εκτίμηση της πορείας της θεραπείας, αφού μπορεί να παραμείνει θετική για πολλά χρόνια μετά το πέρας της θεραπείας. Την τελευταία δεκαετία έχει αναπτυχθεί μια τροποποιημένη μέθοδος DAT (Fast Agglutination Screening Test, FAST) για την άμεση ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *Leishmania* σε δείγματα ορού και σε αίμα συλλεγμένο πάνω σε διηθητικό χαρτί (Schoone et al., 2001). Η δοκιμή FAST απαιτεί μόνο μία αραίωση του ορού και παρέχει ποσοτικά αποτελέσματα χωρίς να απαιτείται πολύωρη επώαση του δείγματος. Επίσης, παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής DAT, μιας και βασίζεται στη χρήση κατεψυγμένου αντιγόνου το οποίο έχει μεγαλύτερη αντιγονική σταθερότητα, προσδίδει καλύτερη επαναληψιμότητα, ειδικότητα και ευαισθησία (Singh, 2006).

### 2.8.2.4 Ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzyme-linked-immuno-sorbent assay, ELISA)

Αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο και μία από τις πιο ευαίσθητες δοκιμές για την ορολογική διάγνωση της σπλαχνικής λεϊσμανίωσης (Srivastava et al., 2011). Η μέθοδος είναι χρήσιμη για εργαστηριακή ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Έχοντας το πλεονέκτημα του αυτοματισμού, η ELISA μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα και είναι κατάλληλη για χρήση με διάφορα αντιγόνα. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της ELISA επηρεάζεται σημαντικά από το αντιγόνο που χρησιμοποιείται.

#### 2.8.2.5 Μέθοδοι γρήγορες ανίχνευσης αντισωμάτων

Σε πολλές από τις περιοχές του κόσμου που η λεϊσμανίωση είναι ενδημική, οι οικονομικοί πόροι είναι περιορισμένοι και ο εργαστηριακός εξοπλισμός ελλιπής. Για αυτό το λόγο, αλλά και για την ικανοποίηση της ανάγκης μίας πρώτης εκτίμησης σε κλινικό επίπεδο έχουν αναπτυχθεί δύο δοκιμές ανίχνευσης αντισωμάτων για επιτόπου χρήση, οι οποίες βασίζονται στην τεχνολογία της μεμβρανικής διήθησης. Η πρώτη (InBios, USA) βασίζεται στη χρήση του ανασυνδυασμένου αντιγόνου Lc-rK39 του γονιδίου της κινεσίνης της *L. chagasi*, ενώ η άλλη (Span Diagnostic Limited, India) σε αυτή του ανασυνδυασμένου αντιγόνου Ld-rKE-16 του γονιδίου της κινεσίνης της *L. donovani*.

Επίσης, διατίθεται στο εμπόριο μία δοκιμή για την γρήγορη ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων σε δείγμα ορού ή πλάσματος ανθρώπου χρησιμοποιώντας κολλοειδή χρυσό (SD BIOLINE Leishmania Ab, Standard Diagnostics Inc., Korea). Η δοκιμή βασίζεται στη χρήση μίας μεμβράνης η οποία είναι επικαλυμμένη με το σύμπλοκο του αντιγόνου της *Leishmania* και του κολλοειδούς χρυσού. Αν υπάρχουν αντισώματα στο δείγμα, αυτά αντιδρούν με το σύμπλοκο του αντιγόνου-κολλοειδούς χρυσού και καθώς το υγρό μετακινείται τριχοειδικά κατά μήκος της μεμβράνης, δημιουργείται χρωματογραφικά μια γραμμή ορατή διά γυμνού οφθαλμού εντός 10-15 λεπτών.

## 2.9 ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Η λεϊσμανίωση είναι μια ασθένεια με παγκόσμια εξάπλωση, η οποία ενδημεί σε 98 χώρες κυρίως της Αφρικής, Ασίας, Μέσης Ανατολής, Μεσογείου, Κεντρικής και Νότιας Αμερικής. Η Αυστραλία και ο Νότιος Ειρηνικός δεν θεωρούνται περιοχές όπου η λεϊσμανίωση ενδημεί (Hsia, 2009). Περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων της δερματικής λεϊσμανίωσης απαντώνται στο Ιράν, Αφγανιστάν, Συρία, Σαουδική Αραβία, Βραζιλία και Περού (Choi and Lerner, 2001) ενώ της σπλαχνικής μορφής της νόσου στην Ινδία, Μπαγκλαντές, Νεπάλ, Σουδάν και Βραζιλία (Desjeux, 2004).

Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 1.5 εκατομμύριο νέες περιπτώσεις δερματικής λεϊσμανίωσης κάθε χρόνο και 0.5 εκατομμύριο σπλαχνικής. Παρόλο που η δερματική μορφή είναι διαδεδομένη σε παγκόσμια κλίμακα πολλές φορές περιορίζεται σε τοπικό επίπεδο λόγω των ειδικών περιβαλλοντικών συνθηκών που είναι απαραίτητες για την

επιβίωση του φλεβοτόμου και των διαφόρων ξενιστών. Νέες εστίες λεϊσμανίωσης έρχονται στο προσκήνιο εξαιτίας αλλαγών στην οικολογία και στο φυσικό περιβάλλον του φορέα που προκαλούνται από την αποψίλωση των δασών και την αστικοποίηση (World Health Organization, 2010; Desjeux, 2004). Για το λόγο αυτό η νόσος έχει εξαπλωθεί σε περιοχές που δεν ήταν ενδημικές όπως είναι η πολιτεία του Τέξας στην Αμερική (Wright et al., 2008).

Έχει αναφερθεί ότι τουλάχιστον 20 είδη και υποείδη της *Leishmania* είναι μολυσματικά για τον άνθρωπο. Πολλά από αυτά συνδέονται με υψηλή θνησιμότητα και είναι υπεύθυνα για ένα μεγάλο εύρος κλινικών συμπτωμάτων. Η ακριβής διάγνωση της ασθένειας είναι πολύ σημαντική για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και τη μείωση των επιπλοκών που προκαλούνται από αυτή.

Στη Γερμανία το 2000 δημιουργήθηκε Κέντρο Αναφοράς για τη λεϊσμανίωση λόγω της πιθανής αύξησης των περιπτώσεων της νόσου που αναμένεται ως αποτέλεσμα της αύξησης της θερμοκρασίας και της συχνής προσβολής των ασθενών με AIDS.

## 2.10 Η ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί, οι μολυσματικές ασθένειες θεωρούνται και σήμερα βασική αιτία απειλής της σωματικής ακεραιότητας του ανθρώπου και συχνά θανάτου. Το πρόβλημα είναι πιο έντονο στις χώρες που δεν έχουν τη δυνατότητα να βρουν τα οικονομικά μέσα που χρειάζεται η εφαρμογή δραστικών μέτρων ελέγχου. Η κατάσταση είναι παρόμοια και αναφορικά με την υγεία των ζώων που ενοχοποιούνται για τη μετάδοση των παθογόνων στον άνθρωπο είτε άμεσα, είτε μέσω της τροφικής αλυσίδας. Εξαιτίας του κοινωνικού και οικονομικού αντίκτυπου των μολυσματικών ασθενειών, η διεθνής έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μεθόδων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Η σημασία της έννοιας «βελτιωμένα χαρακτηριστικά» μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την εφαρμογή που στοχεύεται, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η υψηλή επαναληψιμότητα, η ευαισθησία και η ειδικότητα σε συνδυασμό με την ταχύτητα είναι τα κυριότερα κριτήρια αξιολόγησης κάθε καινούργιας μεθόδου. Μετά τη δεκαετία του ’80 η χρήση της μοριακής βιολογία κάλυπτε τις απαιτήσεις της ανάπτυξης αυτών των μεθόδων. Με τη χρήση τεχνικών όπως η PCR, η real time PCR, η PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) και ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA, έχει

βελτιωθεί σημαντικά η ταχύτητα και η ακρίβεια της μικροβιακής διάγνωσης. Εντούτοις, η αξιόπιστη εφαρμογή αυτών των μεθόδων απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, ακριβά μηχανήματα και εργαστηριακό χώρο αποκλειστικής χρήσης. Το τελευταίο εφαρμόζεται λόγω των προφυλάξεων που απαιτούνται για αποφυγή επιμολύνσεων, οι οποίες λόγω του πολλαπλασιασμού του DNA που πραγματοποιείται στην PCR μπορεί εύκολα να αποτελέσει την αιτία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ακόμα και με την παρουσία μικρής ποσότητας DNA στόχου.

Πρόσφατες εξελίξεις στη νανοτεχνολογία καθιστούν δυνατή τη δημιουργία συστημάτων με διαστάσεις ίσες περίπου με αυτές του ατόμου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη των βιολογικών διαδικασιών. Η νανοδιαγνωστική επιτρέπει μια πιο αποτελεσματική αλληλεπίδραση με τα βιολογικά μόρια επειδή οι απλοί αναλύτες μπορούν να εισχωρήσουν μεταξύ του μορίου-στόχου και του τμήματος που παράγει σήμα. Περισσότερες και πιο βελτιωμένες τεχνικές γίνονται διαθέσιμες και έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν μικρότερες ποσότητες βιολογικού υλικού ακόμα και χωρίς την ανάγκη της ενίσχυσης. Εξαιτίας των μοναδικών χημικών, οπτικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων, οι νανο-ανιχνευτές είναι κατάλληλοι για λεπτομερή ανάλυση υποδοχέων, πόρων και άλλων συστατικών των ζωντανών κυττάρων. Μπορούν να συνδεθούν με ολιγονουκλεοτίδια, αντισώματα και πεπτίδια, επιτρέποντας πολλαπλή σήμανση ή την ανίχνευση πολλαπλών στόχων στο πλαίσιο διαγνωστικών εφαρμογών σχεδιασμένων να αναγνωρίζουν το γενετικό ή το ανοσιακό αποτύπωμα ενός παθογόνου.

### 2.10.1 Ιδιότητες των νανοσωματιδίων

Ο όρος νανοσωματίδια χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει μόρια με διαστάσεις μικρότερες από 100 nm. Σε αντιδιαστολή με τα μεγαλύτερα υλικά σώματα τα οποία παρουσιάζουν μια συγκεκριμένη φυσική συμπεριφορά ανεξάρτητα μεγέθους, τα νανοσωματίδια μπορεί συχνά να παρουσιάσουν διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με το μέγεθος και το ποσοστό των ατόμων που βρίσκονται στην επιφάνειά τους. Συνεπώς, τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν μια "απροσδόκητη συμπεριφορά", αλλιώς καλούμενη κβαντική επίδραση, που επηρεάζει τα οπτικά, ηλεκτρικά, χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα η μεγάλη επιφάνειά τους αναλογικά με τον όγκο τους, τους δίνει μοναδικές ιδιότητες όταν χρησιμοποιούνται σε διαλύματα δεδομένου ότι έχουν πολύ ισχυρή τάση διάχυσης ενώ συγχρόνως ανθίστανται στην καθίζηση ή την επίπλευση. Όσον αφορά τα οπτικά χαρακτηριστικά

τους ένα ενδιαφέρον γνώρισμα των ημιαγωγών νανοσωματιδίων είναι ότι το ελάχιστο ποσό ενέργειας που απαιτείται για την απελευθέρωση ενός εξωτερικού ηλεκτρονίου από τον πυρήνα του μορίου τους, γίνεται πάλι μεγεθο-εξαρτώμενο, το οποίο μεταφράζεται σε μια μετατροπή χρώματος από κόκκινο στο μπλε όσο μειώνεται το μέγεθος των μορίων (Alivisatos, 2008). Αυτά τα κολλοειδή μόρια μπορεί να ενεργήσουν σαν νανοπομποί που διεγείρονται από μια απλή πηγή φωτός.

Ανάλογα με τις ιδιότητες του υλικού που ενδιαφέρεται κάποιος να χρησιμοποιήσει υπάρχει μεγάλος αριθμός μετάλλων ή πολυμερών νανοσωματιδίων για να επιλέξει. Τα τελευταία χρόνια, η νανοδιαγνωστική έχει εστιάσει περισσότερο στα κολλοειδή χρυσά και κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου που φαίνεται να είναι πολύ ελπιδοφόρα όσον αφορά την ανίχνευση παθογόνων.

Τα κολλοειδή νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) κυμαίνονται σε διάμετρο από 1-100 nm, είναι σταθερά, ομοιόμορφα και μπορεί να παραχθούν εύκολα με διάφορες μεθόδους μεταξύ των οποίων η μείωση κιτρικού άλατος του τετραχλωροχρυσικού οξέος. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια (NPs) παρουσιάζουν ισχυρή μεγεθο-εξαρτώμενη οπτική ιδιοσυχνότητα, ικανή να εκπέμψει κοντά στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος, το οποίο είναι γενικά γνωστό ως συντονισμός των πλασμονίων επιφανείας (plasmon surface resonance/SPR), (Jain et al., 2008). Το SPR είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον σε σχέση με τα Au (αλλά και ασημένια (Ag)) NPs. Κατά τη φωτοενεργοποίηση, τα πλασμόνια συνδέονται με το απορροφούμενο φως και προκαλούν τεράστια αύξηση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου (EM) στα μεταλλικά NPs. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του επαγόμενου φωτός και των ταλαντευόμενων ηλεκτρικών πεδίων οδηγούν στη διασπορά και την απορρόφηση του φωτός. Η αύξηση του τοπικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου λόγω της σύνδεσης των ταλαντευόμενων ηλεκτρικών πεδίων στα μεταλλικά NPs με το επαγόμενο φως τα καθιστά ελκυστικά για εφαρμογές σε οπτικές συσκευές (Pissuwan et al., 2010).

Τα AuNPs είναι φορτισμένα αρνητικά και είναι πολύ ευαίσθητα στις αλλαγές της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύματος εντός του οποίου βρίσκονται (Niemeyer and Mirkin, 2004). Αυτή η ευαισθησία είναι σημαντική από την άποψη της πιθανής εφαρμογής τους στις διαγνωστικές τεχνικές, δεδομένου ότι για τα τυπικά κιτρικά σταθεροποιημένα σωματίδια η προσθήκη NaCl εξουδετερώνει το φορτίο της επιφάνειάς τους και μπορεί να προκαλέσει μείωση στην απόσταση μεταξύ τους. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εκλεκτική κατακρήμνιση των AuNPs που θα εκδηλωθεί τελικά με αλλαγή του χρώματος του διαλύματος ανιχνεύσιμη διά γυμνού οφθαλμού (Niemeyer and Mirkin, 2004). Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί από τη

σύνδεση δύο ή περισσότερων (χημικά τροποποιημένων για την σύνδεση) AuNPs σε ένα μόριο-στόχο DNA, το οποίο οδηγεί σε κατακρήμνιση επειδή μειώνει την απόσταση μεταξύ των σωματιδίων.

Ανάλογα με την εφαρμογή που αναπτύσσεται, οι ιδιότητες των AuNPs έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή διαφορετικών μηχανισμών ανίχνευσης π.χ. οπτική παρακολούθηση της αλλαγής του χρώματος ή μέτρηση της οπτικής απορρόφησης. Σε όλες τις περιπτώσεις, η βασική ιδέα είναι ότι στα διαλύματα, τα μονοδιάστατα AuNPs εμφανίζονται κόκκινα και παρουσιάζουν μια σχετικά περιορισμένη ζώνη απορρόφησης των πλασμονίων επιφανείας που τοποθετείται περίπου στα 520 nm στο UV ορατό φάσμα. Σε αντίθεση, ένα διάλυμα που περιέχει κατακρημνισμένα AuNPs εμφανίζει ιώδες χρώμα που αντιστοιχεί σε μια χαρακτηριστική αλλαγή χρώματος λόγω του συντονισμού των πλασμονίων επιφανείας των σωματιδίων από 520 nm σε 574 nm. Τα κολλοειδή ασημένια και χρυσά νανοσωματίδια προσφέρουν μερικές μοναδικές ιδιότητες όπως το ότι δεν διασπώνται, κάτι που είναι ένα κοινό πρόβλημα με τη χρήση των συμβατικών ουσιών φθορισμού. Επιπλέον, δεν είναι τοξικά, είναι σταθερά και μπορούν να αποθηκευτούν και σε ξηρή κατάσταση. Επομένως η χρήση αυτών των νανοσωματιδίων ως βιοανιχνευτές στηρίζεται είτε στη μετατόπιση της απορρόφησής τους ή στην οπτική ανίχνευση της προκύπτουσας αλλαγής χρώματος.

Οι κρυσταλλικοί ημιαγωγοί ή επίσης γνωστοί ως κβαντικά κοκκία (QDs) είναι ημιαγωγοί με φυσικές διαστάσεις μικρότερες από τη εξιτονική ακτίνα του Bohr (Buhro and Colvin, 2003). Αν και εξαρτάται από το υλικό που χρησιμοποιείται για την κατασκευή αυτών των νανοσωματιδίων, η εξιτονική ακτίνα του Bohr για τα QDs είναι μερικά νανόμετρα. Σήμερα, τα μέταλλικά και ο ημιαγωγικά νανοσωματίδια μεγέθους 2-6 nm παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ομοιότητας των διαστάσεών τους με τα βιολογικά μακρομόρια όπως τα νουκλεϊκά οξέα και τις πρωτεΐνες.

Οι κολλοειδείς ημιαγωγικοί νανοκρύσταλλοι μπορεί να παραχθούν χρησιμοποιώντας διάφορους ημιαγωγούς συμπεριλαμβανομένου του σεληνιούχου καδμίου (CdSe), σουλφίδικού καδμίου (CdS), αρσενικού ινδίου (InAs), φωσφιδικού ινδίου (InP) και σουλφίδικού μολύβδου (PbS). Αυτά τα υλικά παρουσιάζουν μέγεθο-εξαρτώμενο φθορίζο-εκπεμπόμενο μήκος κύματος, το οποίο είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των QDs που είναι σημαντικό για τη χρήση τους ως βιοανιχνευτές. Όταν ένα φωτόνιο του ορατού φωτός χτυπά έναν τέτοιο ημιαγωγό μερικά από τα ηλεκτρόνιά του μεταπηδούν σε υψηλότερες ενεργειακές στοιβάδες. Ένα φωτόνιο μιας χαρακτηριστικής συχνότητας αυτού του υλικού εκπέμπεται όταν

επιστρέφουν στη βασική στοιβάδα τους. Η δυνατότητα των QDs να απελευθερωθούν φωτόνια μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους τύπους "περιβλημάτων". Πιο συγκεκριμένα, η επιφάνεια των QDs περιέχει μη ακτινοβολούσες ανασυνδυασμένες περιοχές. Σε αυτές τις περιοχές όταν επιστρέφει ένα ηλεκτρόνιο από την επαγωγική στοιβάδα, εκπέμπει την πλεονάζουσα ενέργεια υπό μορφή θερμότητας αντί φωτονίων. Με άλλα λόγια αυτές οι περιοχές προκαλούν απώλεια οπτικού σήματος, το οποίο μπορεί να αποφευχθεί εάν παθητικοποιηθούν (εμποδίζονται) με ανόργανα περιβλήματα (Alivisatos, 1996). Σε αυτήν την περίπτωση όλα τα διεγερμένα ηλεκτρόνια θα απελευθερώσουν φωτόνια με την επιστροφή τους στη στοιβάδα σθένους τους. Το περίβλημα καθιστά τα QDs πιο φωτεινά και περισσότερο ευαίσθητα αφού χρειάζονται λιγότερη ενέργεια προκειμένου να διεγερθούν. Για παράδειγμα ένα περίβλημα ZnS γύρω από έναν πυρήνα CdSe οδηγεί στην κατασκευή ενός πολύ φωτεινότερου QD (Dabbousi et al., 1997). Ένα άλλο συχνά χρησιμοποιούμενο υλικό για επικάλυψη των QDs είναι το διοξείδιο του πυριτίου (Parak et al., 2002). Το περίβλημα αυτού του είδους που είναι ανθεκτικό στην οξείδωση έχει διερευνηθεί ευρέως διότι είναι λιγότερο τοξικό και προσδίδει βιοσυμβατότητα στα QDs. Επιπλέον, η επιφάνεια του πυριτίου μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί για να συνδεθεί με βιοσύμπλοκα όπως η αβιδίνη.

Η κάλυψη των QDs είναι πολύ σημαντική για ακόμα έναν λόγο, ο ανόργανος πυρήνας-περίβλημα των ημιαγωγών νανοκρυστάλλων μόλις προετοιμαστεί, είναι διαλυτός μόνο σε μη πολικούς διαλύτες. Τα νανοσωματίδια για να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικές εφαρμογές πρέπει να είναι διαλυτά στα υδατικά διαλύματα και αυτό απαιτεί μια επιπρόσθετη υδρόφιλη επικάλυψη μετά τη σύνθεση του πυρήνα/περιβλήματος των κβαντικών κοκκίων. Διατίθεται σήμερα ένα ευρύ φάσμα μορίων τα οποία μπορεί να λειτουργήσουν ως επικάλυψη της επιφάνειας των QDs προκειμένου να αυξήσει τη διαλυτότητά τους. Τέτοιες είναι οι θειϊκές ενώσεις και το πυρίτιο.

Εν περιλήψη, ένα περίβλημα είναι ένα πολύ σημαντικό συστατικό των QDs, δεδομένου ότι θα προστατεύσει τον πυρήνα από την οξείδωση, θα ελαχιστοποιήσει ή θα εξαλείψει την τοξικότητα του πυρήνα και θα αυξήσει τη διαλυτότητά τους στο νερό. Τα QDs που κατασκευάζονται με αυτόν τον τρόπο μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως βιοανιχνευτές σε υγρά ή υγροποιημένα παρασκευάσματα όπως το DNA που έχει απομονωθεί από κλινικά δείγματα.

Η ενέργεια κενής ζώνης των διαφορετικών QDs καθορίζει το χρώμα του εκπεμπόμενου φωτός καθιστώντας τα ιδανικά για την ανάπτυξη δοκιμών ταχείας

διάγνωσης που βασίζονται στην ανίχνευση χρώματος. Όπως αναφέρεται παραπάνω όσο μεγαλύτερο είναι το QD τόσο πιο κόκκινο (χαμηλότερη ενέργεια) είναι το μέγιστο του φθορισμού του και κατά συνέπεια το ενεργειακό φάσμα του QD μπορεί να προσαρμοστεί βάσει του μεγέθους του (Alivisatos, 1996). Τα κβαντικά κοκκία CdSe μπορεί να κατασκευαστούν για να εκπέμπουν φως μήκους κύματος μεταξύ 450 και 650 nm, τα κοκκία CdTe φως μήκους κύματος 500 έως 750 nm, ενώ τα κοκκία InAs ή PbSe μπορεί να εκπέμπουν φως μήκους κύματος πάνω από 800 nm (Michalet et al., 2005). Η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων (QDs διαφορετικού μεγέθους συνδεδεμένα με βιομόρια που υβριδίζουν στο συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο ή το πεπτίδιο) σε διαφορετικά μήκη κύματος με ένα ενιαίο μήκος κύματος διέγερσης είναι μια επιπλέον δυνατότητα των QDs.

Αυτά τα νανοσωματίδια αποδεικνύονται ανώτεροι βιοανιχνευτές σε σύγκριση με τις παραδοσιακές οργανικές χρωστικές δεδομένου ότι είναι πολύ φωτεινότερα και σταθερότερα. Εκτιμάται ότι τα QDs είναι 20 φορές φωτεινότερα και 100 φορές σταθερότερα από τους παραδοσιακούς ανιχνευτές φθορισμού (Weissleder, 2001).

## 2.11 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Είναι γνωστό ότι η λεϊσμανίωση αποτελεί μία σοβαρότατη ζωονόσο που πλήττει κυρίως τα ζώα συντροφιάς και προκαλεί εκατομμύρια θύματα ετησίως. Η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση είναι καθοριστικής σημασίας στην εφαρμογή στοχευμένης θεραπείας και μειώνει τον κίνδυνο μετάδοσης συμβάλλοντας στον περιορισμό των κρουσμάτων, τη γεωγραφική εξάπλωση της νόσου και την αύξηση της πιθανότητας μόλυνσης ανθρώπων. Η περιοδική παρουσία του πρωτόζωου στο αίμα και η δημιουργία ζώων-φορέων περιπλέκουν τη διάγνωση της λεϊσμανίωσης. Η εφαρμογή βιονανοσυστημάτων θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στη βελτίωση της διάγνωσης της νόσου καθώς τα δομικά συστατικά των μεθόδων αυτών μπορούν να αυξήσουν την ευαισθησία και την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. **Σκοπός** της παρούσας μελέτης είναι να αναπτυχθεί μια εύκολα εφαρμόσιμη, γρήγορη, ειδική και αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης της *Leishmania* spp. χρησιμοποιώντας κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου και νανοσωματίδια χρυσού.

