



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

“Η λειψμανία στο σκύλο”

Φοιτήτρια: Τιπρασβίλι Μέγκυ

Επιβλέπουσα: Μαζαράκη Κυριακή, Επίκουρη Καθηγήτρια Α.Τ.Ε.Ι.Θ.

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
2. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	4
2.1 Φορείς	4
2.2 Τελικοί ξενιστές	6
2.3 Το παράσιτο	6
2.3.1 Δομή	7
2.3.2 Κύκλος ζωής του παρασίτου	8
2.3.3 Μηχανισμοί ενδοκυτταρικής επιβίωσης	9
3. ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΤΟ ΣΚΥΛΟ	10
4. ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ	12
5. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ	15
6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	19
6.1 Δέρμα	20
6.2 Νεφροί	21
6.3 Ήπαρ	22
6.4 Σπλήνας	23
6.5 Κυκλοφορικό σύστημα	24
6.6 Μυοσκελετικό σύστημα	24
7. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	25
7.1 Πρώιμα συμπτώματα	25
7.2 Λανθάνουσα περίοδος	26
7.3 Τελική φάση	28
8. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	30
8.1 Βιοχημικές εξετάσεις	30
8.2 Άμεση ανίχνευση παρασίτου	30

8