# 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 3.1 ΥΛΙΚΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν αξιολογήθηκαν σε δύο είδη υλικών, μικροβιακά στελέχη απομονωμένα από καλλιέργεια και κλινικά δείγματα. Τα πρώτα αποτελούνταν από καλλιεργημένα στελέχη (n=15) *Leishmania* spp. που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, και από άλλα παθογόνα (n=40) που ανευρίσκονται συνήθως σε σκύλους και είναι γενετικά συγγενείς με τη *Leishmania* spp., τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (Πίνακας 2).

Οι μέθοδοι PCR που αξιολογήθηκαν δοκιμάστηκαν επίσης σε κλινικά δείγματα (n=86) ολικού αίματος (n=76), βιοψίας λεμφογαγγλίων (n=5) και μυελού των οστών (n=5), ενώ η μέθοδος για την ανίχνευση DNA με AuNPs-probe δοκιμάστηκε σε 20 από τα παραπάνω κλινικά δείγματα ολικού αίματος, τα οποία συλλέχθηκαν από σκύλους που προσκομίστηκαν σε κτηνιατρικές κλινικές της ευρύτερης γεωγραφικής περιοχής της Αθήνας και της Κρήτης με υποψία λεϊσμανίωσης, κατά την περίοδο 2009-2012. Τα 32 από τα 86 δείγματα είχαν ελεγχθεί και με τη δοκιμή του έμμεσου ανοσοφθορισμού στο πλαίσιο της κλινικής διερεύνησης των αντίστοιχων περιστατικών. Το κάθε δείγμα σημάνθηκε αμέσως μετά τη συλλογή του με έναν κωδικό αριθμό και αποθηκεύτηκε σε δοχεία ψύξης έως τη μεταφορά του στο εργαστήριο.

| ΕΙΔΟΣ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ |
|---|---|
| **Θετικοί μάρτυρες** | |
| *L. infantum* | 10 |
| *L. infantum MON-1* | 1 |
| *L. infantum MON-98* | 1 |
| *L. donovani MON-37* | 1 |
| *L. tropica* | 1 |
| *L. major* | 1 |
| **Σύνολο** | **15** |
| **Αρνητικοί μάρτυρες** | |
| *Trypanosoma brucei brucei* | 1 |
| *Ehrlichia canis* | 6 |
| *Ehrlichia equi* | 2 |
| *Babesia* spp. | 4 |
| *Theilleria* spp. | 3 |
| *Brucella* spp. | 5 |
| *Toxoplasma gondii* | 4 |
| *Escherichia coli* | 10 |
| *Salmonella* spp. | 5 |
| **Σύνολο** | **40** |

**Πίνακας 2:** Στελέχη απομονωμένα σε καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες.

## 3. 2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

### 3.2.1 Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος και μυελού των οστών

Η απομόνωση του DNA έγινε με εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη μέθοδο (NucleoSpin Tissue kit Macherey-Nagel, Düren, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες

του κατασκευαστή. Σε 200 μl αίματος ή μυελού των οστών προστέθηκαν 25 μl πρωτεϊνάσης Κ (20mg/ml) καθώς και 200 μl διαλύματος λύσης Β3 και ακολούθησε ανάδευση και επώασή τους στον θερμαντήρα σε θερμοκρασία 70°C για 10 λεπτά. Έπειτα, σε κάθε φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 210 μl αιθανόλης (96-100%), αναδεύτηκαν, και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδικές στήλες (NucleoSpin Tissue columns), οι οποίες φυγοκεντρήθηκαν σε 11.000 g για 1 min. Η στήλη NucleoSpin μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο των 2 ml και προστέθηκαν 500 μl διαλύματος πλύσης BW. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και με 600 μl διαλύματος πλύσης Β5. Στη συνέχεια, αφού η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο των 2 ml, πραγματοποιήθηκε μια ακόμη φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό προκειμένου να εξατμιστεί το υπόλειμμα αιθανόλης. Τέλος, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο φιαλίδιο των 1,5 ml (microcentrifuge tube) και προστέθηκαν 100μl διαλύματος διάλυσης BE (elution buffer) που είχε προθερμανθεί σε θερμοκρασία 70ºC. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20ºC.

### 3.2.2 Απομόνωση DNA από παθογόνα απομονωμένα σε καλλιέργεια

Η απομόνωση του DNA από παθογόνα απομονωμένα σε καλλιέργεια έγινε με εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη μέθοδο (NucleoSpin Tissue kit Macherey-Nagel, Düren, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, συλλέχθηκαν 10ml από κάθε καλλιέργεια, έγινε φυγοκέντρηση στα 3.000 g για 30 λεπτά, έγινε απόρριψη του υπερκείμενου και στο ίζημα προστέθηκαν 25 μl πρωτεϊνάσης Κ (20mg/ml) καθώς και 180 μl διαλύματος λύσης Τ1. Στη συνέχεια έγινε ανάδευση για περίπου 10-20 s. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό θερμαντήρα σε θερμοκρασία 56ºC για 14-18 ώρες περίπου. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος προστέθηκαν 200 μl διαλύματος λύσης Β3 σε κάθε δείγμα, ακολούθησε ανάδευση και επώασή τους στον θερμαντήρα σε θερμοκρασία 70°C για 10 λεπτά. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία με αυτή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.1.

### 3.2.3 Απομόνωση DNA από βιοψία λεμφογαγγλίων

Η απομόνωση του DNA από βιοψία λεμφογαγγλίων έγινε με εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη μέθοδο (NucleoSpin Tissue kit Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Σε 25 mg ιστού προστέθηκαν 25 μl πρωτεϊνάσης Κ (20mg/ml) καθώς και 180 μl διαλύματος λύσης Τ1. Στη συνέχεια έγινε ανάδευση για περίπου 10-20 s. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό θερμαντήρα για 14-18 ώρες περίπου σε θερμοκρασία 56$^{o}$C. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος προστέθηκαν 200 μl διαλύματος λύσης Β3 σε κάθε δείγμα, ακολούθησε ανάδευση και επώασή τους στον θερμαντήρα σε θερμοκρασία 70°C για 10 λεπτά. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία με αυτή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.1.

## 3.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

Προκειμένου να επιλεχθεί η κατάλληλη περιοχή-στόχος του γενώματος της *Leishmania* που θα στόχευαν οι ολιγονουκλεοτιδικοί-ανιχνευτές αλλά και για να αναδειχθεί μια μέθοδος αναφοράς βάσει της οποίας θα γίνονταν η εκτίμηση της επίδοσης των μεθόδων που αναπτύχθηκαν στη συνέχεια, έγινε συγκριτική αξιολόγηση τεσσάρων μεθόδων PCR για ανίχνευση της *Leishmania* spp. Αυτές ήταν δύο συμβατικές PCR, μία real time PCR και μία εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη μέθοδος PCR.

### 3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο των τεσσάρων PCR φαίνεται στον Πίνακα 3. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η απόδοση των υπό αξιολόγηση μεθόδων, οι συνθήκες και η χημική σύνθεση της κάθε αντίδρασης τροποποιήθηκαν ως ακολούθως, με εξαίρεση την εμπορικά τυποποιημένη μέθοδο.

Με τη Μέθοδο Α (Cortes et al., 2004) ενισχύεται ένα κομμάτι DNA μεγέθους 447 bp του κινετοπλάστη της *L. infantum* (Genebank accession no. **AF169140**). Το διάλυμα αντίδρασης με τελικό όγκο 25 μl περιείχε 3 μl DNA, 1 X PCR ρυθμιστικό διάλυμα [Tris-HCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM $MgCl_2$], 2.5 mM $MgCl_2$ , 200 μM dNTPs

(Fermentas, Lithuania), 1.25 U Taq Polymerase (Qiagen, Germany) και 0.2 μM από κάθε ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή.

Η Μέθοδος Β είναι μία εμπορικά διαθέσιμη τυποποιημένη διαγνωστική δοκιμασία (Genekam Biotechnology AG, Germany), με το οποίο ενισχύεται ένα τμήμα μεγέθους 603 bp του DNA της *L.donovani* (η περιοχή στόχος και η αλληλουχία των εκκινητών δεν αναφέρονται από τον κατασκευαστή).

Με τη Μέθοδο Γ (Piarroux et al., 1995) ενισχύεται ένα τμήμα DNA μεγέθους 216 bp μίας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας της *L. infantum* (Genebank accession no. **L42486.1**). Το διάλυμα αντίδρασης με τελικό όγκο 50 μl περιείχε 5 μl DNA, 1X PCR Buffer [Tris-HCl, KCl, $(NH_4)$ $MgCl_2$], 3 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs (Fermentas, Lithuania), 1.25 U Taq Polymerase (Qiagen, Germany) και 0.2 μM από κάθε ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή.

Η Μέθοδος Δ είναι μία real time PCR (Schulz et al., 2003) με την οποία ενισχύεται ένα τεμάχιο DNA μεγέθους 428 bp του γονιδίου 18S-rRNA της *Leishmania* spp. Το διάλυμα αντίδρασης είχε τελικό όγκο 20 μl και περιείχε 5 μl DNA, 1X LightCycler Hyprobe Master (Roche, Mannheim, Germany), 2 mM $MgCl_2$, 0.5 μM από κάθε ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή και 0.2 μM από κάθε ανιχνευτή.

Για κάθε μια από τις παραπάνω αντιδράσεις προετοιμάστηκε διάλυμα για την εξέταση του συνόλου των δειγμάτων (master mix). Για την προετοιμασία αυτού του διαλύματος, προστέθηκε αρχικά το νερό και στη συνέχεια το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, το χλωριούχο μαγνήσιο, το μίγμα των δεσοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTP's), τα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές και αναφορικά για τη real time PCR οι ανιχνευτές. Τελευταία προστέθηκε η Taq πολυμεράση. Η διαδικασία έγινε σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (PCR Workstation) που χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την προετοιμασία των αντιδράσεων της PCR. Τα αναλώσιμα και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποκλειστικής χρήσης για PCR. Το διάλυμα διαμοιράστηκε σε ειδικά φιαλίδια, τα οποία σημάνθηκαν και πωματίστηκαν για να τοποθετηθούν σε καθαρό χώρο εργασίας όπου προστέθηκε το DNA. Τα φιαλίδια με το DNA τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή (MyCycler®, BIORAD, California) για τις συμβατικές PCR και στον LightCycler 2.0 (Roche, Basel, Switzerland) για τη real time PCR (Πίνακας 3).

Το 20% των δειγμάτων που εξετάζονταν κάθε φορά ήταν αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες. Οι τελευταίοι παρασκευάστηκαν από προϊόν απομόνωσης DNA από επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα (καλλιέργεια, IFAT και PCR) του ίδιου τύπου με

αυτά που εξετάζονταν, στα οποία είχε προστεθεί DNA προμαστιγωτών *Leishmania* απομονωμένων σε καλλιέργεια.

| | | Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο (°C/sec) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Μέθοδος | Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητών /ανιχνευτών (5′ – 3′ κατεύθυνση) | Αποδιάταξη | Επικόλληση | Επέκταση | Αριθμός κύκλων |
| **Α** | MC1:GTTAGCCGATGGTGGTCTTG<br>MC2: CACCCATTTTTCCGATTTTG | 95/30 | 56/30 | 72/40 | 35 |
| **Β** | Δεν αναφέρεται από τον κατασκευαστή | 94/30 | 54/30 | 72/90 | 40 |
| **Γ** | T2: CGGCTTCGCACCATGCGGTG<br>B4:ACATCCCTGCCCACATACGC | 95/30 | 62/30 | 72/20 | 40 |
| **Δ** | CDLS: 5′-GCTCCAAAAGCGTATATTAATGCTGT-3′<br>CDLA: 5′-TCCTTCATTCCTAGAGGCCGTGAGT-3′<br>Ανιχνευτής1:GGTTTTAAAGGTCTATTGGAGATTATGGAGCTGTGCG<br>(3’label, 6-carboxy-fluorescein)<br>Ανιχνευτής 2: CAAGCGCTTTCCCATCGCAACCTCGGT<br>(5′ label, LC red 640, 3′ phosphorylated) | 95/10 | 55/10 | 72/40 | 45* |

*Ακολούθως διενεργείται ανάλυση καμπύλης τήξης με αρχική αποδιάταξη σε θερμοκρασία 95°C για 0 sec, ένα στάδιο σε θερμοκρασία 50°C για 15 sec και ένα τελικό στάδιο με συνεχόμενη θέρμανση 0.1°C/sec μέχρι τους 95°C.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3:** Νουκλεοτιδική αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο των μεθόδων Α-Δ.

### 3.3.2 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Τα προϊόντα ενίσχυσης των μεθόδων Α-Γ ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v με βρωμιούχο αιθίδιο.

Πιο αναλυτικά, σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 120 ml διαλύματος TAE (Tris-Acetic acid-EDTA) 1X και 2,4 g αγαρόζης (2%) (UltraPure$^{TM}$ Agarose, Invitrogen, California). Η τήξη της αγαρόζης έγινε σε φούρνο μικροκυμάτων σε ισχύ 800 Watt. Στη συνέχεια προστέθηκαν 6 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) και το διάλυμα τοποθετήθηκε στη βάση της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Όταν στερεοποιήθηκε το πήκτωμα, βυθίστηκε σε διάλυμα TAE 1X που είχε τοποθετηθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στα βοθρία του πηκτώματος, τοποθετήθηκαν 10 μl δείγματος που είχαν αναμειχθεί με 2 μl διαλύματος φόρτωσης (6X loading dye solution, Fermentas). Συνδέθηκαν τα ηλεκτρόδια στους υποδοχείς της συσκευής και εφαρμόστηκε τάση 90 Volt/cm για περίπου 1 ώρα.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή παραγωγής υπεριώδους φωτός όπου γίνεται διακριτό το σήμα που αντιστοιχεί στο DNA των δειγμάτων που είχαν αναλυθεί με PCR. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR έγινε αναφορικά με δείκτη μοριακών βαρών (Mass Ruler low range DNA Ladder, Fermentas) με τη χρήση ειδικού λογισμικού (Image Lab 3.0, Biorad) που επέτρεπε τη διάκριση και παραμετροποίηση της έντασης του σήματος που εκπεμπόταν από το προς εξέταση δείγμα.

### 3.3.3 Σχετική ευαισθησία και ειδικότητα

Η σχετική ευαισθησία εκτιμήθηκε υπολογίζοντας το ποσοστό των θετικών αποτελεσμάτων που ανιχνεύτηκαν με καθεμία από τις μεθόδους PCR και επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (εδώ αναφερόμενα ως αληθώς θετικά), συγκριτικά με εκείνα που καταγράφηκαν βάσει της μεθόδου με την οποία ανιχνεύθηκε ο υψηλότερος αριθμός θετικών δειγμάτων. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την εκτίμηση συνίστατο από τα κλινικά δείγματα (n=65) και τα καλλιεργημένα στελέχη *Leishmania* spp. (n=15).

Για την εκτίμηση της σχετικής ειδικότητας, καταγράφηκε το ποσοστό των αληθώς αρνητικών αποτελεσμάτων που ανιχνεύτηκαν με όλες τις μεθόδους που εξετάστηκαν προς εκείνα που καταγράφηκαν βάσει της μεθόδου με την οποία ανιχνεύθηκε ο

υψηλότερος αριθμός αρνητικών δειγμάτων (Altman and Bland, 1994). Για αυτό το στάδιο της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα καλλιεργημένα στελέχη των αρνητικών μαρτύρων (n=36) και τα κλινικά δείγματα που είχαν χαρακτηριστεί ως αληθώς αρνητικά (n=40). Ως τέτοια χαρακτηρίστηκαν επειδή παρήγαγαν επιβεβαιωμένο αρνητικό αποτέλεσμα (εξετάστηκαν δύο φορές, οι μάρτυρες έδωσαν το αναμενόμενο αποτέλεσμα, υπήρχε απουσία αναστολέων της PCR και ήταν αποδεχτή η ποιότητα και η ακεραιότητα του DNA) με τη μέθοδο με την υψηλότερη ευαισθησία.

### 3.3.4 Επαναληψιμότητα-αναπαραγωγιμότητα των μεθόδων PCR

Προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των μεθόδων, καταγράφηκε το αποτέλεσμα καθεμίας από αυτές στα ίδια δείγματα, στο ίδιο εργαστήριο, από τον ίδιο χειριστή, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εξοπλισμό (Anonymous, 1994). Πιο συγκεκριμένα οι μέθοδοι Α-Δ εφαρμόστηκαν δύο φορές σε 5 μl DNA απομονωμένο από καθένα από τα 20 δείγματα αίματος. Αυτά είχαν σημειωθεί με κωδικούς αριθμούς χωρίς ο χειριστής να γνωρίζει το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Χρησιμοποιήθηκαν 12 δείγματα που είχαν αντιδράσει θετικά με όλες τις μεθόδους υπό αξιολόγηση και 8 που είχαν χαρακτηριστεί με τον ίδιο τρόπο, αρνητικά. Προκειμένου να ελεγχθεί αν το ελάχιστο όριο ανίχνευσης των μεθόδων επηρεάζει την επαναληψιμότητά τους, στα θετικά δείγματα συμπεριλήφθηκε DNA απομονωμένο από τρία (n=3) δείγματα ολικού αίματος και ίσος αριθμός από δεκαδικές αραιώσεις (1:1.000 – 1: 100.000) του καθενός από αυτά (n=9).

Αναφορικά με την αναπαραγωγιμότητα, καταγράφηκε το αποτέλεσμα που προέκυψε από την ίδια μέθοδο, στα ίδια ακριβώς δείγματα, σε διαφορετικά εργαστήρια, με διαφορετικούς χειριστές, χρησιμοποιώντας διαφορετικά μηχανήματα (Anonymous, 1994). Για πρακτικούς λόγους η αναπαραγωγιμότητα ελέγχθηκε μόνο για τις μεθόδους Α-Γ και εφαρμόστηκε ομοίως χωρίς οι χειριστές να γνωρίζουν το αναμενόμενο αποτέλεσμα, χρησιμοποιώντας τα δείγματα που αναφέρονται στην παραπάνω παράγραφο. Οι συνθήκες εφαρμογής των μεθόδων Α-Γ ήταν ίδιες με αυτές που αναφέρονται παραπάνω, μόνο που στο συνεργαζόμενο εργαστήριο στην Ιατρική Σχολή Αθηνών χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός κυκλοποιητής (MJ Research PTC-200 ThermoCycler, MJ Research GMI, Minnesota, USA). Προκειμένου να διερευνηθεί το επίπεδο της αναπαραγωγιμότητας, η διαδικασία επαναλήφθηκε με αντιδραστήρια PCR διαφορετικού κατασκευαστή (Taq DNA polymerase Recombinant, Invitrogen,

California) στο συνεργαζόμενο εργαστήριο, διατηρώντας ίδιες όλες τις άλλες παραμέτρους.

### 3.3.5 Ελάχιστο όριο ανίχνευσης των μεθόδων PCR

Για τον προσδιορισμό του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης κάθε μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν προμαστιγωτά από 7 στελέχη *L. infantum* απομονωμένα από ανθρώπους (n=2) και σκύλους (n=5) σε συγκέντρωση $10^6$ παράσιτα/ml διαλύματος 70% αλκοόλης. Το ίζημα που συλλέχθηκε από 9 ml από κάθε διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA σε τελικό όγκο 100 μl. Στα επτά διαλύματα DNA που προέκυψαν έγιναν δεκαδικές αραιώσεις (1:10 - $1:10^8$) και 5 μl από κάθε αραίωση χρησιμοποιήθηκαν για PCR με καθεμία από τις υπό εξέταση μεθόδους. Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ορίστηκε ως το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης που ανιχνεύθηκε ως θετικό σε επίπεδο εμπιστοσύνης 99% (Ripp, 1996) χρησιμοποιώντας το Chemidoc XRS System (Biorad, USA).

### 3.3.6 Σύγκριση αποτελεσμάτων με τη δοκιμή του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Indirect Fluorescent Antibody Test/IFAT)

Η δοκιμή IFAT εφαρμόστηκε σε 32 από τα δείγματα αίματος που αναφέρθηκαν παραπάνω, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Leishmania SPOT IF, BioMerieux, France). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η περιοχή που γινόταν η έρευνα είναι ενζωοτική για τη λεϊσμανίωση, αν ο τίτλος αντισωμάτων ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 1/160 το δείγμα θεωρούταν θετικό (Ferroglio et al., 2002). Η διεξαγωγή της δοκιμής πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, τμήμα Ιατρικής, εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας-ζωονόσων και γεωγραφικής Ιατρικής (Ηράκλειο, Κρήτη).

## 3.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ *LEISHMANIA* SPP. ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟ-ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ

### 3.4.1 Νανοσωματίδια Χρυσού (AuNPs)

#### 3.4.1.1 Σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών

Βάσει της αξιολόγησης των τεσσάρων μεθόδων PCR που αναφέρονται παραπάνω, σχεδιάστηκαν (Gene Runner, Hasting Software Inc., NY USA) 4 ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές για την αχίχνευση της *Leishmania*, στοχεύοντας το DNA του κινετοπλάστη (Genebank accession no. **AF169140**). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία και η θερμοκρασία επικόλλησης (Tm) των ανιχνευτών αναφέρεται στον Πίνακα 4. Προκειμένου να συνδεθούν με τα νανοσωματίδια χρυσού, στο 5΄άκρο του κάθε ανιχνευτή προστέθηκε μια ομάδα θείου και μια ακολουθία (ουρά) 10 βάσεων αδενίνης.

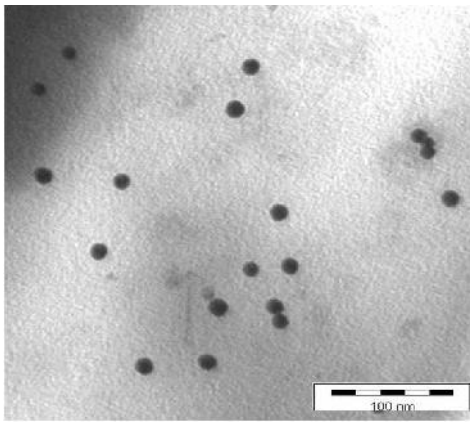
| Ολιγον/κός ανιχνευτής | Αλληλουχία (5΄-3΄) | Tm $^{o}$C |
|---|---|---|
| LeishAu1 | GTTAGCCGATGGTGGTCTTG | 63,2 |
| LeishAu2 | ACGGGTGTCTTTGATGATGC | 63,8 |
| LeishAu3 | TAGTCTGGTGGGATGCTTCG | 63,2 |
| LeishAu4 | GTGCCTTTGATGTGGGTGTT | 63,5 |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4:** Η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών και η θερμοκρασία επικόλλησής τους.

#### 3.4.1.2 Σύνδεση των νανοσωματιδίων χρυσού με τους ανιχνευτές

Τα νανοσωματίδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμπορικά διαθέσιμα (Nanopartz, Salt Lake City, Utah, USA), είχαν σφαιρικό σχήμα και διάμετρο 20 nm (Εικόνα 2). Η σύνδεσή τους με τους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές επετεύχθη βάσει ενός ήδη δημοσιευμένου πρωτοκόλλου (Hill and Mirkin, 2006) που τροποποιήθηκε ως ακολούθως: Αρχικά σε ένα γυάλινο δοχείο προστέθηκε 1 ml νανοσωματιδίων και 40 μl θειολυομένων ολιγονουκλεοτιδίων (100pmol/μl) και ακολούθησε επώαση σε σκοτεινό

θάλαμο υπό ανάδευση για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε PBS (phosphate buffered saline) και SDS (Sodium dodecyl sulfate) σε τελική συγκέντρωση 9 mM και 0.1% (w/v) αντίστοιχα και τα διαλύματα επωάστηκαν σε σκοτεινό θάλαμο υπό ανάδευση για ακόμα 30 min. Κατά τη διάρκεια των επόμενων 24 ωρών προστέθηκαν 5 ισόποσες δόσεις διαλύματος άλατος ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση NaCl 0.3 M στο τελικό διάλυμα. Τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια των 1,5 ml και φυγοκεντρήθηκαν στα 13.000 g για 15 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 500 μl διαλύματος Αντίδρασης (10 mM phosphate, 150 mM NaCl, 0.1% w/v SDS, pH 7,4). Η διαδικασία επαναλήφθηκε 7 φορές. Μετά την τελευταία πλύση, τα σωματίδια ανασυστάθηκαν σε διάλυμα αντίδρασης και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία 4°C.




**Εικόνα 2:** Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων (Transmission Electron Microscope, TEM ) όπου φαίνονται τα νανοσωματίδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν.

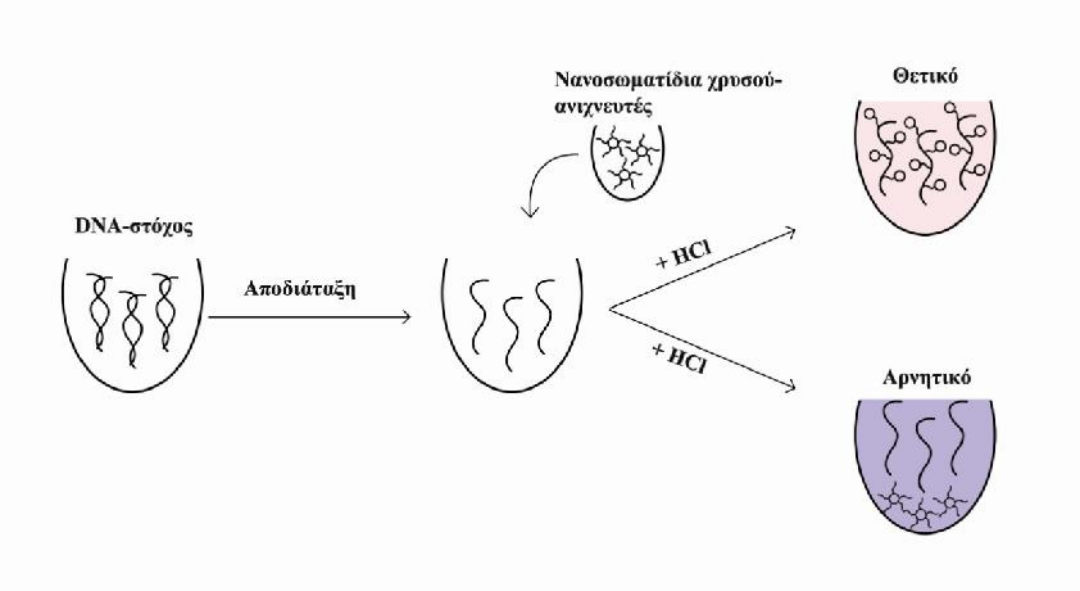
### 3.4.1.3 Δοκιμή ελέγχου σύνδεσης

Προκειμένου να ελεγχθεί η σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών με τα νανοσωματίδια χρυσού, τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 βοθρίων και μετρήθηκε η οπτική τους απορρόφηση στην περιοχή μήκους κύματος μεταξύ 480-700 nm με φασματοφωτόμετρο (Infinite M200, Tecan, Switzerland). Όταν είχε επιτευχθεί η σύνδεση, τα διαλύματα στα οποία οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές είχαν συνδεθεί με τα νανοσωματίδια χρυσού παρουσίαζαν οπτική απορρόφηση της οποίας το μέγιστο ήταν μετατοπισμένο κατά 2-5 nm (~523 nm) σε σχέση με αυτή των ασύνδετων νανοσωματιδίων χρυσού (518-519 nm).

### 3.4.1.4 Ανίχνευση γενετικού υλικού με AuNPs-probe

#### 3.4.1.4.1 Μέθοδος

Σε ένα φιαλίδιο προστέθηκαν 50 μl διαλύματος αντίδρασης (10mM PBS, pH 5.0) και 10 μl DNA και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά προκειμένου να αποδιαταχθεί το DNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 μl από κάθε συνδεδεμένο νανοσωματίδιο και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν 20 μl HCl 0.1N, ακολούθησε επώαση για 10-20 λεπτά και εξετάστηκαν διά γυμνού οφθαλμού για τη διαπίστωση αλλαγής χρώματος. Στα θετικά δείγματα το χρώμα του διαλύματος παρέμεινε κόκκινο, ενώ στα αρνητικά δείγματα άλλαζε σε ιώδες (Εικόνα 3). Το αποτέλεσα επιβεβαιώθηκε με μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο (Infinite M200, Tecan, Switzerland), όπου στα θετικά δείγματα το μέγιστο της καμπύλης απορρόφησης προσδιορίστηκε στα 520 nm, ενώ στα αρνητικά δείγματα παρατηρήθηκε μετατόπιση του μέγιστου της καμπύλης απορρόφησης προς το ιώδες (μήκος κύματος 575 nm).




**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ανίχνευσης DNA με τα AuNPs (Andreadou et al., 2014).

#### 3.4.1.4.2 Ελάχιστο όριο ανίχνευσης

Προκειμένου να προσδιοριστεί το ελάχιστο όριο ανίχνευσης, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διαδοχικές αραιώσεις (1/2-1/64) DNA *Leishmania donovani* γνωστής συγκέντρωσης (23 ng/μl), όπως περιγράφεται παραπάνω στο κεφάλαιο 3.4.1.4.1. Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ορίστηκε ως το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης που ανιχνεύθηκε ως θετικό σε επίπεδο εμπιστοσύνης 99% (Ripp, 1996).

#### 3.4.1.4.3 Ευαισθησία, ειδικότητα, επαναληψιμότητα

Η ευαισθησία της μεθόδου εκτιμήθηκε υπολογίζοντας την αναλογία των θετικών δειγμάτων που προέκυψαν σε σχέση με το συνολικό αριθμό των θετικών δειγμάτων.

Η ειδικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε υπολογίζοντας την αναλογία των αρνητικών δειγμάτων που ορθώς ανιχνεύτηκαν με την προς εξέταση μέθοδο σε σχέση με το αριθμό των ορθώς αρνητικών δειγμάτων (Altman and Bland, 1994).

Για την εκτίμηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου, αυτή εφαρμόστηκε σε DNA (10μl) απομονωμένο από ολικό αίμα που συλλέχθηκε από σκύλους (n=20). Τα ίδια δείγματα εξετάστηκαν και με PCR και αυτά που αντέδρασαν αρνητικά ή θετικά (επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του παραγόμενου προϊόντος) θεωρήθηκαν αντίστοιχα ως αληθώς αρνητικά και θετικά. Η PCR που χρησιμοποιήθηκε για αυτή τη διερεύνηση αποτελεί τροποποίηση της αναφερόμενης από τους Cortes et al. (2004). Η μέθοδος αυτή αξιολογήθηκε προηγουμένως (Andreadou et al., 2012) και αναφέρεται ως μέθοδος Α.

Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, η προς εξέταση μέθοδος εφαρμόστηκε 5 φορές σε DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα αίματος (n=20) που αναφέρονται παραπάνω.

## 3.4.2 Κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου (QDs CdSe)

### 3.4.2.1 Ανίχνευση DNA

#### 3.4.2.1.1 Σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών

Βάσει του αποτελέσματος της αξιολόγησης των τεσσάρων μεθόδων PCR, σχεδιάστηκαν (Gene Runner, Hasting Software Inc., NY USA) 2 ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές, ένας για σύνδεση με τα κβαντικά κοκκία (quantum dots, QDs) (LeishQD1) και ένας για σύνδεση με τα μαγνητικά σφαιρίδια (magnetic beads, MBs) (LeishQD2) στοχεύοντας σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία του DNA της *Leishmania* spp. Η αλληλουχία και η θερμοκρασία επικόλλησης των ανιχνευτών αναφέρονται στον Πίνακα 5. Προκειμένου να συνδεθεί στα QDs και τα MBs, ο κάθε ανιχνευτή σχεδιάστηκε ώστε να φέρει στο 5΄άκρο του μια ομάδα βιοτίνης.

| Ολιγον/κός Ανιχνευτής | Αλληλουχία (5΄-3΄)* | Tm $^{o}$C | Σύνδεση | Χρήση |
|---|---|---|---|---|
| LeishQD1 | AAGAGGCGGTGTCACAGAGATGGG | 56 | QDs | Ανίχνευση |
| LeishQD2 | ACAGCGACGTCCGTGGAAAG | 51 | MBs | Συγκράτηση |

**Πίνακας 5:** Η ολιγονουκλεοτιδική σύσταση των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση DNA με κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου.
* 5΄ βιοτίνη

#### 3.4.2.1.2 Σύνδεση των κβαντικών κοκκίων με το ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτή

Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου (Qdot® 605 ITK™ Carboxyl Quantum Dots, Invitrogen), τα οποία συνδέθηκαν με στρεπταβιδίνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Αρχικά, σε ένα φιαλίδιο προστέθηκαν 50 μl κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου, 400 μl διαλύματος βορικού οξέος, 96 μl στρεπταβιδίνης και 11,4 μl of EDC (10 mg/ml) και αναδεύτηκαν ελαφρά για 1,5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, το διάλυμα

μεταφέρθηκε σε φίλτρο που συγκρατούσε μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 100 kDa και φυγοκεντρήθηκε στα 4.000 g για 10 λεπτά. Ακολούθησαν εκπλύσεις με 500 μl διαλύματος βορικού οξέος και επαναλήφθηκε η διαδικασία 5 φορές ώστε να απομακρυνθεί η ασύνδετη στρεπταβιδίνη.

Τα σωματίδια συλλέχθηκαν από το φίλτρο, μεταφέρθηκαν σε ένα νέο φιαλίδιο, προστέθηκαν 200 μl βορικού οξέος και το βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο και επωάστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε φίλτρο που συγκρατούσε μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 100 kDa και έγιναν εκπλύσεις με 500 μl διαλύματος βορικού οξέος που επαναλήφθηκαν τρεις φορές για να απομακρυνθεί η υπολειπόμενη ποσότητα ολιγονουκλεοτιδίου-ανιχνευτή που έμεινε ασύνδετη. Τέλος, το σύμπλεγμα μεταφέρθηκε σε ένα φιαλίδιο και συμπληρώθηκε βορικό οξύ έως τελικού όγκου 500 μl.

#### 3.4.2.1.3 Σύνδεση των μαγνητικών σφαιριδίων με το ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτή

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα μαγνητικά σφαιρίδια ενωμένα με στρεπταβιδίνη (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen).

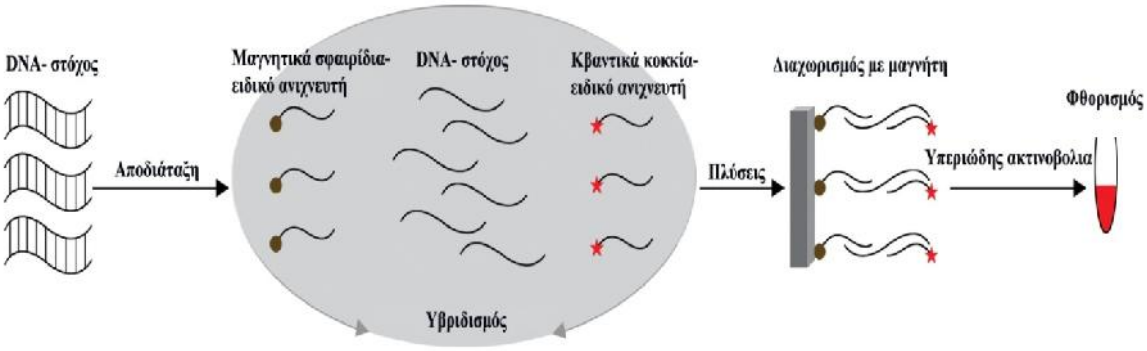
Αρχικά, τα μαγνητικά σφαιρίδια καθαρίστηκαν πριν τη χρήση τους. Έτσι, σε ένα φιαλίδιο προστέθηκαν 200 μl μαγνητικά σφαιρίδια και τοποθετήθηκαν στη μαγνητική συσκευή για 1 min. Το διάλυμα αναρροφήθηκε με πιπέτα και προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές. Τα μαγνητικά σφαιρίδια εναιωρήθηκαν σε 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος, προστέθηκαν 50 μl βιοτινυλιωμένου ολιγονουκλεοτιδίου (100 pmol/μl) και ακολούθησε επώαση για 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με ελαφριά ανάδευση. Τέλος, έγιναν 3 εκπλύσεις των συνδεδεμένων μαγνητικών σφαιριδίων με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής επαναιωρήθηκαν σε 400 μl PBS.

#### 3.4.2.1.4 Ανίχνευση του γενετικού υλικού με QDs

##### 3.4.2.1.4.1 Μέθοδος

Σε ένα φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 20 μl απομονωμένου DNA και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά. Προστέθηκαν 50 μl μαγνητικά σωματίδια συνδεδεμένα με το ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτή και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 59°C για 30

λεπτά. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μl διαλύματος υβριδισμού και 50 μl κβαντικά κοκκία-ανιχνευτής και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 59°C για 1 ώρα. Πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής και έγινε επαναιώρηση σε 200 μl PBS. Η ανίχνευση του φθορισμού έγινε δια γυμνού οφθαλμού με χρήση τράπεζας παραγωγής υπεριώδους φωτός και με μέτρηση του φθορισμού σε φωτόμετρο φθορισμού (Εικόνα 4).




**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ανίχνευσης DNA *Leishmania* spp. με QDs.

### 3.4.2.1.4.2 Ελάχιστο όριο ανίχνευσης

Προκειμένου να ελεγχθεί το ελάχιστο όριο ανίχνευσης, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διαδοχικές αραιώσεις (1/2-1/64) DNA *Leishmania infantum* γνωστής συγκέντρωσης (25 ng/μl), όπως περιγράφεται παραπάνω (κεφάλαιο 3.4.2.1.4.1). Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ορίστηκε ως το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης που ανιχνεύθηκε ως θετικό είτε με γυμνό οφθαλμό χρησιμοποιώντας τράπεζα υπεριώδους φωτός είτε με το φθορίμετρο, σε επίπεδο εμπιστοσύνης 99% (Ripp, 1996).

### 3.4.2.2 Διαδικασία ανίχνευσης του παρασίτου

Εμπορικά διαθέσιμα μαγνητικά σφαιρίδια ενωμένα με στρεπταβιδίνη (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen) υβριδίζουν στο παράσιτο μέσω δύο αντισωμάτων, ενός πολυκλωνικού anti-mouse IgM-biotin (Acris, Herford, Germany) και ενός μονοκλωνικού anti-Leishmania LPG, mouse IgM (Acris, Herford, Germany). Στη συνέχεια προστίθενται τα QDs CdSe -strepatavidin, τα οποία θα υβριδίσουν στο παράσιτο μέσω δύο αντισωματων, ενός πολυκλωνικού anti-mouse IgG-biotin (Acris, Herford, Germany) και ενός μονοκλωνικού anti-Leishmania gp63, mouse IgG2a (Acris, Herford, Germany). Με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής το διάλυμα παράγει φθορισμό παρουσία του παρασίτου.

#### 3.4.2.2.1 Έλεγχος επικόλλησης

Προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα ων αντισωμάτων και η σταθερότητα των συμπλόκων εξετάστηκαν τα δύο στάδια της μεθόδου ξεχωριστά. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε ο υβριδισμός των μαγνητικών σφαιριδίων με το παράσιτο και στη συνέχεια ο υβριδισμός των κβαντικών κοκκίων με αυτό.

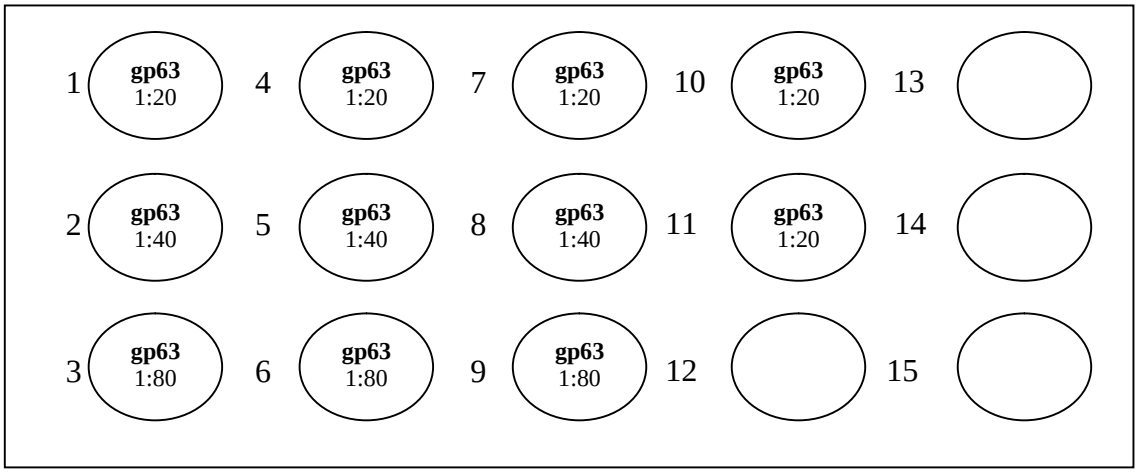
##### 3.4.2.2.1.1 Μαγνητικά σφαιρίδια-αντίσωμα

Είκοσι (20) μl από το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Leishmania LPG, mouse IgM (σε αραίωση 1:50) προστέθηκαν σε 100 μl καλλιέργειας *Leishmania infantum*. Το διάλυμα επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μl από το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-mouse IgM-biotin (σε αραίωση 1:80) και ακολούθησε επώαση 10 λεπτών. Τέλος, προστέθηκαν 50 μl μαγνητικά σφαιρίδια, ενωμένα με στρεπταβιδίνη (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen). Το διάλυμα επωάστηκε για 10 λεπτά, ακολούθησαν εκπλύσεις κατά τις οποίες τα σύμπλοκα των μαγνητικών σφαιριδίων κατακρατήθηκαν με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής. Στο ίζημα προστέθηκαν 50 μl PBS και το διάλυμα αναδεύτηκε ώστε να καταστεί ομοιογενές. Δέκα (10) μl από το διάλυμα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (10x και 40x) μετά τη χρώση τους με σαφρανίνη.

### 3.4.2.2.1.2 QDS –Αντίσωμα

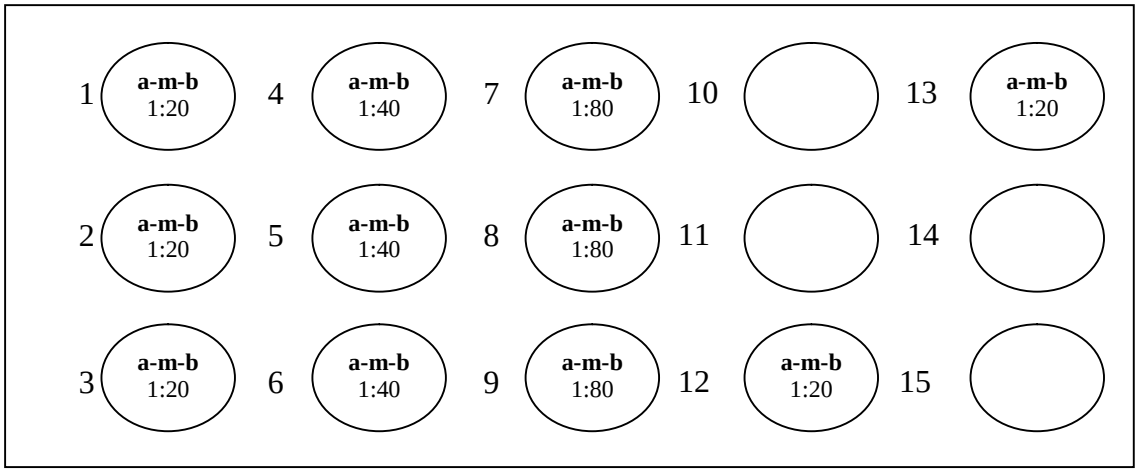
Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου (Qdot® 605 ITK™ Carboxyl Quantum Dots, Invitrogen), τα οποία συνδέθηκαν με στρεπταβιδίνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (κεφάλαιο 3.2.2.1.2.).

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα 15 βοθρίων στα οποία είχε μονιμοποιηθεί *Leishmania* spp., προστέθηκαν 10 μl μονοκλωνικού αντισώματος anti-Leishmania gp63, mouse IgG2a αραιωμένο διαδοχικά 1:20 έως 1:80 (Εικόνα 5) και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με PBS 1x.



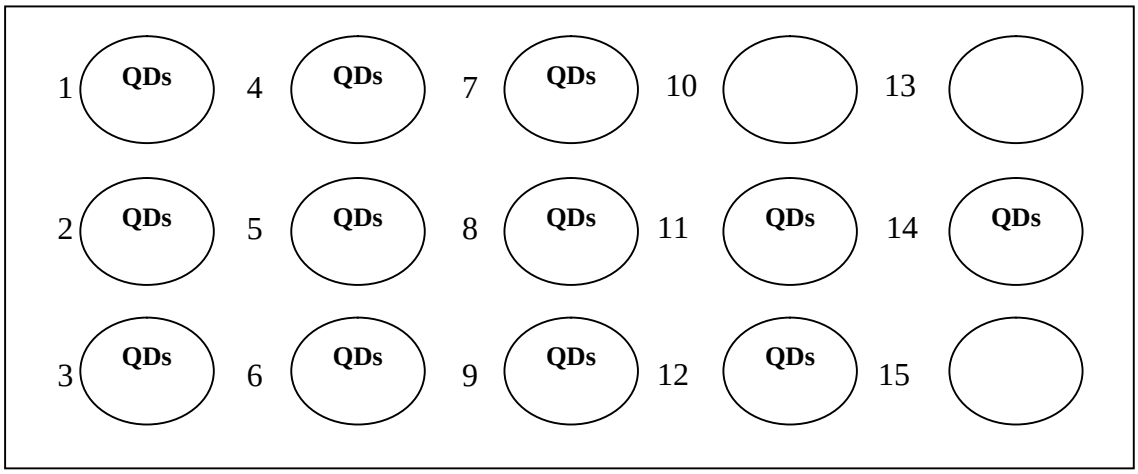

**Εικόνα 5:** Τοποθέτηση του μονοκλωνικού αντισώματος anti-Leishmania gp63.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν στην πλάκα 10 μl anti-mouse IgG-biotin σε αραίωση 1:20-1:80 (Εικόνα 6) και η πλάκα επωάστηκε σε θερμοκρασία 37°C για 2 ώρες.




**Εικόνα 6:** Τοποθέτηση του πολυκλωνικού αντισώματος anti-mouse IgG-biotin.

Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με PBS 1x, προστέθηκαν 10 μl από τα συνδεδεμένα με στρεπταβιδίνη QDs (Εικόνα 7) και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά.




**Εικόνα 7:** Τοποθέτηση των QDs.

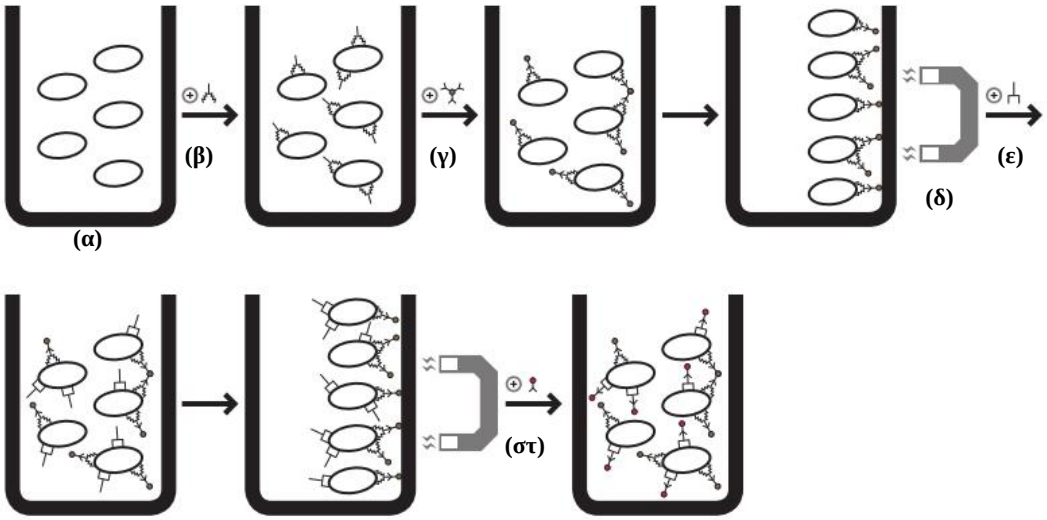
Τέλος, πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις με PBS 1x και η πλάκα τοποθετήθηκε για έλεγχο σε μικροσκόπιο φθορισμού. Προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα των αντισωμάτων και ο επιτυχής υβριδισμός τους με τα QDs, χρησιμοποιήθηκαν 6 βοθρία ως μάρτυρες (No 10-15).

### 3.4.2.2.2 Ανίχνευση *Leishmania* spp. με QDs

#### 3.4.2.2.2.1 Μέθοδος

Σε 500 μl από στελέχη απομονωμένα σε καλλιέργεια (Πίνακας 2) προστέθηκαν 20 μl από το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Leishmania LPG, mouse IgM (αραίωση 1:50) και το διάλυμα επωάστηκε σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μl από το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-mouse IgM-biotin (αραίωση 1:50) και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά. Προστέθηκαν 50 μl διαλύματος μαγνητικών σωματιδίων συνδεδεμένα με στρεπταβιδίνη και το διάλυμα επωάστηκε σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με PBS 1x με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 20 μl από το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Leishmania gp63, mouse IgG2a (αραίωση 1:50) και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με PBS 1x με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής. Προστέθηκαν 20 μl από το πολυκλωνικό αντίσωμα

anti-mouse IgG-biotin (αραίωση 1:50) και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με PBS 1x με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής. Τέλος, προστέθηκαν 50 μl QDs συνδεδεμένα με στρεπταβιδίνη και αφού ακολούθησαν πλύσεις με τη βοήθεια μαγνητικής συσκευής, έγινε επαναιώρηση σε 200 μl PBS 1x και εξετάστηκε το αποτέλεσμα. Η ανίχνευση του φθορισμού έγινε δια γυμνού οφθαλμού με χρήση τράπεζας παραγωγής υπεριώδους φωτός και με μέτρηση της έντασης του φθορισμού σε φωτόμετρο φθορισμού (Εικόνα 8).




**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ανίχνευσης *Leishmania* spp. με QDs, όπου (α) *Leishmania* spp., (β) μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Leishmania LPG, (γ) σύμπλοκο μαγνητικών σφαιριδίων ενωμένων με το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-mouse IgM, (δ) μαγνητική συσκευή, (ε) μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Leishmania gp63, (στ) σύμπλοκο QDs ενωμένων με το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-mouse IgG.

### 3.4.2.2.2.2 Ελάχιστο όριο ανίχνευσης

Για τον προσδιορισμό του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διαδοχικές αραιώσεις (1/10-1/10.000) ποσοτικοποιημένης καλλιέργειας *Leishmania infantum* ($10^6$ κύτταρα/ml), όπως περιγράφεται παραπάνω (κεφάλαιο 3.2.2.2.2.). Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ορίστηκε ως το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης που ανιχνεύθηκε ως θετικό είτε με γυμνό οφθαλμό χρησιμοποιώντας τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας είτε με το φθορίμετρο σε επίπεδο εμπιστοσύνης 99% (Ripp, 1996).

## 3.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Αναφορικά με την αξιολόγηση των μεθόδων PCR, το διάστημα εμπιστοσύνης καθεμίας από αυτές ως προς το επίπεδο θετικότητάς της, υπολογίστηκε βάσει της κανονικής κατανομής. Η συμφωνία των μεθόδων μεταξύ τους εκτιμήθηκε με το McNemar's test (R Core Team, 2013; Matthias et al., 2012), ενώ η συμφωνία τους με την IFAT ελέγχθηκε βάσει του the Fisher's exact test.

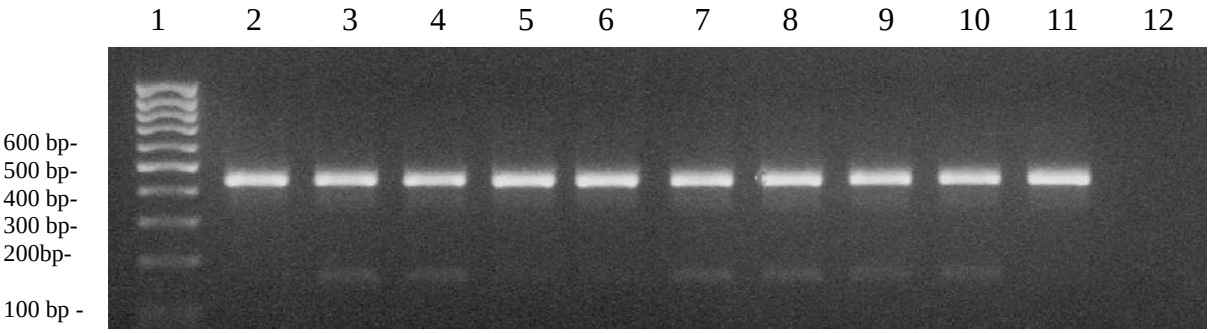
Η συμφωνία της εκτίμησης που προκύπτει από την εφαρμογή της μεθόδου ανίχνευσης DNA χρησιμοποιώντας AuNPs σε σύγκριση με την PCR προσδιορίστηκε με το McNemar's test (R Core Team, 2013; Matthias et al., 2012).

Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα όλων των μεθόδων που εξετάστηκαν, υπολογίστηκαν βάσει του Fleiss' k-statistic (R Core Team, 2013; Matthias et al., 2012). Όλοι οι υπολογισμοί εκτελέστηκαν στο πρόγραμμα Υπολογιστικών Φύλλων της Microsoft (Microsoft Excel).

# 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 4.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

Το αποτέλεσμα όλων των μεθόδων PCR που αξιολογήθηκαν ήταν θετικό αναφορικά με τα στελέχη *Leishmania* που βρίσκονταν απομονωμένα σε καλλιέργεια (Εικόνες 9-11 και διάγραμμα 1) και αρνητικό αναφορικά με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Κατά την ανάλυση των κλινικών δειγμάτων ανιχνεύτηκαν 29% θετικά με τη μέθοδο Α, 22% με τη μέθοδο Β, 58.1% με τη μέθοδο Γ και 23.2% με τη μέθοδο Δ, και 71% αρνητικά με τη μέθοδο Α, 78% με τη μέθοδο Β, 41.9% με τη μέθοδο Γ και 76.8% με τη μέθοδο Δ (Πίνακας 5). Με τη μέθοδο Γ καταγράφηκε υψηλότερο, στατιστικά σημαντικό επίπεδο θετικών αποτελεσμάτων σε σχέση με το αντίστοιχο αποτέλεσμα των μεθόδων Α, Β και Δ σε σύγκριση ανά ζεύγη ($7.02x10^{-05}$ Γ/Α; $5.54x10^{-06}$ Γ/Β; $3.58x10^{-05}$ Γ/Δ), χρησιμοποιώντας το McNemar's exact test.

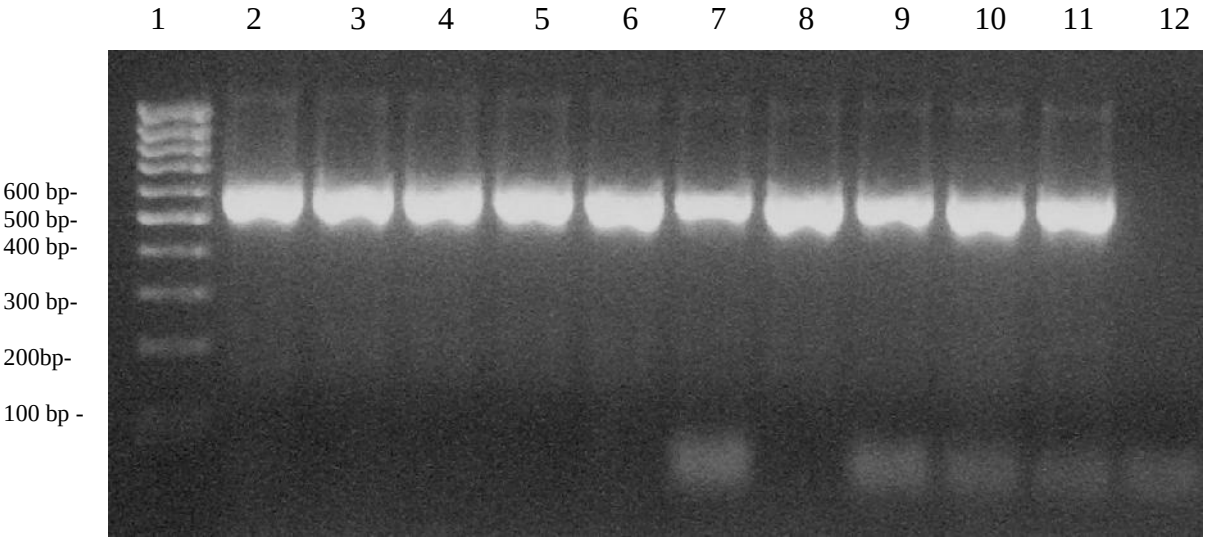



**Εικόνα 9:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης PCR της μεθόδου Α.

Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών (DNA 100bp Ladder, Fermentas)

Στήλες 2-11: Προϊόν ενίσχυσης DNA μεγέθους 447 bp από ισάριθμα (n=10) στελέχη *Leishmania* απομονωμένα σε καλλιέργεια (θετικός μάρτυρας)

Στήλη 12: Αντίδραση που περιέχει νερό αντί για DNA (αρνητικός μάρτυρας)

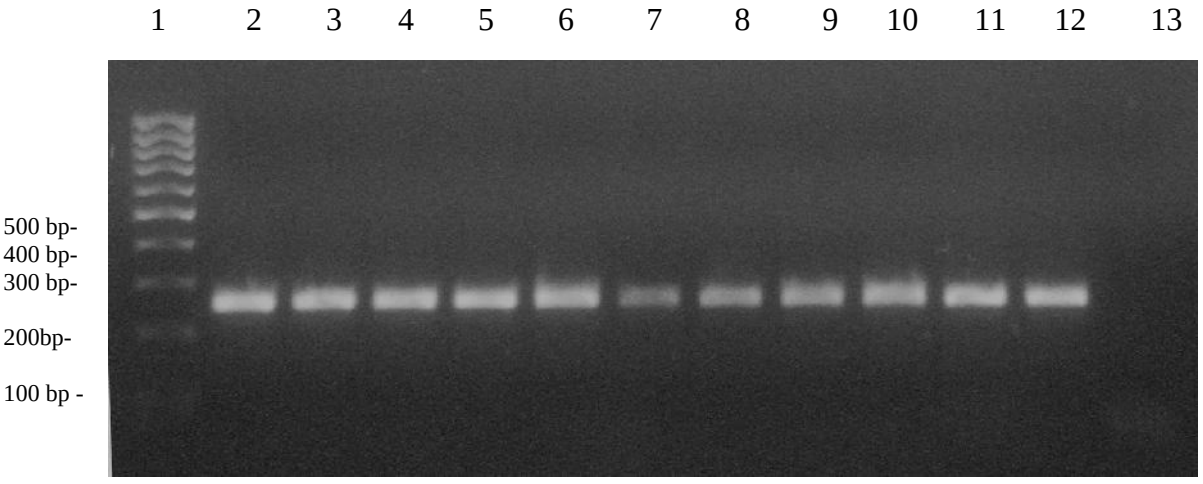



**Εικόνα 10:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης PCR της μεθόδου Β.

Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών (DNA 100bp Ladder, Fermentas)

Στήλες 2-11: Προϊόν ενίσχυσης DNA μεγέθους 603 bp από ισάριθμα (n=10) στελέχη *Leishmania* απομονωμένα σε καλλιέργεια (θετικός μάρτυρας)

Στήλη 12: Δείγμα που περιέχει νερό αντί για DNA (αρνητικός μάρτυρας)

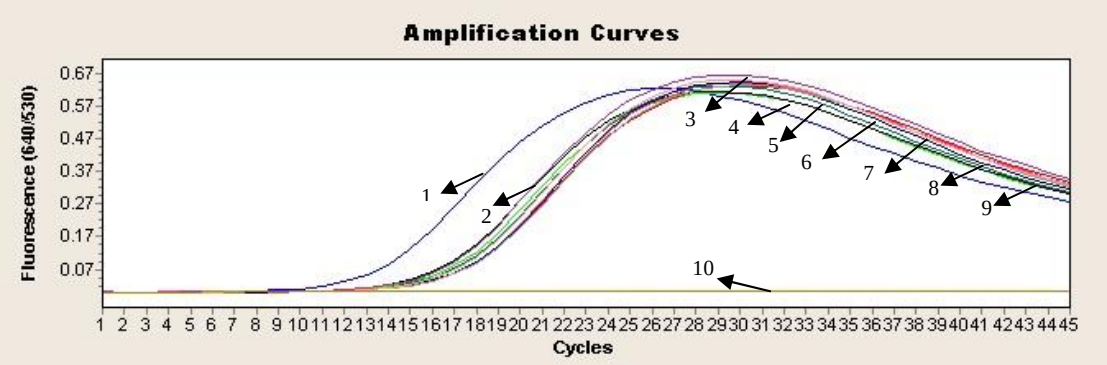



**Εικόνα 11:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης PCR της μεθόδου Γ.

Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών (DNA 100bp Ladder, Fermentas)

Στήλες 2-12: Προϊόν ενίσχυσης DNA μεγέθους 216 bp από ισάριθμα (n=11) στελέχη *Leishmania* απομονωμένα σε καλλιέργεια (θετικός μάρτυρας)

Στήλη 13: Δείγμα που περιέχει νερό αντί για DNA (αρνητικός μάρτυρας)




**Διάγραμμα 1:** Γραφική παράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του προϊόντος ενίσχυσης PCR της μεθόδου Δ ανά στάδιο κυκλοποίησης.

Οι καμπύλες 1-9 αντιστοιχούν σε ισάριθμα (n=9) στελέχη *Leishmania* απομονωμένα σε καλλιέργεια (θετικοί μάρτυρες)

Η καμπύλη 10 αφορά δείγμα που περιέχει νερό αντί για DNA (αρνητικός μάρτυρας).

| | **Κλινικά δείγματα (n=86)** | | **Θετικότητα σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%** | |
|---|---|---|---|---|
| **Μέθοδος** | **+** | **-** | | |
| **Α** | 25 (29%) | 61 (71%) | 0.19 | 0.39 |
| **Β** | 19 (22%) | 67 (78%) | 0.13 | 0.31 |
| **Γ** | 50 (58.1%) | 36 (41.9%) | 0.48 | 0.69 |
| **Δ** | 20 (23.2%) | 66 (76.8%) | 0.14 | 0.32 |

**Πίνακας 5:** Αριθμός θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν από την ανάλυση των κλινικών δειγμάτων με τις μεθόδους Α-Δ.

### 4.1.1 Σύγκριση αποτελεσμάτων με τη δοκιμή έμμεσου ανοσοφθορισμού (Indirect Fluorescent Antibody Test/IFAT)

Η συμφωνία των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν με τη μέθοδο IFAT και την PCR κυμάνθηκε μεταξύ 23 με 77% και 52.6 με 84.2% αντίστοιχα (Πίνακας 6). Το υψηλότερο επίπεδο συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων μεταξύ IFAT και PCR καταγράφηκε με τις μεθόδους Α και Γ (46,1%), ενώ αναφορικά με τα αρνητικά το αντίστοιχο εύρημα καταγράφηκε με τη μέθοδο Β (84,2%). Παρ' όλα αυτά, βάσει του Fisher's exact test η συμφωνία των αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν με τις PCR και την IFAT δεν ήταν στατιστικά σημαντική για καμία από τις μεθόδους που εξετάστηκαν.

| | | **IFAT (n=32)** | |
|---|---|---|---|
| **Μέθοδος** | | **Θετικά (n=13)** | **Αρνητικά (n=19)** |
| | + | 6 (46.1%) | 7 (36.8%) |
| **Α** | - | 7 (53.8%) | 12 (63.1%) |
| | + | 3 (23%) | 3 (15.8%) |
| **Β** | - | 10 (77%) | 16 (84.2%) |
| | + | 6 (46.1%) | 9 (47.4%) |
| **Γ** | - | 7 (53.8%) | 10 (52.6%) |
| | + | 3 (23%) | 4 (21%) |
| **Δ** | - | 10 (77%) | 15 (79%) |

**Πίνακας 6:** Συμφωνία αποτελεσμάτων μεταξύ IFAT και μεθόδων Α-Δ.

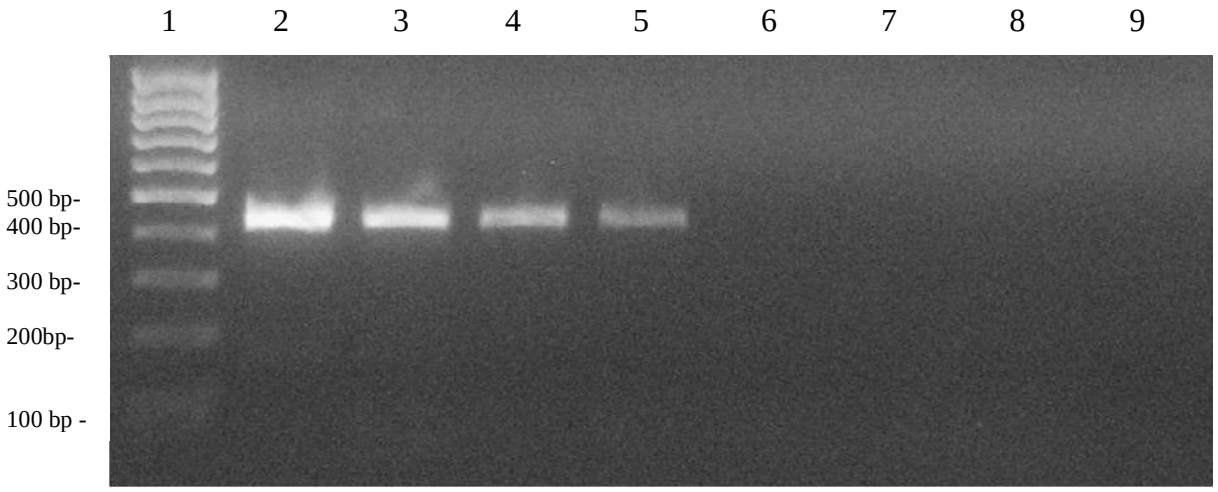
### 4.1.2 Σχετική ευαισθησία και ειδικότητα

Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα εκτιμήθηκε αναφορικά με τη μέθοδο Γ, με την οποία ανιχνεύτηκε το υψηλότερο ποσοστό επιβεβαιωμένων θετικών (n=65, από τα οποία 50 ήταν κλινικά δείγματα και 15 καλλιεργημένα στελέχη) και αρνητικών (n=76, από τα οποία 36 ήταν κλινικά δείγματα και 40 καλλιεργημένα στελέχη)

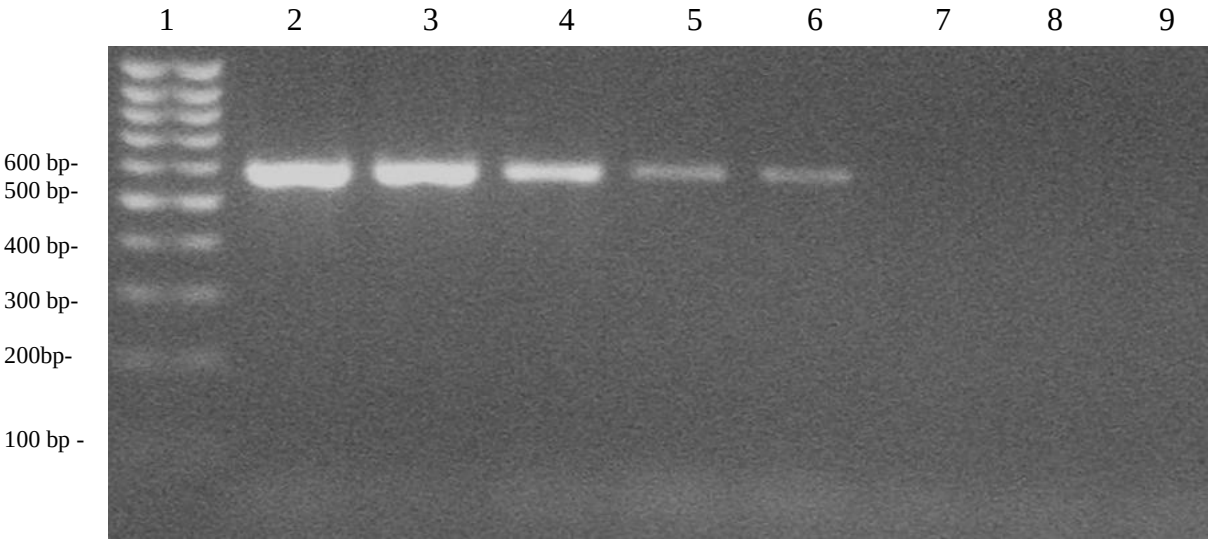
αποτελεσμάτων. Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα των μεθόδων Α, Β, και Δ διαμορφώθηκε στο 50.7% (33/65), 43% (28/65), 40% (26/65) και 90.8% (69/76), 93.4% (71/76) 89.5% (68/76) αντίστοιχα.

### 4.1.3 Ελάχιστο όριο ανίχνευσης

Βάσει των αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν με τις μεθόδους Α-Δ χρησιμοποιώντας τα δείγματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, το μέσο ελάχιστο όριο ανίχνευσης σε επτά επαναλήψεις υπολογίστηκε στα 30.7, 5, 3.7, και 5 προμαστιγωτά /ml, αντίστοιχα.



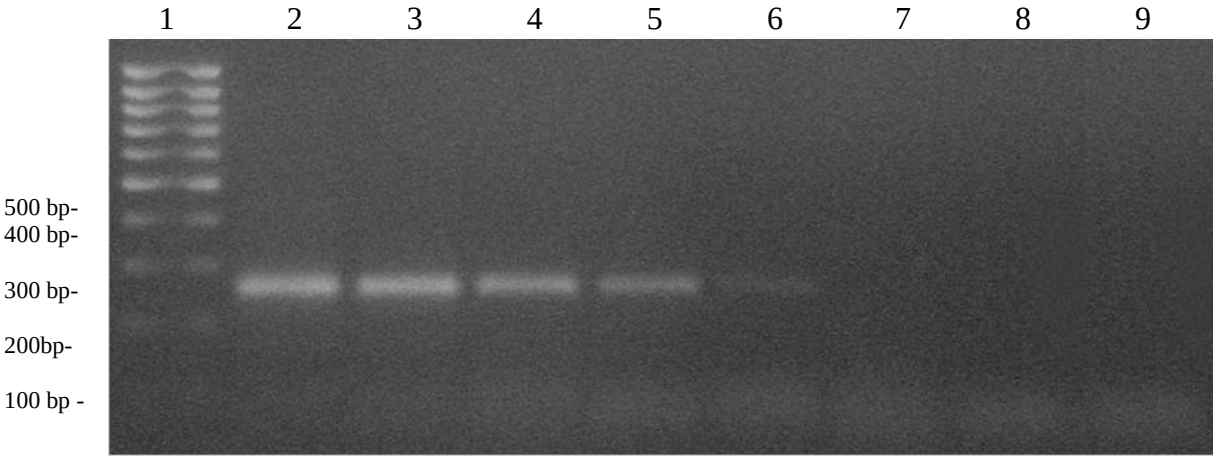

**Εικόνα 12:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης PCR της μεθόδου Α.
Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών (DNA 100bp Ladder, Fermentas)
Στήλες 2-9: Προϊόν ενίσχυσης DNA μεγέθους 447 bp από διαδοχικές αραιώσεις (1:1 to $1:10^7$) DNA *Leishmania* απομονωμένο σε καλλιέργεια που περιείχε $10^6$ παράσιτα/ml




**Εικόνα 13:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης PCR της μεθόδου Β.

Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών (DNA 100bp Ladder, Fermentas)

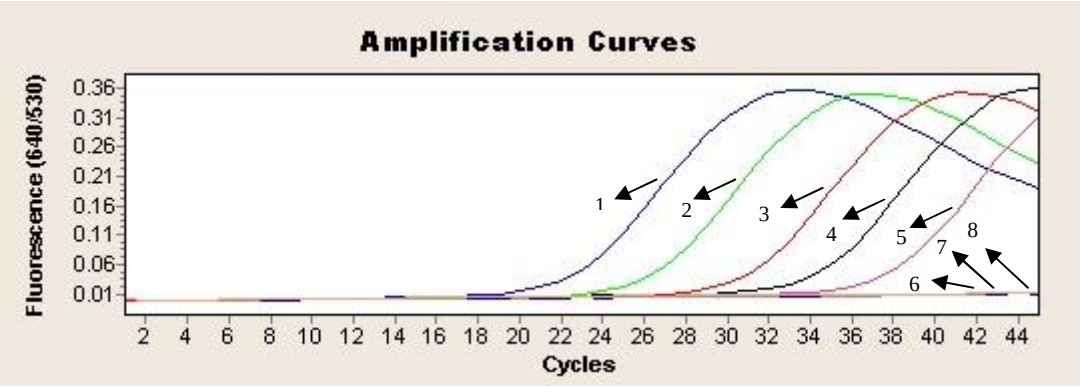
Στήλες 2-9: Προϊόν ενίσχυσης DNA μεγέθους 603 bp από διαδοχικές αραιώσεις (1:1 to $1:10^7$) DNA *Leishmania* απομονωμένο σε καλλιέργεια που περιείχε $10^6$ παράσιτα/ml




**Εικόνα 14:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης PCR της μεθόδου Γ.

Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών (DNA 100bp Ladder, Fermentas)

Στήλες 2-9: Προϊόν ενίσχυσης DNA μεγέθους 216 bp από διαδοχικές αραιώσεις (1:1 to $1:10^7$) DNA *Leishmania* απομονωμένο σε καλλιέργεια που περιείχε $10^6$ παράσιτα/ml




**Διάγραμμα 2:** Γραφική παράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του προϊόντος ενίσχυσης PCR της μεθόδου Δ ανά στάδιο κυκλοποίησης.
Οι καμπύλες 1-8 αντιστοιχούν σε διαδοχικές αραιώσεις (1:1 to $1:10^7$) DNA *Leishmania* απομονωμένο από καλλιέργεια που περιείχε $10^6$ παράσιτα/ml

### 4.1.4 Επαναληψιμότητα-αναπαραγωγιμότητα

Το k-statistic και το αντίστοιχο p-value που υπολογίστηκαν για τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν σε σχέση με την επαναληψιμότητα των μεθόδων Α-Δ αναφέρονται στον Πίνακα 7. Η επαναληψιμότητα ήταν εξαιρετική για όλες τις μεθόδους, αφού ήταν υψηλότερη από 0.75, κάτι που ήταν στατιστικά σημαντικό σε επίπεδο 5%. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι για τη μέθοδο Γ τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν ήταν ακριβώς ίδια και τις δύο φορές που εφαρμόστηκε η μέθοδος. Για τη μέθοδο Δ σημειώθηκε μία ασυμφωνία σε ένα θετικό δείγμα το οποίο αντέδρασε αρνητικά. Τα αποτελέσματα των μεθόδων Α και Β ήταν ίδια, με δύο από τα θετικά δείγματα να αντιδρούν αρνητικά.

Η αναπαραγωγιμότητα των μεθόδων Α-Γ χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια για την PCR ήταν εξαιρετική (υψηλότερη από 0.75) και στατιστικά σημαντική. Με τη μέθοδο Α καταγράφηκε ένα ασύμφωνο αποτέλεσμα με ένα από τα θετικά δείγματα, ενώ με τις μεθόδους Β και Γ καταγέφηκαν τα ίδια αποτελέσματα και τις δύο φορές (Πίνακας 7). Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας για την PCR αντιδραστήρια της Invitrogen ήταν απολύτως σύμφωνα για τις μεθόδους Β και Γ, αλλά για τη μέθοδο Α υπήρξε μία ασυμφωνία αναφορικά με 4 θετικά δείγματα. Σε αυτή την περίπτωση, βάσει k-statistic και p-value, με τη μέθοδο Α αναπτύχθηκε καλή αναπαραγωγιμότητα αφού αυτή ήταν μεγαλύτερη από 0.4, ενώ οι μέθοδοι Α και Γ είχαν

εξαιρετική αναπαραγωγιμότητα (k-statistic=1) με τα αποτελέσματα να είναι στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο 5% (Πίνακας 7).

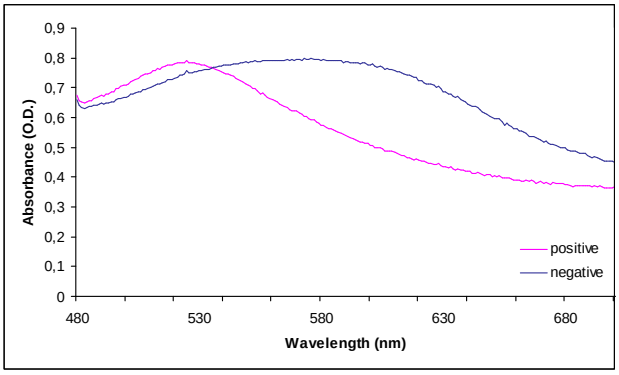
| | **Επαναληψιμότητα** | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Μέθοδος** | **Α** | **Β** | **Γ** | **Δ** |
| **k-statistic** | 0.8 | 0.8 | 1 | 0.9 |
| **p-value** | $1.3x10^{-4}$ | $1.3x10^{-4}$ | $3.87x10^{-6}$ | $2.71x10^{-5}$ |
| | **Αναπαραγωγιμότητα** (Αντιδραστήρια PCR της Invitrogen) | | | |
| **k-statistic** | 0.9 (0.6) | 1 (1) | 1 (1) | - |
| **p-value** | $2.71x10^{-5}$ | $3.87x10^{-6}$ | $3.87x10^{-6}$ | |
| | ($1.4x10^{-3}$) | ($3.87x10^{-6}$) | ($3.87x10^{-6}$) | - |

**Πίνακας 7:** Το k-statistic και το αντίστοιχο p-value που υπολογίστηκαν για την επαναλιψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα των μεθόδων Α-Δ.

## 4.2 ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΧΡΥΣΟΥ (AuNPs)

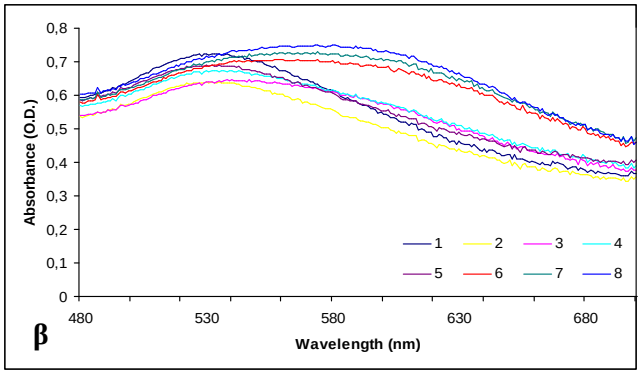
Το χρώμα του διαλύματος του συμπλόκου νανοσωματιδίων χρυσού-ανιχνευτή (AuNPs-probes) είναι αρχικά κόκκινο, εξαιτίας του συντονισμού των πλασμονίων επιφανείας τους. Στην απουσία συμπληρωματικού DNA, τα AuNPs-probes κατακρημνίζονται με αποτέλεσμα να παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από κόκκινο σε ιώδες, μεταβολή που γίνεται ορατή δια γυμνού οφθαλμού (Εικόνα 15). Όταν υπάρχει το DNA-στόχος , το χρώμα του διαλύματος παραμένει κόκκινο. Το μέγιστο της οπτικής απορρόφησης του διαλύματος στο οποίο τα AuNPs-probes υβριδίζουν με το DNA-στόχο είναι περίπου 520 nm. Αυτό μετατοπίζεται στα 575 nm όταν δεν συμβαίνει υβριδισμός (αρνητικό δείγμα), κάτι που επιβεβαιώνεται με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο (Εικόνα 16).

**Εικόνα 15:** Φιαλίδια με θετικό (κόκκινο χρώμα) και αρνητικό (ιώδες χρώμα) κλινικό δείγμα.




**Εικόνα 16:** Μέγιστο της οπτικής απορρόφησης σε θετικό (περίπου 520 nm) και αρνητικό δείγμα (575 nm).

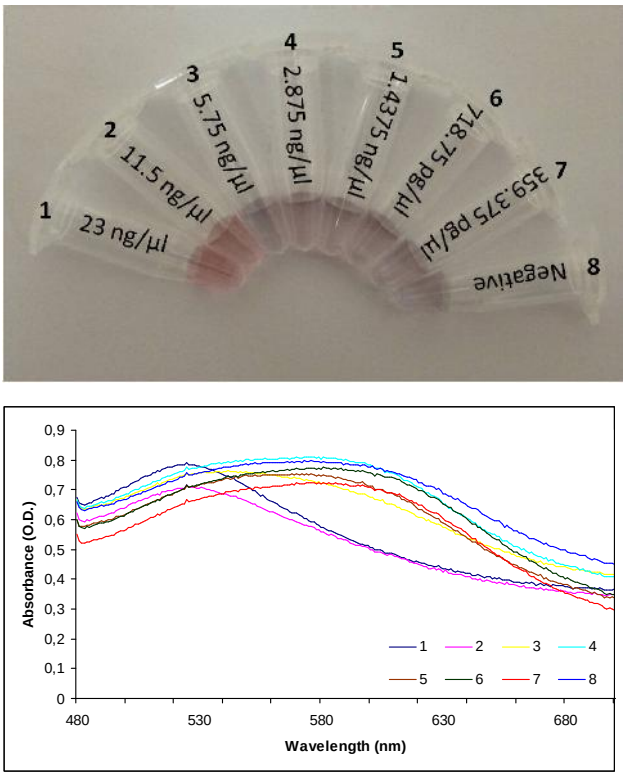
Οι θετικοί (*Leishmania)* και οι αρνητικοί μάρτυρες ανιχνεύτηκαν σωστά με την υπό εξέταση μέθοδο τόσο διά γυμνού οφθαλμού (Εικόνα 17α), όσο και με μέτρηση οπτικής απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο (Εικόνα 17β).




**Εικόνα 17:** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα, τα οποία καταγράφηκαν με τη μέθοδο AuNPs-probes. Τα δείγματα 1-5 αντιστοιχούν σε ισάριθμα (n=5) στελέχη *Leishmania* απομονωμένα σε καλλιέργεια (θετικός μάρτυρας/μέγιστο οπτικής απορρόφησης περίπου 520 nm). Τα δείγματα 6-7 αντιστοιχούν σε καλλιεργημένα στελέχη αρνητικών μαρτύρων, ενώ το δείγμα 8 περιέχει νερό αντί για DNA (μέγιστο οπτικής απορρόφησης περίπου 575 nm).

Όσον αφορά τα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από σκύλους (n=20), η εφαρμογή της PCR είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση του DNA της *Leishmania* σε 50% από αυτά (10 από τα 20) τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως θετικά και τα υπόλοιπα αρνητικά. Όλα τα θετικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος ενίσχυσης της PCR. Οκτώ (n=8) από τα PCR-θετικά δείγματα (n=10) αντέδρασαν θετικά με την προτεινόμενη μέθοδο, ενώ όλα τα PCR-αρνητικά δείγματα (n=10) αντέδρασαν αρνητικά. Έτσι, η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου συγκριτικά με την PCR υπολογίστηκε σε 92% (23 από τα 25) και 100 % (50 από τα 50) αντίστοιχα, λαμβάνοντας υπόψη αθροιστικά τους μάρτυρες και τα κλινικά δείγματα.

Η προτεινόμενη μέθοδος παρήγαγε θετικά αποτελέσματα τα οποία μπορούσαν να ανιχνευτούν δια γυμνού οφθαλμού των δοκιμαστικών σωλήνων με όχι λιγότερο από 115 ng DNA *Leishmania* σε ένα δείγμα όγκου 10 μl. Έτσι, το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της μεθόδου ορίστηκε 11,5 ng/μl. Κάτω από αυτό το όριο και με την ύπαρξη όξινου περιβάλλοντος το χρώμα του διαλύματος άλλαζε σε ιώδες, υποδεικνύοντας αρνητικό αποτέλεσμα (Εικόνα 18). Λαμβάνοντας υπόψη ότι το αποτέλεσμα για τον καθορισμό του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης ήταν ίδιο για όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν, το διάστημα εμπιστοσύνης ήταν το ίδιο με το ελάχιστο όριο ανίχνευσης (11.5,11.5).



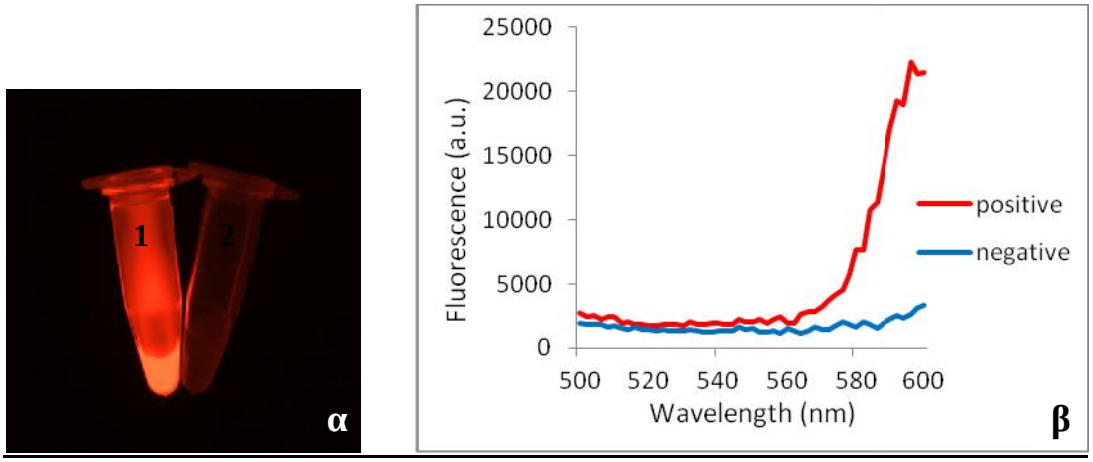

**Εικόνα 18:** Αποτελέσματα της μεθόδου AuNPs-probes όταν εφαρμόστηκε σε διαδοχικές αραιώσεις (1:1 to 1:64) 23 ng/μl DNA *Leishmania* (φιαλίδια 1-7) και αρνητικός μάρτυρας (φιαλίδιο 8) που περιείχε νερό αντί για DNA.

Όσον αφορά την επαναληψιμότητα της μεθόδου, τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν ήταν ίδια κάθε φορά (n=5) που αυτή εφαρμόστηκε στο αντίστοιχο υλικό (n=20). Κατά συνέπεια το ποσοστό επαναληψιμότητας ανήλθε στο 100%. Η στατιστική σημαντικότητα εξετάστηκε βάσει του Fleiss' k-statistic (k-statistic=1, p-value=0) (R Core Team, 2013; Matthias et al., 2012).

## 4.3 ΚΒΑΝΤΙΚΑ ΚΟΚΚΙΑ ΣΕΛΗΝΙΟΥΧΟΥ ΚΑΔΜΙΟΥ (QDs CdSe)

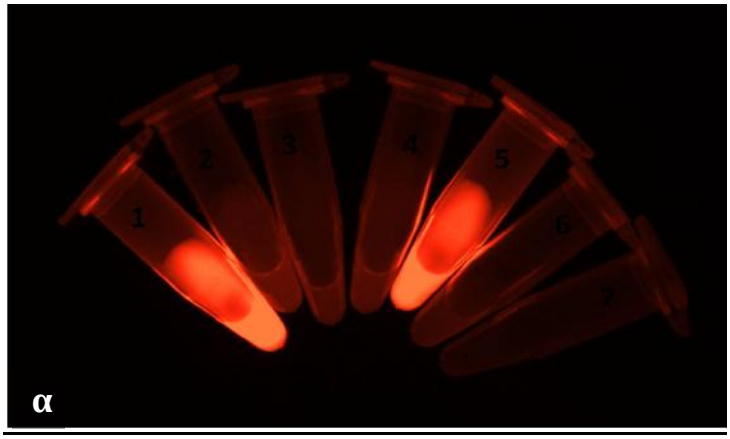
### 4.3.1 Ανίχνευση DNA

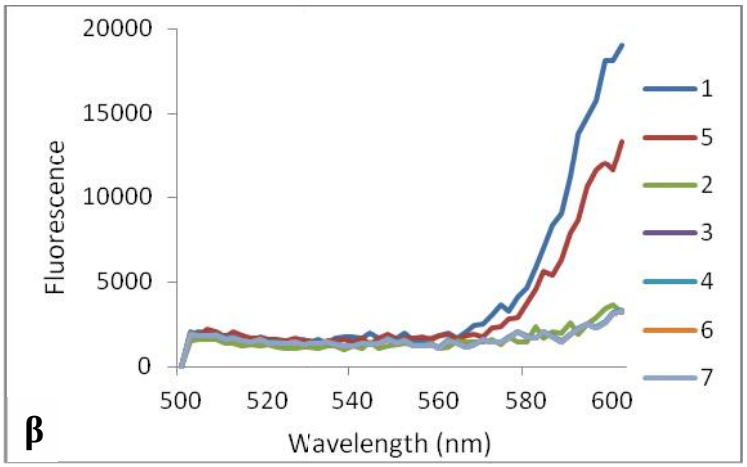
Η παρουσία του DNA-στόχου στο διάλυμα προκαλεί τη δημιουργία ενός συμπλόκου με τα MBs-LeishQD2 και τα QDs-LeishQD1, το οποίο φθορίζει όταν διεγερθεί από μία πηγή υπεριώδους φωτός. Όταν απουσιάζει από το διάλυμα το DNA-στόχος δεν παράγεται φθορισμός (Εικόνα 19α). Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται με μέτρηση σε φωτόμετρο φθορισμού, όπου στα θετικά δείγματα εκπέμπεται φθορισμός με μέγιστο τα 605 nm (Εικόνα 19β).




**Εικόνα 19: α)** φιαλίδιο 1: θετική αντίδραση ανίχνευσης DNA *Leishmania* spp. (κόκκινο χρώμα), φιαλίδιο 2: αντίδραση απουσίας ανίχνευσης DNA (αρνητικό δείγμα/ άχρωμο) **β)** καμπύλες εκπομπής φθορισμού σε θετικό (μέγιστο φθορισμού περίπου στα 605 nm) και αρνητικό δείγμα.

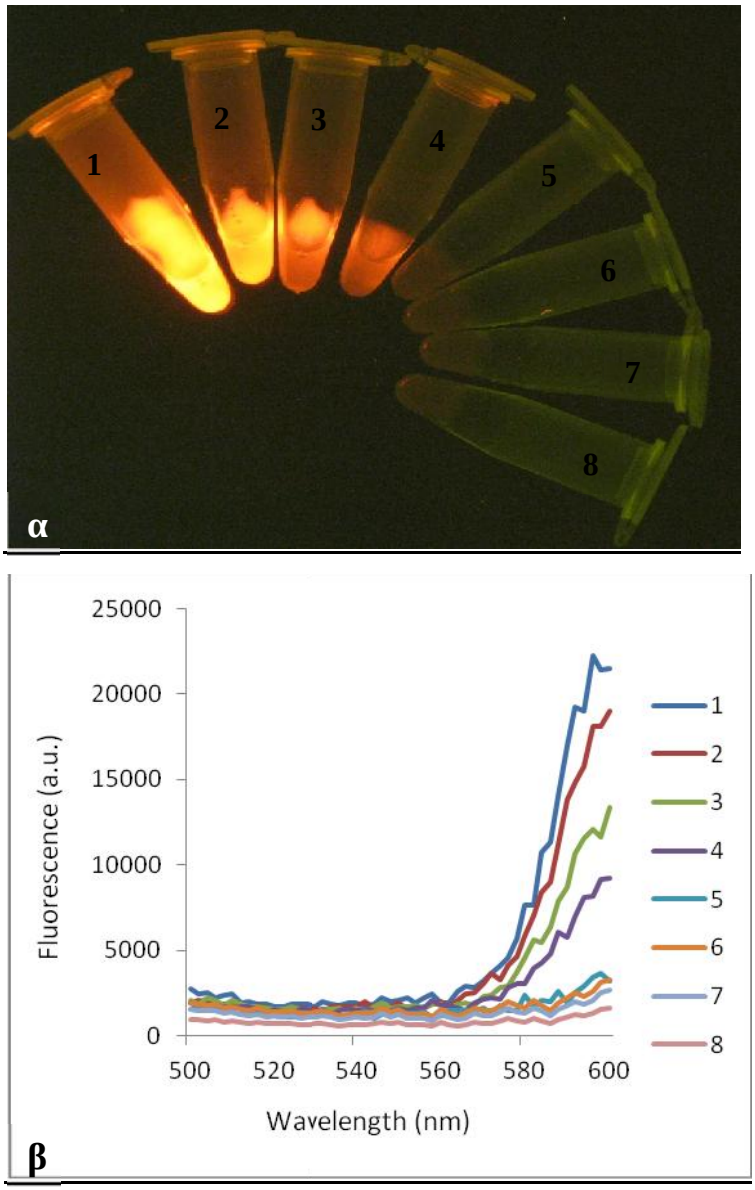
Με τη μέθοδο ανιχνεύτηκαν σωστά τόσο οι θετικοί (*Leishmania)* όσο και οι αρνητικοί μάρτυρες διά γυμνού οφθαλμού με χρήση τράπεζας υπεριώδους φωτός, αλλά και με μέτρηση σε φωτόμετρο φθορισμού (Εικόνα 20).






**Εικόνα 20:** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα, τα οποία καταγράφηκαν με τη μέθοδο QDs-probes. **α)** τα φιαλίδια 1 και 5 αντιστοιχούν σε στελέχη *Leishmania* απομονωμένα σε καλλιέργεια, ενώ τα φιαλίδια 2, 3, 4 και 6 αντιστοιχούν σε καλλιεργημένα στελέχη αρνητικών μαρτύρων και το φιαλίδιο 7 περιέχει νερό αντί για DNA **β)** καμπύλες εκπομπής φθορισμού θετικών (μέγιστο φθορισμού περίπου στα 605 nm) και αρνητικών μαρτύρων.

Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της μεθόδου ορίστηκε 3,125 ng/μl (Εικόνα 21).



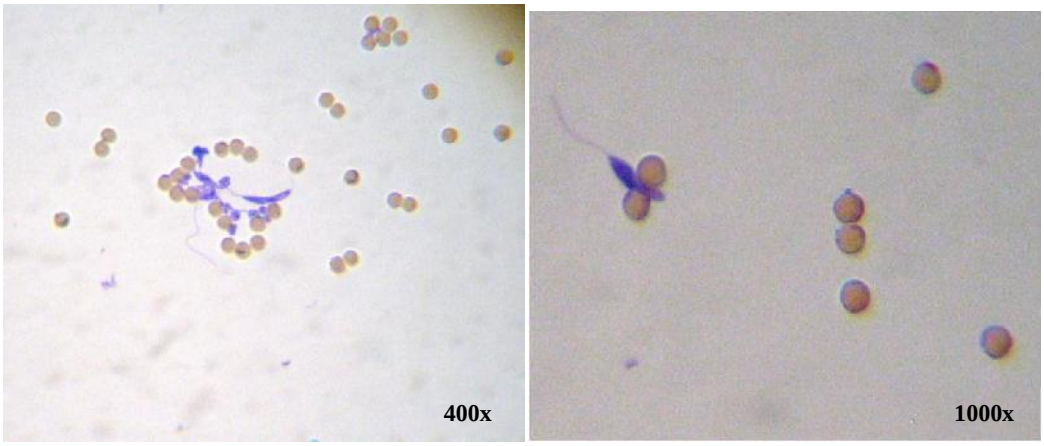

**Εικόνα 21:** Αποτελέσματα της μεθόδου QDs-probes για τον καθορισμό του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης. **α)** φιαλίδια που περιέχουν διαδοχικές αραιώσεις (1:1 to 1:64) 25 ng/μl DNA *Leishmania* (1-7) και αρνητικός μάρτυρας (φιαλίδιο 8) που περιέχει αντί για DNA **β)** καμπύλες εκπομπής φθορισμού δειγμάτων που αντέδρασαν θετικά (φιαλίδια 1-4, μέγιστο φθορισμού περίπου στα 605 nm) και αρνητικά (φιαλίδια 5-8).

### 4.3.2Ανίχνευση του παρασίτου

#### 4.3.2.1 Έλεγχος επικόλλησης

##### 4.3.2.1.1 Μαγνητικά σφαιρίδια-αντίσωμα

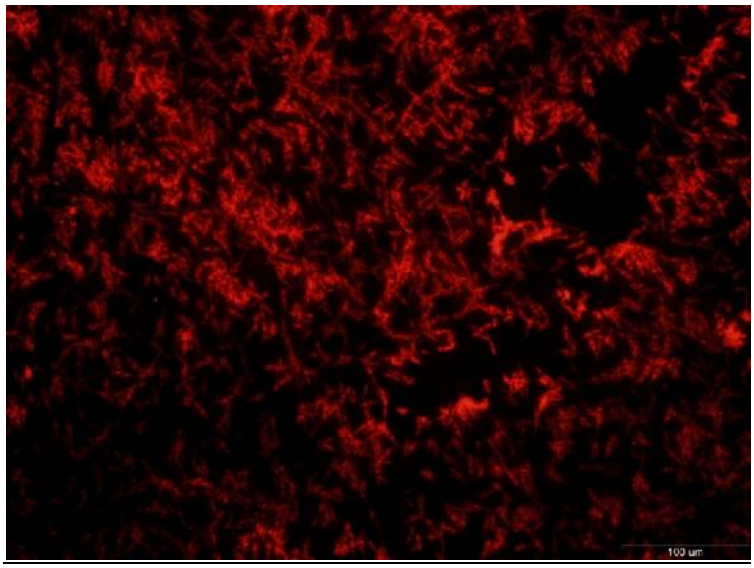
Ο υβριδισμός του παρασίτου με τα μαγνητικά σφαιρίδια μέσω του μονοκλωνικού αντισώματος anti-Leishmania LPG ήταν επιτυχής (Εικόνα 22).



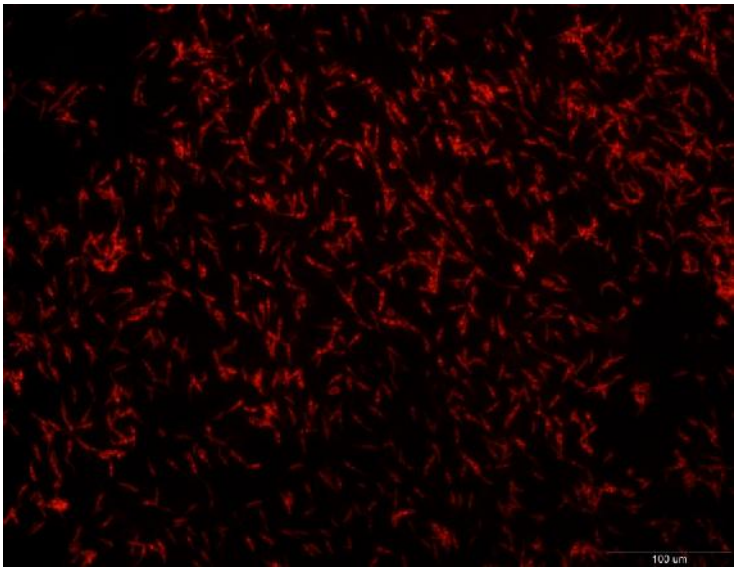

**Εικόνα 22:** Φωτογραφία από οπτικό μικροσκόπιο όπου φαίνεται το σύμπλοκο των μαγνητικών σφαιριδίων με το παράσιτο.

##### 4.3.2.1.2 QDs-αντίσωμα

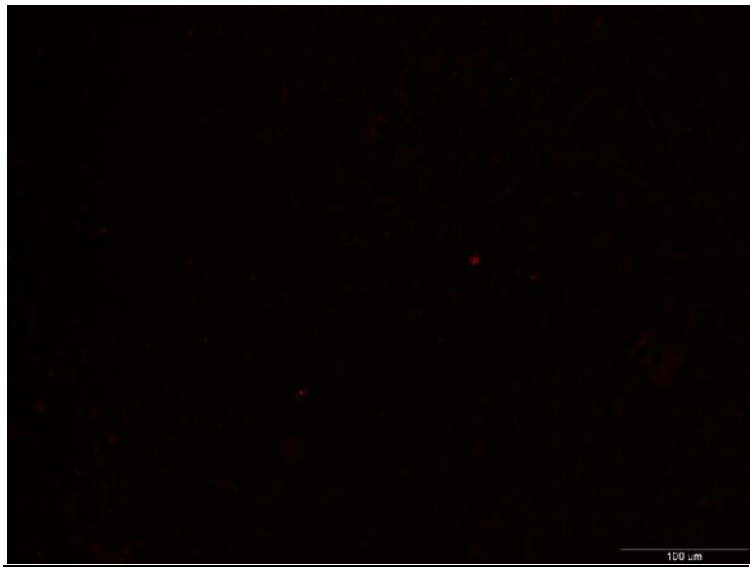
Ύστερα από παρατήρηση της αντικειμενοφόρου πλάκας των 15 βοθρίων σε μικροσκόπιο φθορισμού φάνηκε ο επιτυχής υβριδισμός των QDs με το παράσιτο στα βοθρία 1-9. Βάσει της παραπάνω παρατήρησης εκτιμήθηκε ότι καλύτερη αραίωση των αντισωμάτων ήταν μεταξύ 1:40-1:80, προκειμένου να ανιχνεύεται αποτελεσματικά η *Leishmania* με την ελάχιστη δυνατή ποσότητα αντισώματος (Εικόνα 23 και Εικόνα 24). Στα βοθρία 10-15 δεν παράχθηκε φθορισμός (Εικόνα 25).




**Εικόνα 23:** Φωτογραφία της αντικειμενοφόρου πλάκας σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπου έχει γίνει ο υβριδισμός των QDs με το παράσιτο μέσω του μονοκλωνικού αντισώματος anti-Leishmania gp63 (αραίωση 1:40) (βοθρίο 5).



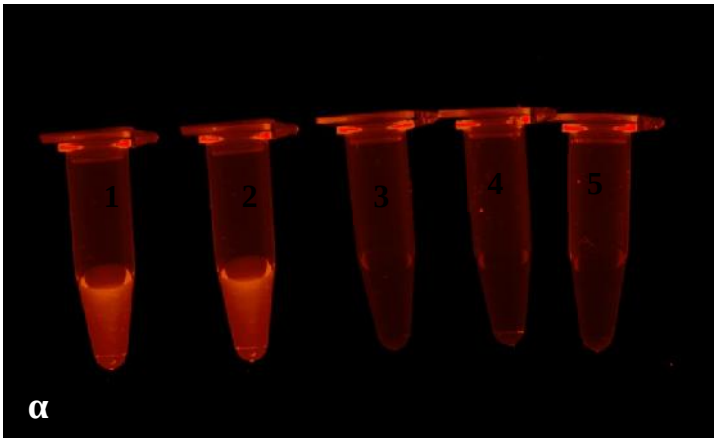

**Εικόνα 24:** Φωτογραφία της αντικειμενοφόρου πλάκας σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπου έχει γίνει ο υβριδισμός των QDs με το παράσιτο μέσω του μονοκλωνικού αντισώματος anti-Leishmania gp63 (αραίωση 1:80) (βοθρίο 9).

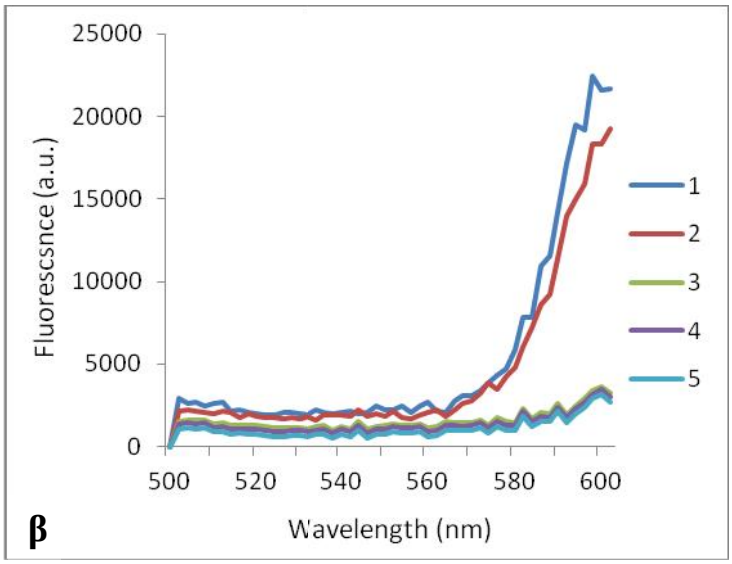



**Εικόνα 25:** Φωτογραφία της αντικειμενοφόρου πλάκας σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπου δεν έχει γίνει ο υβριδισμός των QDs με το παράσιτο (βοθρίο 11).

### 4.3.2.2 Ανίχνευση *Leishmania* spp. με QDs

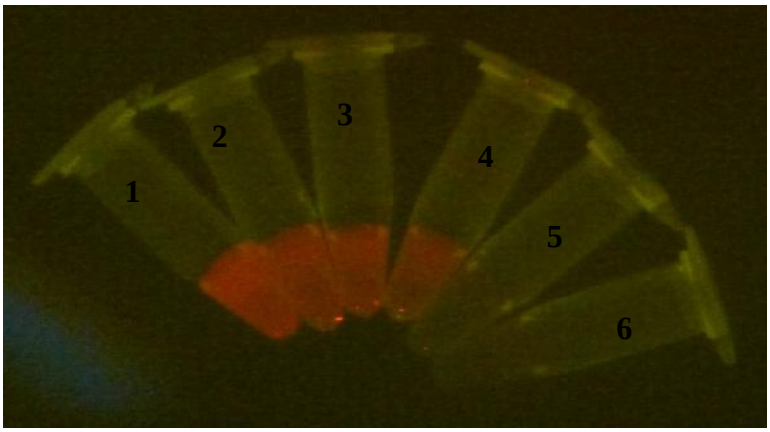
Ανιχνεύθηκαν σωστά οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (μικροβιακά παθογόνα απομονωμένα σε καλλιέργεια) τόσο διά γυμνού οφθαλμού με χρήση τράπεζας υπεριώδους ακτινοβολίας, όσο και με τη χρήση φωτομέτρου φθορισμού (Εικόνα 26).

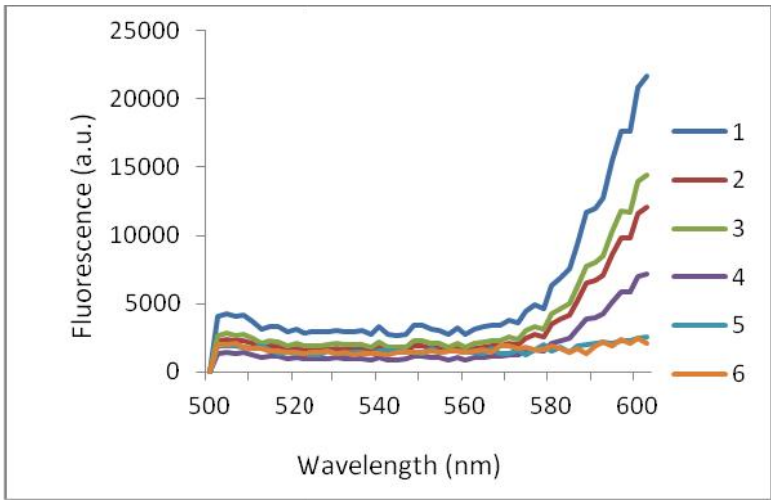





**Εικόνα 26:** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα, τα οποία καταγράφηκαν με τη μέθοδο QDs-antibody. **α)** δύο θετικά δείγματα αντιστοιχούν σε στελέχη *Leishmania* (φιαλίδια 1 και 2), τρία αρνητικά δείγματα αντιστοιχούν σε καλλιεργημένα στελέχη αρνητικών μαρτύρων (φιαλίδια 3 και 4) και ένα δείγματα που περιέχει νερό αντί για κύτταρα (φιαλίδιο 5) **β)** καμπύλες εκπομπής φθορισμού στελεχών *Leishmania* (1 και 2, με μέγιστο φθορισμού περίπου στα 605 nm) και αρνητικών μαρτύρων (3-5).

Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της μεθόδου προσδιορίστηκε στα $10^3$ κύτταρα/ml ύστερα από παρατήρηση τόσο διά γυμνού οφθαλμού με χρήση τράπεζας υπεριώδους ακτινοβολίας όσο και με μέτρηση σε φωτόμετρο φθορισμού (Εικόνα 27). Κάτω από αυτό το όριο, δεν ανιχνεύονταν θετικό αποτέλεσμα.






**Εικόνα 27:** Αποτελέσματα της μεθόδου QDs-antibody για τον καθορισμό του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης. **α)** φιαλίδια με διαδοχικές αραιώσεις (1:1 το 1:10.000) διαβαθμισμένου διαλύματος κυττάρων *Leishmania infantum* ($10^6$ κύτταρα/ml) (1-5) και αρνητικός μάρτυρας (φιαλίδιο 6) που περιείχε νερό αντί για διάλυμα κυττάρων **β)** καμπύλες εκπομπής φθορισμού δειγμάτων που αντέδρασαν θετικά (φιαλίδια 1-4, μέγιστο φθορισμού περίπου στα 605 nm) και αρνητικά (φιαλίδια 5 και 6).

# 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λεϊσμανίωση είναι μία σοβαρότατη ζωονόσος που μπορεί να έχει βαριά εξέλιξη τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το σκύλο. Για τον λόγο αυτό η έγκαιρη και ακριβής διάγνωσή της είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή αντιμετώπισή της η οποία προϋποθέτει ειδική θεραπεία. Η χρήση βιονανοσυστημάτων θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στη διευκόλυνση της ανίχνευσης του συγκεκριμένου παθογόνου σε κλινικά δείγματα καθώς τα δομικά συστατικά των μεθόδων αυτών μπορούν να αυξήσουν την ευαισθησία και την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης χωρίς τη χρήση εξειδικευμένων συσκευών υψηλού κόστους. Η έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση έχει ήδη παρουσιάσει αποτελέσματα που αναδεικνύουν τα πλεονεκτήματα της νανοτεχνολογίας στην ανάπτυξη εφαρμογών ανίχνευσης παθογόνων ή γενικότερα διαγνωστικών δεικτών (Baptista et al., 2006; Liandris et al., 2009; Gazouli et al., 2010; Chirathaworn et al., 2011; Liandris et al., 2011; Bakthavathsalam et al., 2012; Fu et al., 2013).

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε για πρώτη φορά η δυνατότητα ανίχνευσης της *Leishmania* spp. χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια χρυσού και κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου μέσω μίας τεχνικά εύκολα εφαρμόσιμης και αξιόπιστης διαδικασίας.

Σε όλες τις περιπτώσεις ανίχνευσης διαγνωστικών δεικτών, η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της σχετικής δοκιμής αναφορικά με τον αναλύτη που στοχοποιείται (Anonymous, 1996). Βάση επομένως της ανάπτυξης τέτοιου είδους εφαρμογών πρέπει να είναι πάντα η επιλογή της κατάλληλης περιοχής στόχου. Ο προσδιορισμός αυτός αναφορικά με την ανίχνευση DNA γίνεται κυρίως σε σχέση με τη δομή και τον αριθμό των αντιγράφων της περιοχής στόχου. Αυτές οι δύο παράμετροι καθορίζουν αντίστοιχα το βαθμό στον οποίο θα είναι αναγνωρίσιμος ο συγκεκριμένος δείκτης από τον ανιχνευτή του και το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης που καθιστά την ανίχνευσή του εφικτή. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι εκτός από τη μεγάλη σημασία που έχει η δομή της περιοχής στόχου αναφορικά με την πολυπλοκότητα των δευτεροταγών μορφών της και την περιεκτικότητά της σε νουκλεοτίδια αδενίνης-θυμίνης που καθορίζουν την επάρκεια υβριδισμού του ανιχνευτή στη συμπληρωματική του θέση (Erlich, 1989; Persing et al., 1993), θεμελιώδους σημασίας για την ανίχνευση με νανοσωματίδια είναι και η έκτασή της. Αυτή η παράμετρος αφορά κυρίως την περίπτωση που στην ίδια περιοχή-στόχο χρειάζεται να επικολληθούν περισσότεροι του ενός ανιχνευτές. Για τον σκοπό αυτό κρίθηκε σκόπιμο πριν την ανάπτυξη των εφαρμογών της παρούσας μελέτης να προηγηθεί ένα στάδιο με

σκοπό να επιλεγούν οι περιοχές DNA της *Leishmania* που θα ήταν κατάλληλοι στόχοι των ολιγονουκλεοτιδικών-ανιχνευτών (Andreadou et al., 2012). Σε αυτό το πλαίσιο αξιολογήθηκαν τέσσερις μέθοδοι PCR ως προς την ευαισθησία, την ειδικότητα, την επαναληψιμότητα, την αναπαραγωγιμότητα και το ελάχιστο όριο ανίχνευσής τους. Η επιλογή των συγκεκριμένων μεταξύ του μεγάλου αριθμού των μεθόδων που περιγράφονται στη σχετική βιβλιογραφία έγινε αναφορικά με την ειδικότητα των ολιγονουλεοτιδικών εκκινητών και την απόδοσή τους βάσει εκτενούς *in silico* ανάλυσης.

Από αυτό το στάδιο της μελέτης προέκυψε το εύρημα ότι μέθοδοι PCR με πολύ μικρή διαφορά μεταξύ τους αναφορικά με τη θέση της περιοχής στόχου που ανιχνεύουν και κυρίως το ελάχιστο όριο ανίχνευσης που τις χαρακτηρίζει, μπορεί να παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά ευαισθησίας. Αυτή ήταν στην προκειμένη περίπτωση αρκετά μεγάλη ώστε να είναι και στατιστικά σημαντική αναφορικά με τη μέθοδο Γ σε σχέση με τις υπόλοιπες, βάσει σύγκρισης ανά ζεύγη ($7.02x10^{-05}$ Γ/Α; $5.54x10^{-06}$ Γ/Β; $3.58x10^{-05}$ Γ/Δ). Πιο συγκριμένα με όλες τις μεθόδους PCR που εξετάστηκαν καταγράφηκαν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά τα καλλιεργημένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά διαφορετικά αναφορικά με τα κλινικά δείγματα. Το υψηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων που ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο Γ (58.1%) αποτέλεσε αιτία προβληματισμού αφού ο αριθμός των θετικών δειγμάτων που ανιχνεύτηκαν με τις άλλες τρεις μεθόδους ήταν παρόμοιος και κυμαινόταν μεταξύ 19 και 25%. Γι' αυτό το λόγο, η αξιολόγηση των δειγμάτων επαναλήφθηκε για τη μέθοδο Γ στο συνεργαζόμενο εργαστήριο στην Ιατρική Σχολή Αθηνών, όπου και επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν παραπάνω. Το γεγονός όμως που προκαλεί εντύπωση είναι ότι αυτό το μεγάλο επίπεδο διακύμανσης της ευαισθησίας καταγράφηκε και μεταξύ μεθόδων που παρουσίαζαν πολύ μικρή και σαφώς στατιστικά ασήμαντη διαφορά ελαχίστου ορίου ανίχνευσης (ΕΟΑ). Αξίζει να σημειωθεί σχετικά ότι το ΕΟΑ προσδιορίστηκε για τις μεθόδους Α-Δ αντίστοιχα στα 30.7, 5, 3.7 και 5 προμαστιγωτά/ml. Κατά συνέπεια η μικρότερη ευαισθησία της μεθόδου Α ήταν μάλλον αναμενόμενη, αλλά το γεγονός ότι η σχετική ευαισθησία των Β και Δ ως προς τη Γ ήταν μόλις 43% και 40% αντίστοιχα επαληθεύει μάλλον τη σκοπιμότητα διεξαγωγής της παρούσας προκαταρτικής μελέτης. Η απόκλιση της απόδοσης των μεθόδων Α, Β και Δ συγκριτικά με τη μέθοδο Γ θα μπορούσε να οφείλεται στο ότι η πολλαπλασιαζόμενη περιοχή DNA της τελευταίας είναι πιο συντηρημένη μεταξύ των ειδών της *Leishmania* τουλάχιστον όσον αφορά τα

στελέχη που βρίσκονται συνήθως στην γεωγραφική περιοχή της Αθήνας και της Κρήτης από όπου έγινε η δειγματοληψία (Ready, 2010).

Αντιθέτως προς την ευαισθησία, η ειδικότητα των υπό σύγκριση μεθόδων παρουσίασε μικρή διακύμανση γεγονός που είναι ενδεικτικό ότι όλες τους είναι μάλλον επαρκείς ως προς το συγκεκριμένο ποιοτικό κριτήριο. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε αναφορικά και με την εκτίμηση της επαναληψιμότητας. Αναφορικά με την τελευταία, τα αποτελέσματα για τα οποία δεν υπήρξε συμφωνία με τα αντίστοιχα της PCR αφορούσαν αποκλειστικά σε μεγάλες αραιώσεις των θετικών μαρτύρων οι οποίοι μπορεί να αντέδρασαν αρνητικά λόγω σφάλματος του χειριστή είτε λόγω πολύ χαμηλής συγκέντρωσης της περιοχής στόχου. Αυτός ο παράγοντας ήταν άλλωστε αναμενόμενο ότι μπορεί να αποτελέσει αίτιο ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων των υπό σύγκριση μεθόδων δεδομένου ότι το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της καθεμίας από αυτές ήταν διαφορετικό. Η συμφωνία αναφορικά με την επαναληψιμότητα του αποτελέσματος της ανάλυσης των αρνητικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, είναι ενδεικτική της υψηλής ειδικότητας των μεθόδων που εξετάστηκαν και της αποτελεσματικότητας των μέτρων που εφαρμόστηκαν για την αποφυγή της παθητικής μεταφοράς προϊόντων ενίσχυσης προηγούμενων αντιδράσεων PCR (carry over effect).

Ένα όμως εύρημα εξίσου σημαντικό σε σχέση με τα προβλήματα που μπορεί να συνεπάγεται η εφαρμογή για διαγνωστικό σκοπό μεθόδων PCR, και επομένως ένα ενδεχομένως συγκριτικό πλεονέκτημα των προτεινόμενων μεθόδων νανοτεχνολογίας, προέκυψε από τη μελέτη της αναπαραγωγιμότητας. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η εκτίμηση της παραμέτρου αυτής περιλάμβανε δύο επίπεδα, την εφαρμογή των μεθόδων με αντιδραστήρια του ίδιου και διαφορετικών κατασκευαστών. Η αναπαραγωγιμότητα των μεθόδων Α-Γ στην πρώτη περίπτωση ήταν εξαιρετική, με το μόνο ασύμφωνο αποτέλεσμα να αφορά σε ένα πολύ αραιωμένο θετικό δείγμα. Το αποτέλεσμα όμως δεν ήταν το ίδιο όταν χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια διαφορετικού κατασκευαστή, ειδικά με τη μέθοδο Α με την οποία υπήρξε αξιοσημείωτη ασυμφωνία αναφορικά με 4 θετικά δείγματα. Αυτή η ασυμφωνία μπορεί μεν να οφείλεται και πάλι σε σφάλμα του χειριστή αν και μάλλον σχετίζεται με το γεγονός ότι κάποιες τεχνικές PCR για λόγους αδιευκρίνιστους, αποδεικνύονται συχνά στην πράξη περισσότερο ευαίσθητες απ’ ότι άλλες σε αλλαγές των χημικών συστατικών τους ή και του θερμοκρασιακού τους πρωτοκόλλου.

Έχοντας ολοκληρώσει αυτό τα στάδιο της μελέτης είχε καταστεί σαφές ότι παρά τη συγκριτική ανωτερότητα της μεθόδου Γ, και οι άλλες τρεις θα προσέδιδαν στην υπό

ανάπτυξη εφαρμογή επαρκή ειδικότητα, επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα. Δεδομένου ότι όπως αναφέρθηκε παραπάνω η χρήση νανο-σωματιδίων ως μοριακών ανιχνευτών εισαγάγει αναγκαστικά και τον παράγοντα του μεγέθους και της δομής της περιοχής στόχου στο σχεδιασμό της αντίστοιχης διαδικασίας, κρίθηκε σκόπιμο βάσει των ανωτέρω να μην αποκλειστεί για το επόμενο στάδιο καμία από τις υπό αξιολόγηση περιοχές στόχους. Αυτό άλλωστε ήταν συμβατό και με την κατεύθυνση της παρούσας μελέτης δεδομένου ότι αυτή δεν μπορούσε να αποσκοπεί στην ανάπτυξη μίας μεθόδου για άμεση εμπορική χρήση, αλλά στη διερεύνηση του τρόπου εφαρμογής της μέχρι του επιπέδου της απόδειξης της δυνατότητας χρήσης της (proof-of-principle). Για τον λόγο αυτό σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτίδια ανιχνευτές για σύνδεση με νανοσωματίδια αναφορικά με όλες τις υπό μελέτη περιοχές στόχους. Βάσει της αξιολόγησης που ακολούθησε κυρίως ως προς τη δυνατότητα σύνδεσης επαρκούς αριθμού ανιχνευτών στην περιοχή στόχου ώστε να εξασφαλίζεται για γυμνού οφθαλμού ανίχνευση, συγκριτικά πλεονεκτικότερη αναδείχθηκε η περιοχή ενίσχυσης της μεθόδου Α για χρήση με τα νανοσωματίδια χρυσού, και η αντίστοιχη της Γ για τα QDs. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο ότι η χρωματαγραφική ανίχνευση που επιτυγχάνεται με τη χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού απαιτεί μεγαλύτερο αριθμό ανιχνευτών για να καταστεί εμφανής, κάτι που δεν κατέστη δυνατό να επιτευχθεί με την περιοχή ενίσχυσης της μεθόδου Γ λόγω μεγέθους και νουκλεοτιδικής σύστασης. Με αυτό ως δεδομένο ήταν σαφές ότι η τελική διαδικασία ανίχνευσης με νανοσωματίδια χρυσού ίσως να μην είχε τη μέγιστη δυνατή ευαισθησία κάτι που θα εξασφάλιζε ενδεχομένως η χρήση της περιοχής ενίσχυσης της μεθόδου Γ, αλλά δεν θα προσέδιδε ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης αλλά ούτε και ψευδώς αρνητικά λόγω της σύστασης και της δευτεροταγούς δομής της περιοχής στόχου. Άλλωστε το γεγονός ότι στο πλαίσιο της προτεινόμενης μεθόδου, τα νανοσωματίδια χρυσού συνδέθηκαν με 4 ανιχνευτές διαφορετικών τμημάτων της περιοχής στόχου διασφαλίζει πολύ υψηλό επίπεδο ειδικότητας.

Ειδικά για τη μέθοδο ανίχνευσης DNA με νανοσωματίδια χρυσού χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ολιγονουκλεοτιδικοί-ανιχνευτές. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε καλλιεργημένα στελέχη *Leishmania* και σε κλινικά δείγματα για να διαπιστωθεί αν η διακύμανση του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης που σχετίζεται με την επιλογή της περιοχής στόχου έχει κλινική σημασία ή είναι μεγέθους τέτοιου που καθιστά τη διαφορά σημαντική μόνο σε επίπεδο εργαστηριακών μετρήσεων. Για τον λόγο αυτό επιλέχτηκε ως υλικό ανίχνευσης το αίμα, καθώς περιέχει συνήθως το παθογόνο σε

χαμηλή συγκέντρωση σε σχέση με τα λεμφογγάγλια ή τον μυελό των οστών (le Fichoux et al., 1999). Κατά συνέπεια η χρήση του αίματος θα παρείχε μία ένδειξη της κλινικής χρηστικότητας της διαγνωστικής προσέγγισης που αναπτύσσεται στην παρούσα μελέτη στην πράξη, αναφορικά με ένα είδος δείγματος που καθιστά το ελάχιστο όριο ανίχνευσης μία κρίσιμη παράμετρο της κλινικής ευαισθησίας.

Βάσει του αποτελέσματος διαπιστώθηκε η απόλυτη ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου στην ανίχνευση των καλλιεργημένων στελεχών τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών μαρτύρων. Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας αίμα ως κλινικό δείγμα, υποδηλώνουν ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου σε σχέση με την PCR δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η συμφωνία των δύο μεθόδων αναφορικά με τα θετικά αποτελέσματα της PCR έφθασε το 80%, το οποίο δηλώνει ότι η χρήση της προτεινόμενης μεθόδου καλύπτει την τυπική απαίτηση για ευαισθησία στην κλινική διαγνωστική πρακτική.

Προφανώς το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθόδου είναι υψηλότερο από αυτό της PCR που χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς, γεγονός που ήταν αναμενόμενο καθώς οι τεχνικές PCR μέσω του πολλαπλασιασμού του DNA, μπορούν να ανιχνεύσουν πολύ μικρές ποσότητες DNA-στόχου. Εντούτοις, το σχετικό αυτό μειονέκτημα της μεθόδου AuNPs-probes όσον αφορά το ελάχιστο όριο ανίχνευσης αντισταθμίζεται από το γεγονός ότι είναι απλούστερη στην εφαρμογή, τα αντιδραστήρια κοστίζουν δύο φορές λιγότερο και μπορεί να ολοκληρωθεί σε 30 λεπτά. Επιπλέον, η τεχνική AuNPs-probes δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό, χώρο ή εξειδικευμένο προσωπικό και το γεγονός ότι συμπεριλαμβάνει τέσσερις νανοανιχνευτές ελαχιστοποιεί την ανάγκη για επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων, κάτι που συνήθως απαιτείται για τις συμβατικές μεθόδους PCR και επιτελείται με τη διαδικασία του καθορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος ενίσχυσης (Anonymous, 2002; Ikonomopoulos, 2012).

Ένα θεμελιώδες μειονέκτημα των μεθόδων που σχεδιάζονται για την ανίχνευση μικροβιακού γενετικού υλικού είναι ότι επειδή αυτό είναι συνήθως δύσκολο να εντοπιστεί έχουν τελικά χαμηλή αρνητική προγνωστική αξία. Αντίθετα, μέθοδοι που σχεδιάζονται για την ανίχνευση του μικροβιακού αποτυπώματος στον οργανισμό όπως είναι για παράδειγμα τα αντισώματα που είναι πολύ διαδεδομένα σε ζώα με ενεργό λοίμωξη, χαρακτηρίζονται από μεγάλη αρνητική προγνωστική αξία αλλά συνήθως μικρή θετική, δεδομένου ότι η ανάδειξη της παρουσίας αντισωμάτων δεν αποτελεί απαραιτήτως απόδειξη ύπαρξης λοίμωξης. Επομένως μία μέθοδος που θα μπορούσε να

συνδυάσει ανίχνευση δεικτών μεγάλης θετικής αλλά και αρνητικής προγνωστικής αξίας θα ήταν πολύτιμη για τον κλινικό κτηνίατρο/γιατρό. Για τον λόγο αυτό η παρούσα μελέτη επεκτάθηκε στην ανάλυση της χρήσης και των κβαντικών κοκκίων σεληνιούχου καδμίου.

Τα κβαντικά κοκκία σεληνιούχου καδμίου αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο διαγνωστικό εργαλείο, καθώς ανήκουν σε μια ομάδα φθοριζουσών σωματιδίων με μοναδικές ιδιότητες. Το κύριο πλεονέκτημά τους έναντι των συμβατικών χρωστικών ουσιών είναι η αυξημένη τους φωτεινότητα και φωτοσταθερότητα, ενώ με κατάλληλο σχεδιασμό μπορεί να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση DNA αλλά και πρωτεϊνών. Στις δύο αυτές εφαρμογές χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον και μαγνητικά σφαιρίδια. Αυτά στην πρώτη περίπτωση ήταν συνδεδεμένα με έναν συμπληρωματικό προς την περιοχή στόχο ολιγονουκλεοτιδικό-ανιχνευτή, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ήταν συνδεδεμένα με ένα ειδικό αντίσωμα για τη *Leishmania* spp. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις η σύνδεση έγινε μέσω του συμπλόκου βιοτίνης-στρεπταβιδίνης ώστε να επιτευχθεί η συγκράτηση των συμπλόκων στο διάλυμα παρά τις εκπλύσεις που μεσολαβούν.

Για την ανίχνευση του DNA της *Leishmania* με τα QDs σχεδιάστηκαν δύο ολιγονουκλεοτιδικοί-ανιχνευτές ο συνδυασμός των οποίων επιτρέπει όπως και στην περίπτωση των νανοσωματιδίων χρυσού, ανίχνευση χωρίς την προϋπόθεση της ενίσχυσης της περιοχής στόχου. Η ανίχνευση χωρίς την ανάγκη ενίσχυσης είναι ένα σημαντικό πρακτικό πλεονέκτημα των προτεινόμενων εφαρμογών όχι μόνο λόγω κόστους αλλά και πολυπλοκότητας, δεδομένου ότι η ενίσχυση που διενεργείται μέσω PCR αυξάνει πολύ την πιθανότητα επιμολύνσεων. Αυτές προκαλούνται επειδή λόγω των επαναλήψεων της μεθόδου διαδίδονται μέσα στο χώρο του εργαστηρίου προϊόντα ενίσχυσης προηγούμενων αντιδράσεων (carry over effect) που αποτελούν πηγή ψευδώς θετικών αντιδράσεων. Η αποφυγή των τελευταίων προϋποθέτει τη διάθεση υλικών και χώρου αποκλειστικής χρήσης για PCR, η οποία θα πρέπει να εφαρμόζεται από προσωπικό πολύ καλά εκπαιδευμένο. Αυτοί οι παράγοντες οδηγούν για λόγους ευνόητους σε μεγάλη αύξηση του κόστους χρήσης της PCR. Ακριβώς ανάλογο είναι και το θέμα που δημιουργείται λόγω της παρουσίας εντός πολλών ειδών κλινικών δειγμάτων ουσιών που δρουν ανασταλτικά της ενίσχυσης που επιτελείται μέσω της PCR οι οποίες προκαλούν αποτελέσματα ψευδώς αρνητικά. Η αποφυγή πάντως και αυτού του σφάλματος προϋποθέτει επίσης ειδική τακτική κατά την εφαρμογή της PCR, ώστε το αποτέλεσμα να είναι αξιόπιστο.

Υπ’ αυτή την έννοια η μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία που διαπιστώθηκε από το αποτέλεσμα της χρήσης κβαντικών κοκκίων για την ανίχνευση αλληλουχιών DNA της *Leishmnia* spp., ήταν μάλλον αναμενόμενη δεδομένου ότι όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μέθοδος αυτή δεν περιλαμβάνει ενίσχυση DNA και για το λόγο αυτό δεν είναι επιρρεπής στο φαινόμενο μεταφοράς (carry over effect) ή στο αποτέλεσμα της δράσης αναστολέων. Ο συνδυασμός άλλωστε των μαγνητικών σφαιριδίων και των 2 κβαντικών ανιχνευτών που επικολλούνται σε διαφορετικά σημεία της περιοχής στόχου καθιστούν την ανίχνευση πολύ ειδική και ευαίσθητη αν και η αξιολόγηση έγινε μόνο σε παθογόνα απομονωμένα σε καλλιέργεια που συνήθως ανιχνεύονται πιο εύκολα επειδή βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ή σε πιο καθαρή μορφή απ’ ότι σε ένα σύνηθες δείγμα. Παρόλα αυτά θα πρέπει να αναφερθεί ότι το επίπεδο του ελαχίστου ορίου ανίχνευσης που καταγράφηκε ήταν 3,125 ng/μl το οποίο αντιστοιχεί περίπου σε 30.000 παράσιτα (Verma et al., 2010) και είναι σημαντικό μικρότερο σε σχέση με το ελάχιστο όριο ανίχνευσης που εξασφαλίστηκε με τη χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού (11,5 ng/μl). Η καλύτερη επίδοση αναφορικά με το ΕΟΑ των QDs ήταν αναμενόμενη, κυρίως λόγω του ειδικού τρόπου κατασκευής τους που τα καθιστά 20 φορές φωτεινότερα από τους παραδοσιακούς ανιχνευτές φθορισμού. Επίσης σημαντικό πρέπει να θεωρηθεί σε σχέση με την αιτιολόγηση αυτής της διαφοράς ΕΟΑ το ότι τα QDs φθορίζουν και επομένως ανιχνεύονται πολύ πιο εύκολα τόσο δια γυμνού οφθαλμού με χρήση τράπεζας υπεριώδους φωτός όσο και με φωτόμετρα φθορισμού. Άλλωστε δεν θα πρέπει να παραβλεφθεί και το γεγονός ότι η περιοχή επικόλλησης των ανιχνευτών QDs ήταν αυτή που ενισχύεται από τη μέθοδο Γ η οποία διαπιστωμένα εξασφάλιζε πολύ χαμηλότερο ΕΟΑ από την αντίστοιχη της μεθόδου Α που χρησιμοποιήθηκε για τους λόγους που προαναφέρθηκαν με τα νανοσωματίδια χρυσού.

Είναι πάντως αξιοσημείωτο ότι ενώ οι δύο μέθοδοι ανίχνευσης DNA παρουσιάζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά (ανίχνευση DNA με ολιγονουκλεοτίδια παραπλήσιου μεγέθους συνδεδεμένα με νανοσωματίδια), η αλλαγή και μόνο του είδους των νανοσωματιδίων και της περιοχής στόχου επέφερε βελτίωση του ΕΟΑ κατά περίπου 40%. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό ότι υπάρχει πολύ μεγάλο περιθώριο περαιτέρω βελτίωσης του συγκεκριμένου θεμελιώδους χαρακτηριστικού αυτών των μεθόδων ανίχνευσης με τη χρήση δομικά βελτιωμένων νανοσωματιδίων σε συνδυασμό με χαρακτηριστικές για το συγκεκριμένο είδος παρασίτου περιοχές στόχου, και ακριβέστερης μεθόδου ανίχνευσης του θετικού σήματος. Θα πρέπει πάντως να αναφερθεί εδώ ότι η συγκέντρωση παρασίτων σε δείγματα ιστού ανθρώπων και ζώων

που εξετάζονται στο πλαίσιο της διαγνωστικής διερεύνησης περιστατικών λεισμανίωσης κυμαίνεται συνήθως αναλόγως του είδους του δείγματος και του περιστατικού, από πολλές εκατοντάδες έως αρκετές χιλιάδες κύτταρα ανά ml ή mg υλικού (Mary et al., 2004; Verna et al., 2010). Αυτό μάλιστα ισχύει ακόμη και για το αίμα για το οποίο αν και σε σύγκριση με άλλα είδη κλινικών δειγμάτων θεωρείται ότι περιέχει το παράσιτο σε μικρότερη συγκέντρωση, αναφέρεται ότι συχνά περιέχει πληθυσμούς παρασίτων της τάξης των $10^5$ ανά ml (Verna et al., 2010). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το πολύ χαμηλό ελάχιστο όριο των μεθόδων PCR είναι σαφώς ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό τους αλλά δεδομένου ότι επιφέρει λόγω της ενίσχυσης της περιοχής στόχου, τα προβλήματα χρήσης που αναφέρθηκαν παραπάνω, ίσως να μην είναι και τόσο σημαντικό τουλάχιστον για διαγνωστικούς σκοπούς. Η βελτίωση δε του ΕΟΑ των μεθόδων νανοτεχνολογίας που αναφέρονται εδώ με τον τρόπο που προτείνεται παραπάνω χωρίς δηλαδή τη χρήση ενίσχυσης της περιοχής στόχου αλλά εστιάζοντας στις τεχνικές παραμέτρους της ανίχνευσης, ίσως να αποτελέσει τελικά και το σημείο κλειδί της επικράτησής τους σε εφαρμογές καθημερινής διάγνωσης.

Για την εφαρμογή τέλος με την οποία επιχειρήθηκε η ανίχνευση όχι του DNA αλλά ενός επιφανειακού αντιγόνου του παρασίτου με τα QDs σχεδιάστηκε ένα διαφορετικό σύστημα προσέγγισης. Λόγω έλλειψης ειδικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με βιοτίνη για τη *Leishmania*, η σύνδεση των μαγνητικών σφαιριδίων και των κβαντικών κοκκίων με το παράσιτο πραγματοποιήθηκε μέσω δύο επιπλέον βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων. Τα δύο ειδικά έναντι της *Leishmania* αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (anti-Leishmania LPG, mouse IgM, Acris, Herford, Germany/ anti-Leishmania gp63, mouse IgG2a, Acris, Herford, Germany) επιλέχθηκαν βάσει της εμπορικής τους διαθεσιμότητας και των ειδικών χαρακτηριστικών τους. Ειδικότερα αναφέρεται ότι η επιφάνεια της *Leishmania* καλύπτεται με διάφορα πρωτεϊνικής κυρίως σύστασης μόρια που ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του παρασίτου (Ferguson et al., 1993). Τα προκυκλικά promastigotά επικαλύπτονται με ένα γλυκοκάλυκα πάχους 7 nm, ενώ στα μολυσματικά μετακυκλικά promastigotά ο γλυκοκάλυκας έχει πάχος τουλάχιστον 17 nm. Αυτή η επικάλυψη είναι σχεδόν εντελώς απούσα στα αμαστιγωτά, υποδηλώνοντας ότι ο γλυκοκάλυκας του promastigotού κυττάρου αποτελεί μια δομή ειδική για αυτό το στάδιο, η οποία μπορεί να χάνεται μετά τη φαγοκυττάρωση και τον ενδοκυτταρικό μετασχηματισμό (Pimenta et al., 1991). Ο γλυκοκάλυκας αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες, μέλη της οικογένειας των γλυκοϊνοσιτολών φωσφολιπιδίων (glycoinositol phospholipids, GIPLs) και λιποφωσφογλυκάνες (lipophosphoglycans,

LPG) (McConville et al., 1993a; McConville et al., 1993b). Όλη αυτή η δομή είναι ειδική για τα είδη της *Leishmania* και αποτελεί το πρώτο αντιγόνο που έρχεται σε επαφή με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (McConville et al., 1992; Schneider et al., 1993; McConville et al., 1995).

Η λιποφωσφογλυκάνη LPG και η μεταλλοπρωτεάση gp63 είναι πρωτεΐνες στην επιφάνεια του παρασίτου στην πρωτεολυτική δράση των οποίων οφείλεται η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός του παρασίτου μέσα στα φαγολυσοσώματα των μακροφάγων (Chang and McGwire, 2002). Πιο συγκεκριμένα, η LPG είναι το πιο άφθονο γλυκο-σύμπλοκο (glycoconjugate) στην επιφάνεια του προμαστιγωτού της *Leishmania* με 5 εκατομμύρια αντίγραφα ανά κύτταρο. Το μόριο αυτό είναι ειδικό για το στάδιο του προμαστιγωτού και είτε ανευρίσκεται σε μικρή ποσότητα ή είναι τελείως ανύπαρκτο στο στάδιο του αμαστιγωτού (McConville and Blackwell, 1991; Turco and Sacks, 1991). Η LPG είναι υπεύθυνη για την αναστολή της βιοσύνθεσης των φαγολυσοσωμάτων (Desjardins and Descoteaux, 1997). Αποτελείται από ένα επαναλαμβανόμενο τμήμα Gal(β1,4)Man(α1-PO4→6), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα 1-*O*-alkyl-2- *lyso*-phosphatidyl*(myo)*inositol (PI) μέρος μέσω ενός πολυσακχαριτικού πυρήνα (Descoteaux and Turco, 1999). Στο τέλος του επαναλαμβανόμενου τμήματος υπάρχει ένα μικρό κενό αποτελούμενο από ουδέτερους ολιγοσακχαρίτες, κυρίως γαλακτόζη και υπολείμματα μαννόζης. Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων τμημάτων ποικίλει από 16 με 30 ανά μόριο LPG, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του προμαστιγωτού (προκυκλικό ή μετακυκλικό) και με το είδος της *Leishmania*. Το PI τμήμα και ο πολυσακχαριτικός πυρήνας είναι εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές ανάμεσα στα είδη της *Leishmania* (McConville et al., 1990). Αντιθέτως, το τμήμα των ολιγοσακχαριτών παρουσιάζει διαφοροποίηση ανάμεσα στα είδη, αναφορικά με τη σύνθεση και την αλληλουχία του. Επιπλέον, πολύ σημαντικές διαφορές στη δομή της LPG ανάμεσα στα διάφορα είδη της *Leishmania* βρίσκονται στα επαναλαμβανόμενα τμήματα. Παρόλο που στη *L. donovani* η LPG ακολουθεί τη βασική Gal(β1,4)Man(α1-PO4→6) επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (Thomas et al., 1992), στα άλλα είδη τα μόρια LPG έχουν επιπρόσθετα σακχαριτικές πλευρικές αλυσίδες οι οποίες διακλαδίζονται στις θέσεις C3 των υπολειμμάτων γαλακτόζης. Η δομή της LPG είναι διαφορετική ανάμεσα στα είδη της *Leishmania* άλλα και ανάμεσα στα προμαστιγωτά του ίδιου είδους.

Η γλυκοπρωτεΐνη gp63 (63kDa) είναι μία ψευδάργυρο-εξαρτώμενη μεταλλοπρωτεάση, η οποία έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη δράση των πρωτεολυτικών

ενζύμων των φαγολυσοσωμάτων (Sorensen et al., 1994). Η gp63 είναι η πιο άφθονη γλυκοπρωτεΐνη στην επιφάνεια του παρασίτου η οποία εκφράζεται με περισσότερα από 500.000 αντίγραφα (0.5-1% του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου) και ανευρίσκεται σε ολόκληρο το προμαστιγωτό, συμπεριλαμβανομένου και του μαστιγίου. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει την είσοδο του παρασίτου στα μακροφάγα, προάγοντας τη φαγοκυττάρωση και την επιβίωσή του μέσα σε αυτά (Brittingham et al., 1995). Η gp63 αποτελεί μία συντηρημένη γλυκοπρωτεΐνη καθώς παρουσιάζει δομική ομολογία μεταξύ των ειδών της *Leishmania*. Συνδέεται στην επιφάνεια του παρασίτου με ένα μόριο φωσφατιδυλινοσιτόλης. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του παρασίτου καθώς αποδομεί τον παράγοντα C3 του συμπληρώματος που εναποτίθεται στην επιφάνεια των προμαστιγωτών πριν εισβάλλουν στα μακροφάγα (Chaudhuri & Chang, 1988).

Η LPG και η gp63 φαίνεται ότι δρουν συμπληρωματικά και πυροδοτούν την ανοσοποιητική απόκριση στη *Leishmania* (Zambrano-Villa et al., 2002). Η LPG, οι GPILs και η gp63 θεωρούνται τα πρώτα υποστρώματα που συναντά το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Είναι ικανά να προκαλέσουν έντονη ανοσιακή απόκριση και γι' αυτό το λόγο έχουν χρησιμοποιηθεί για την ορολογική διάγνωση του παρασίτου αλλά και για την ανάπτυξη εμβολίων (Handman et al., 1990; Nascimento et al., 1990; Tonui et al., 2001; Bhowmick et al., 2008; Sinha et al., 2011).

Βάσει των ανωτέρω γίνεται αντιληπτό ότι η επιλογή των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν εδώ για σύμπλοκα είναι καθοριστικής σημασίας στη διαμόρφωση της απόδοσης της τελικής μεθόδου ανίχνευσης. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των αντιτύπων της κάθε πρωτεΐνης καθορίζει το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ενώ η διασπορά της στα διάφορα είδη και μορφές του πρωτόζωου, την ειδικότητα.

Προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα και η σταθερότητα των δύο συμπλόκων, πραγματοποιήθηκε ειδική ανάλυση με χρήση οπτικού μικροσκοπίου και μικροσκοπίου φθορισμού ώστε να επαληθευτεί η επικόλληση των δομικών συστατικών των ανιχνευτών, μεταξύ τους. Από το αποτέλεσμα αυτής της αξιολόγησης φάνηκε ο επιτυχής υβριδισμός τόσο των μαγνητικών σωματιδίων όσο και των κβαντικών κοκκίων με αντιγονικές περιοχές του παρασίτου. Με τη η οποία βασίστηκε στη χρήση αυτή τη φορά συμπλόκων QDs με αντισώματα κατέστη δυνατή η άμεση ανίχνευση πρωτεϊνών στην επιφάνεια του παρασίτου σε όλα τα υλικά αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν, με απόλυτη ειδικότητα. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί έναντι των προηγούμενων ως προς το ότι μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε ένα κλινικό υλικό

χωρίς την ανάγκη επεξεργασίας του όπως συμβαίνει στην περίπτωση μεθόδων ανίχνευσης DNA. Επίσης είναι δυνατό με ελάχιστη τροποποίηση των ανιχνευτών αλλά με την ίδια ακριβώς διαδικασία να επιτευχθεί η ανίχνευση και αντισωμάτων με τρόπο απλό και ακριβή. Θα πρέπει άλλωστε να σημειωθεί ότι η ανίχνευση του αποτελέσματος και για τη συγκεκριμένη διαδικασία μπορεί να γίνει με απλή παρατήρηση ή για μεγαλύτερη ευαισθησία μέσω οποιασδήποτε συσκευής ανίχνευσης φθορισμού.

Οι τρεις μέθοδοι που περιγράφηκαν στην παρούσα μελέτη παρέχουν έναν εύκολο, γρήγορο και οικονομικό τρόπο για την ανίχνευση μελών του γένους *Leishmania* με τη χρήση διαφόρων τύπων νανο-ανιχνευτών. Οι προτεινόμενες μέθοδοι μπορεί να αποτελέσουν βάση για την ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων ρουτίνας για χρήση ιδίως σε ενζωοτικές περιοχές με χαμηλούς οικονομικούς πόρους, όπου δεν αποτελεί προτεραιότητα η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων του παρασίτου. Επίσης, θα μπορούσαν εύκολα να εφαρμοστούν σε κλινικά δείγματα για την ανίχνευση οποιονδήποτε άλλων παθογόνων καθώς αυτό προϋποθέτει μόνο την τροποποίηση των νανο-ανιχνευτών για κάθε παθογόνο.

## Καινοτόμος χαρακτήρας

- Διεξήχθη η πρώτη συγκριτική μελέτη μεθόδων ανίχνευσης *Leishmania* spp. που συνδύαζε δύο συμβατικές PCR, μία real time PCR και ένα εμπορικά διαθέσιμο PCR kit, εξετάζοντας παράλληλα την ευαισθησία, την ειδικότητα, το ελάχιστο όριο ανίχνευσής τους, την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητά τους, χρησιμοποιώντας τόσο καλλιεργημένα στελέχη όσο και κλινικά δείγματα.
- Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μέθοδος ανίχνευσης DNA *Leishmania* spp. χωρίς την ανάγκη ενίσχυσης αυτού, με χρήση νανοσωματιδίων χρυσού, η οποία εφαρμόστηκε και σε κλινικά δείγματα.
- Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μέθοδος ανίχνευσης DNA *Leishmania* spp. με χρήση κβαντικών κοκκίων σεληνιούχου καδμίου χωρίς την ανάγκη ενίσχυσης του DNA.
- Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μέθοδος ανίχνευσης αντιγόνων της *Leishmania* spp. με χρήση κβαντικών κοκκίων σεληνιούχου καδμίου.

# 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Acedo-Sánchez C., Martın-Sánchez J., Vélez-Bernal I.D., Sanchís- Marín M.C., Louassini M., Maldonado J.A., Morillas- Márquez, F., (1996). Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, Southern Spain). *International journal for parasitology* 25: 303–310.
2. Alivisatos A.P., (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals and quantum dots. *Science* 271: 933-937.
3. Alivisatos A.P., (2008). Birth of nanoscience building block. *ACS nano* 2: 1514-1516.
4. Altman D.G., Bland J.M., (1994). Diagnostic tests 1: Sensitivity and specificity. *BMJ* 308:1552.
5. Alvar J., (2001). Las Leishmaniasis: De la Biología al Control Laboratorios Intervet S.A. Salamanca.
6. Alvar J., Capavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J., (2004). Canine Leishmaniasis. *Advances in parasitology* 57:1-88.
7. Alvar J., Vélez I.D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., den Boer M., (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7: e35671.
8. Amela C., Mendez I., Torcal J.M., Medina G., Pachón I., Cañavate C., Alvar J., (1995). Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European journal of epidemiology* 11: 157–161.
9. Andreadou M., Liandris E., Kasampalidis I.N., Taka S., Antoniou M., Ntais P., Vaiopoulou A., Theodoropoulos G., Gazouli M., Ikonomopoulos J., (2012). Evaluation of the performance of selected in-house and commercially available PCR and real-time PCR assays for the detection of *Leishmania* DNA in canine clinical samples. Experimental parasitology 131: 419-424.
10. Andreadou M., Liandris E., Gazouli M., Taka S., Antoniou M., Theodoropoulos G., Tachtsidis I., Goutas N., Vlachodimitropoulos D., Kasampalidis I., Ikonomopoulos J., (2013). A novel non-amplification assay for the detection of *Leishmania* spp. in clinical samples using gold nanoparticles. *Journal of microbiological methods* [Epub ahead of print].
11. Anonymous, (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (ISO

5725–2:1994). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

12. Anonymous, (1996). Analytical detection limit guidance & laboratory guide for determining method detection limits. Wisconsin Department of Natural Resources, Wisconsin, USA
13. Anonymous, (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs, Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens, General method and specific requirements, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
14. Ashford D.A., David J.R, Freire M., David R., Sherlock I., Eulálio M.C., Sampaio D.P., Badaro R., (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59: 53–57.
15. Bakthavathsalam P, Rajendran V.K., Mohammed J.A.B., (2012). A direct detection of *Escherichia coli* genomic DNA using gold nanoprobes. *Journal of Nanobiotechnology* 10:8.
16. Baneth G., Day M. J., Roura X., Shaw S., (2005). Leishmaniosis In: Arthropod - borne infectious diseases of the dog and cat. Shaw, S., Day, M. J. (eds) Manson Publishing, London, p. 89-99.
17. Baptista P.V., Koziol-Montewka M., Paluch-Oles J., Doria G., Franco R., (2006). Goldnanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples. *Clinical chemistry* 52: 1433-1434.
18. Barbiéri C.L., (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite immunology* 28: 329–337.
19. Bern C., Joshi A.B., Jha S.N., Das M.L., Hightower A., Thakur G.D., Bista M.B., (2000). Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 63:184–188.
20. Berrahal F., Mary C., Roze M., Berenger A., Escoffier K., Lamouroux D., Dunan S., (1996). Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 55:273-277.

21. Bettini S., Pozio E., Gradoni L., (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (II) Leishmania from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 74: 77–83.
22. Bhowmick S., Ravindran R., Ali N., (2008). Gp63 in Stable Cationic Liposomes Confers Sustained Vaccine Immunity to Susceptible BALB/c Mice Infected with *Leishmania donovani*. *Infection and immunity* 76: 1003-1015.
23. Blavier A., Keroack S., Denerolle P., Goy-Thollot I., Chabanne L., Cadore J.L., Bourdoiseau G., (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *Veterinary journal* 162: 108–120.
24. Boelaert M., Rijal S., Regmi S., Singh R., Karki B., Jacquet D., Chappuis F., Campino L., Desjeux P., Le Ray D., Koirala S., Van der Stuyft P., (2004). Comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70: 72-77.
25. Brittingham A., Morrison C.J, McMaster W.R., McGwire B.S., Chang K.P., Mosser D.M., (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complementmediated lysis. *Journal of immunology* 155: 3102–3111.
26. Buhro W.E., Colvin V.L., (2003). Semiconductor nanocrystals: Shape matters. *Nature materials* 2: 138-139.
27. Carvalho S.F., Lemos E.M., Corey R., Dietze R., (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 68: 321-324.
28. Castellano L.R., Filho D.C., Argiro L., Dessein H., Prata A., Dessein A., Rodrigues V., (2009). Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Humain immunology* 70:383-390.
29. Chang K.P., Fong D., Bray R.S., (1985). Biology of leishmania and leishmaniasis. In: Chang, K.P., Bray, R.S. (Eds.), Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1–30.

30. Chang K.P., McGwire B.S., (2002). Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid biology and disease* 1: 1.
31. Chaniotis B., Gozalo Garcia G., Tselentis,Y., (1994). Leishmaniasis in greater Athens, Greece. Entomological studies. *Annals of tropical medicine and parasitology* 88:659-663.
32. Chapman W., Hanson W., (1984). Leishmaniasis. In: Greene, C. (Ed.), Clinical Microbiology and Infectious Disease of the Dog and Cat. WB Saunders, Philadelphia, PA, pp. 764–770.
33. Chirathaworn C., Chantaramalai T., Sereemaspun A., Kongthong N., Suwancharoen D., (2011). Detection of Leptospira in urine using anti-Leptospira-coated gold nanoparticles. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 34: 31-34.
34. Choi C.M., Lerner E.A., (2001). Leishmaniasis as an emerging infection. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings* 6:175-182.
35. Christodoulou V., Antoniou M., Ntais P., Messaritakis I., Ivovic V., Dedet J.P., Pratlong F., Dvorak V., Tselentis Y., (2012). Re-Emergence of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis in the Greek Island of Crete. *Vector borne and zoonotic diseases* 12: 214-222.
36. Chulay J.D., Bryceson A.D., (1983). Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 32: 475–479.
37. Ciaramella P., Oliva G., Luna R.D., 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. *The veterinary record* 141: 539-543.
38. Cortes S., Rolão N., Ramada J., Campino L., (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using Leishmania donovani s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 12-17.
39. Courtenay O., Quinnell R.J., Garcez L.M., Shaw J.J., Dye C., (2002). Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *The journal of infectious diseases* 186: 1314-1320.

40. Dabbousi B.O., Rodriguez-Viejo J.., Mikulec F.V., Heine J.R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K.F., Bawendi M.G., (1997). (CdSe)ZnS Core−Shell Quantum Dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *The journal of physical chemistry* 101: 9463-9475.
41. da Silva E.S., Gontijo C.M., Pacheco Rda S., Brazil R.P., (2004). Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and molecular research* 3: 251-357.
42. Davies C.R., Llanos-Cuentas E.A., Campos P., Monge J., Leon E., Canales J., (2000). Spraying houses in the Peruvian Andes with lambda-cyhalothrin protects residents against cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 94: 631–636.
43. Davies C.R., Kaye P., Croft S.L., Sundar S., (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 326:377–382.
44. de Oliveira C.I., Bafica A., Oliveira F., Favali C.B., Correa T., Freitas L.A., Nascimento E., Costa J.M., Barral A., (2003). Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clinical infectious diseases* 37: e149-53.
45. Dereure J., Pratlong F., Dedet J.P., (1999). Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, pp. 18 – 25.
46. Desjeux P., (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 95: 239-243.
47. Desjeux P., (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 27: 305-318.
48. Disch J., Pedras M.J., Orsini M., Pirmez C., de Oliveira M.C., Castro M., Rabello A., (2005). *Leishmania (Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 51:185-190.
49. Doroud D., Zahedifard F., Vatanara A., Najafabadi A.R., Taslimi Y., Vahabpour R., Torkashvand F., Vaziri B., Rafati S., (2011). Delivery of a cocktail DNA vaccine encoding cysteine proteinases type I, II and III with

solid lipid nanoparticles potentiate protective immunity against *Leishmania major* infection. *Journal of controlled release* 153: 154-162.

50. Enserink M., (2000). Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290:1881-1883.
51. Erlich H.A., (1989). PCR Technology, Principles and Application for DNA Amplification. Stocton Press, Mac Milan Publishers Ltd, England.
52. Ferguson M.A., Murray P., Rutherford H., McConville M.J., (1993). A simple purification of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *The Biochemical journal* 291: 51–55.
53. Ferroglio E., Maroli M., Mignone W., Gastaldo S., Raimondo C., Trisciuoglio A., Rossi L., (2002). Endemic canine leishmaniasis foci in North-West Italy. *Environment, Risques & Santé* 1: 47-49.
54. Ferrer L., Juanola B., Ramos J.A., Ramis A., (1991). Chronic colitis to Leishmania infection in two dogs. *Veterinary pathology* 28: 342–343.
55. Fisa R., Gállego M., Castillejo S., Aisa M.J., Serra T., Riera C., Carrio J., Gállego J., Portús M., (1999). Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. *Veterinary parasitology* 83: 87–97.
56. Fu Z., Zhou X., Xing D., (2013). Sensitive colorimetric detection of Listeria monocytogenes based on isothermal gene amplification and unmodified gold nanoparticles. *Methods* 64:260-266.
57. Gangneux J.P., Menotti J., Lorenzo F., Sarfati C., Blanche H., Bui H., Pratlong F., Garin Y.J., Derouin F., (2003). Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world *Leishmania* infections in an area of nonendemicity. *Journal of clinical microbiology* 41: 1419-1422.
58. Gannavaram S., Ansari N.A., Kataria J., Salotra P., (2004). Nested PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in slit aspirates from post kala-azar dermal leishmaniasis lesions. *Journal of clinical microbiology* 42: 1777-1778.
59. Gazouli M., Liandris E., Andreadou M., Sechi L.A., Masala S., Paccagnini D., Ikonomopoulos J., (2010). Specific Detection of Unamplified Mycobacterial DNA by Use of Fluorescent Semiconductor Quantum Dots and Magnetic Beads. *Journal of clinical microbiology* 48: 2830–2835.

60. Giger U., Oakley D.A., Owens S.D., Schantz P., (2002). Leishmania donovani transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion* 42:381-383.
61. Gradoni L., Gramiccia M., Mancianti F., Pieri S., (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 82: 568–571.
62. Gradoni L., (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. In Proceedings of the 2nd International canine Leishmaniasis forum, (Sevilla, Spain), pp 7-14.
63. Handman E., Button L.L., McMaster R.W., (1990). *Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Experimental parasitology* 70: 427–435.
64. Handman E., (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical microbiology reviews* 14: 229–243.
65. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; *354*: 1191-9.
66. Hill D.H., Mirkin C.A., (2006). The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. Nature protocols 1: 324-336.
67. Hsia R., (2009). Leishmaniasis. Available from: URL:http://www.emedicine.com/emerg/topic296.htm.
68. Ikonomopoulos J., (2012). Reliable Application of PCR: An Elusive Pathway, *Mycobacterial Diseases* 2: e117.
69. Iqbal J., Hira P.R., Saroj G., Philip R., Al-Ali F., Madda P.J., Sher A., (2002). Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *Journal of clinical microbiology* 40: 475-479.
70. Jain P.K., Lee K.S., El-sayed I.H., El-sayed M.A., (2006). Calculated adsorption and scattering of gold nanoparticles of different size, shape and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *The journal of physical chemistry B* 110: 7238-7248.
71. Killick-Kendrick R., (1999). The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clinıcs in dermatology* 17: 279–289.
72. Koutinas A.F., Scott D.W., Kantos V., (1992). Skin lesions in canine leish-maniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Veterinary dermatology* 3: 121–130.

73. Koutinas A.F., Polizopoulou Z.S., Saridomichelakis M.N., Argyriadis D., Fytianou A., Plevraki K.G., (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association* 35: 376-383.
74. le Fichoux Y., Quaranta J.F., Aufeuvre J.P., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Rousseau D., Kubar J., (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1953-1957.
75. Lemesre J.L., Holzmuller P., Gonçalves R.B., Bourdoiseau G., Hugnet C., Cavaleyra M., Papierok G., (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomized efficacy field trial. *Vaccine* 25: 4223–4234.
76. Leontides L.S., Saridomichelakis M.N., Billinis C., Kontos V., Koutinas A.F., Galatos A.D., Mylonakis M.E., (2002). A cross-sectional study of Leishmania spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary parasitology* 109:19-27.
77. Lainson R., Shaw J.J., (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniases in biology and medicine*. London: Academic Press, p. 1-120.
78. Liandris E., Gazouli M., Andreadou M., Čomor M., Abazovic N., Sechi L.A., Ikonomopoulos J., **(**2009). Direct detection of unamplified DNA from pathogenic mycobacteria using DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of Microbiological Methods* 78: 260-264.
79. Liandris E., Gazouli M., Andreadou M., Sechi L.A., Rosu V., Ikonomopoulos J., (2011). Detection of Pathogenic Mycobacteria Based on Functionalized Quantum Dots Coupled with Immunomagnetic Separation. *PLoS One* 6: e20026.
80. Liarte D.B., Mendonca I.L., Luz F.C., Abreu E.A., Mello G.W., Farias T.J., Ferreira A.F., Millington M.A., Costa C.H., (2001). QBC for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis: preliminary data. *Revista da sociedade Brasiliera de Medicina Tropical* 34: 577-581.
81. Maroli M., Pennisi M.G., Di Muccio T., Khoury C., Gradoni L., Gramiccia M., (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with Leishmania infantum. *Veterinary parasitology* 145:357-360.

82. Martin-Sanchez J., Pineda J.A., Morillas-Marquez F., Garcia-Garcia J.A., Acedo C., Macias J., (2004). Detection of Leishmania infantum kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other Leishmania infection markers. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70: 545-548.
83. Marty P., Izri A., Ozon C., Haas P., Rosenthal E., Del Giudice P., Godenir J., Coulibaly E., Gari-Toussaint M., Delaunay P., Ferrua B., Haas H., Pratlong F., Le Fichoux Y., (2007). A century of leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Annals of tropical medicine and parasitology* 101:563-574.
84. Matthias G., Lemon J., Fellows I., Singh P., (2012). Irr: Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement. R package version 0.84. http://CRAN.R-project.org/package=irr.
85. Mauel J., Behin R., (1982). Leishmaniasis: immunity, immunopathology and immunodiagnosis. Cohen S, Warren KS, eds. Immunology of Parasitic Infection. Oxford, United Kingdom: Blackwell Scientific Publication, p. 299-314.
86. Mauricio I.L., Gaunt M.W., Stothard J.R., Miles M.A., (2007). Glycoprotein 63(gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World Leishmania. *International journal for parasitology* 37:565-576.
87. McConville M.J., Collidge T.A., Ferguson M.A., Schneider P., (1993a). The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 268: 15595–15604.
88. McConville M.J., Turco S.J., Ferguson M.A., Sacks D.L., (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *The EMBO journal* 11: 3593–3600.
89. McConville M.J., Ferguson M.A., (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *The Biochemical journal* 294: 305–324.
90. McConville M.J., Schnur L.F., Jaffe C., Schneider P., (1995). Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *The Biochemical journal* 310: 807–818.

91. Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., Weiss S., (2005). Quantum Dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307: 538-544.
92. Miró G., Cardoso L., Pennisi M.G., Oliva G., Baneth G., (2008). Canine leishmaniosis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two *Trends in parasitology* 24:371-377.
93. Molina R., Amela C., Nieto J., San-Andres M., Gonzalez F., Castillo J.A., Lucientes J., Alvar J., (1994). Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88:491-493.
94. Molina R., Jiménez M.I., Cruz I., Iriso A., Martín-Martín I., Sevillano O., Melero S., Bernal J., (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary parasitology* 190: 268-271.
95. Moreno J., Alvar J., (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in parasitology* 18:399-405.
96. Morillas F., Benavides I., González J., Reyes A., Valero A., (1985). Découverte de Leishmania sp. dans le Rattus rattus de la province de Grénade (Espagne). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 60: 768–770.
97. Morillas F., Sánchez-Rabasco F., Ocaña J., Martín-Sánchez J., Ocaña-Wihelmi J., Acedo C., Sanchíz-Marín M.C., (1996). Leishmaniosis in the focus of the Axarquia region, Mà laga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitology research* 82: 569–570.
98. Morris J.C., Drew M.E., Klingbeil M.M., Motyka S.A., Saxowsky T.T., Wang Z., Englund P.T., (2001). Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *International journal for parasitology* 31:453-458.
99. Moshfe A., Mohebalia M., Edrissian G., Zarei Z., Akhoundi B., Kazemi B., Jamshidi S, Mahmoodi M., (2009). Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. *Acta tropica* 112: 101–105.
100. Nascimento E., Mayrink W., da Costa C.A., Michalick M.S., Melo M.N., Barros G.C., Dias M., Antunes C.M., Lima M.S., Taboada D.C., Liu T.Y., (1990). Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune responses. *Infection and immunity* 58: 2198–2203.

101. Niemeyer C.M, Mirkin C.A., (2004). Nanobiotechnology. Singapore: Markono print media Pte Ltd.
102. Ntais P., Sifaki-Pistola D., Christodoulou V., Messaritakis I., Pratlong F., Poupalos G., Antoniou M., (2013). Leishmaniases in Greece. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 89: 906-915.
103. Ordeix L., Solano-Gallego L., Fondevila D., Ferrer L., Fondati A., (2005). Papular dermatitis due to Leishmania spp. Infection in dogs with specific cellular immune response. *Veterinary dermatology* 16:187.
104. Otero A.C., da Silva V.O., Luz K.G., Palatnik M., Pirmez C., Fernandes O., Palatnik de Sousa C.B., (2000). Short report: Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. The *American journal of tropical medicine and hygiene* 62: 128-131.
105. Owens S.D., Oakley D.A., Marryott K., Hatchett W., Walton R., Nolan T.J., Newton A., Steurer F., Schantz P., Giger U., (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219:1076-1083.
106. Papadopoulos B., Tselentis Y., (1994). Sandflies in the Greater Athens region, Greece. *Parasite* 1:131-140.
107. Parak W.J., Geron D., Zanchet D., Woerz A.S., Pellegrino T., Micheel C., Williams S.C., Seitz M., Bruehl R.E., Bryant Z., Bustamante C., Bertozzi C.R., Alivisatos A.P., (2002). Conjugation of DNA to silanized colloidal semiconductor nanocrystal quantum dots. *Chemistry of materials* 14: 2113-2119.
108. Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J., (1993). Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Application. American Society for Microbiology, Mayo Foundation.
109. Piarroux R., Fontes M., Perasso R., Gambarelli F., Joblet C., Dumon H., Quilici M., (1995). Phylogenetic relationships between Old World Leishmania strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Molecular and biochemical parasitology* 73: 249-252.
110. Pimenta P.F., Saraiva E.M., Sacks D.L., (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental parasitology* 72: 191–204.

111. Pissuwan D., Cortie C.H., Valenzuela S.M., Cortie M.B., (2010). Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. *Trends in biotechnology* 28: 207-213.
112. Pizzuto M., Piazza M., Senese D., Scalamogna C., Calattini S., Corsico L., Persico T., Adriani B., Magni C., Guaraldi G., Gaiera G., Ludovisi A., Gramiccia M., Galli M., Moroni M., Corbellino M., Antinori S., (2001). Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of clinical microbiol*ogy 39: 357-361.
113. R Core Team, (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org/.
114. Ready P.D., (2008). Leishmaniasis emergence and climate change. In: S de la Roque, editor. Climate change: the impact on the epidemiology and control of animal diseases. *Revue Scientique et technique (International office of Epizootics)* 27:399-412.
115. Ready P.D., (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro surveillance* 15: 19505.
116. Reyburn H., Ashford R., Mohsen M., Hewitt S., Rowland M., (2000). A randomized controlled trial of insecticide-treated bednets and chaddars or top sheets, and residual spraying of interior rooms for the prevention of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94:361–366.
117. Rieraa C., Fisa R., Udina M., Gαllego M., Portus M., (2004). Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 102-110.
118. Ripp J., Editor, (1996). Analytical detection limit guidance & laboratory guide for determining method detection limits, Wisconsin Department of Natural Resources, Wisconsin, USA.
119. Rosypal A.C., Troy G.C., Zajac A.M., Duncan R.B., Waki K., Chang K.P., Lindsay D.S., (2003). Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the

United States: isolation and immunohistochemical detection of Leishmania infantum from foxhounds from Virginia. *The journal of* e*ukaryotic microbiology* 50:691-693.

120. Saljoughian N., Zahedifard F., Doroud D., Doustdari F., Vasei M., Papadopoulou B., Rafati S., (2013). Cationic solid lipid nanoparticles are as efficient as electroporation in DNA vaccination against visceral leishmaniasis in mice. *Parasite Immunology* doi: 10.1111/pim.12042. [Epub ahead of print].
121. Schallig H.D., Oskam L., (2002). Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical medicine and international health* 7: 641-651.
122. Schneider P., Rosat J.P., Ransijn A., Ferguson M.A., McConville M.J., (1993). Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania major*. *The Biochemical journal* 295: 555–564.
123. Schoone G.J., Hailu A., Kroon C.C., Nieuwenhuys J.L., Schallig H.D., Oskam L., (2001). A fast agglutination-screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 400-401.
124. Schulz A., Mellenthin K., Schönian G., Fleischer B., Drosten C., (2003). Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic Leishmania Organisms by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Assay. *Journal of clinical microbiology* 41: 1529–1535.
125. Singh S., Dey A., Sivakumar R., (2005). Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert review of molecular diagnostics* 5: 251-265.
126. Singh S., (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *The Indian journal of medical research* 123: 311-330.
127. Sinha S., Sundaram S., Singh A.P., Tripathi A., (2011). A gp63 based vaccine candidate against Visceral Leishmaniasis. *Bioinformation* 5: 320-325.
128. Sivakumar R., (2004). Studies on the kinesin related antigen gene of *Leishmania donovani* and its diagnostic application. All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India. PhD Thesis.

129. Slappendel R.J., Ferrer L., (1998). Leishmaniasis. In: Infectious Diseases of Dog and Cat, 2nd ed. Greene CE (eds), Saunders company, Philadelphia, pp. 450-458.
130. 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.
131. Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L., (2001). Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of clinical microbiology* 39: 560-563.
132. Solano-Gallego L., Fernández-Bellon H., Morell P., Fondevila D., Alberola J., Ramis A., Ferrer L., (2004). Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. *Journal of comparative pathology* 130:130–137.
133. Solbach W., Laskay T., (2000). The host response to Leishmania infection. *Advances in immunology* 74: 275-317.
134. Sorensen A.L., Hey A.S., Kharazmi A., (1994). *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS* 102: 265–271.
135. Srivastava P., Dayama A., Mehrotra S., Sundar S., (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 1–6.
136. Stark D., Pett S., Marriott D., Harkness J., (2006). Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum* in a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patient. *Journal of clinical microbiology* 44: 1178-1180.
137. Tafuri W.L., Oliveira M.R., de Melo M.N., Tafuri W.L., (2001). Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology* 96: 203–212.
138. Tavares C.A.P., Fernandes A.P., Melo M.N., (2003). Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert review of molecular diagnostics* 3: 657-667.

139. Travi B.L., Ferro C., Cadena H., Montoya-Lerma J., Adler G.H., (2002). Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Research in veterinary science* 72: 83-86.
140. Theodoropoulos G., and Theis J.H., (1983). Decrease of acid phosphatase activity in murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani. International Journal for Parasitology* 19: 813-816.
141. Tonui W.K., Mbati P.A., Anjili C.O., Orago A.S., Turco S.J., Githure J.I., Koech D.K., (2001). Transmission blocking vaccine studies in leishmaniasis: II. Effect of immunisation using *Leishmania major* derived 63 kilodalton glycoprotein, lipophosphoglycan and whole parasite antigens on the course of *L. major* infection in BALB/c mice. *East Africa medical journal* 78: 90-92.
142. Verma S., Kumar R, Katara G.K., SinghL.C., Negi N.S., Ramesh V., Salotra P., (2010). Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of Leishmaniasis Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral Leishmaniasis. *Plos One* 5: e10107.
143. Weissleder R., (2001). A clearer vision for in vivo imaging. *Nature biotechnology* 19: 316-317.
144. World Health Organization, (1990). Control of the Leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organization technical report series* 793:1-158.
145. World Health Organization, (2010). Leishmaniasis. Available at: http://www.who.int/leishmaniasis/en/
146. Wortman G., Sweeney C., Houng H.S., Aronson N., Stiteler J., Jackson J., Ockenhouse C., (2001). Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. The *American journal of tropical medicine and hygiene* 65: 583-587.
147. Wright N.A., Davis L.E., Aftergut K.S., Parrish C.A., Cockerell C.J., (2008). Cutaneous leishmaniasis in Texas: a northern spread of endemic areas. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58: 650–652.
148. Zaffaroni E., Rubaudo L., Lanfranchi P., Mignone W., (1999). Epidemiological patterns of canine leishmaniasis [correction of leishmaniosis] in Western Liguria (Italy). *Veterinary parasitology* 81:11-19.

149. Zambrano-Villa S., Rosales-Borjas D., Carrero J.C., Ortiz-Ortiz L., (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in parasitology* 18: 272–278.
150. Zerpa O., Ulrich M., Negrón E., Rodríguez N., Centeno M., Rodríguez V., Barrios R.M., Belizario D., Reed S., Convit J., (2000). Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene* 94:484–487.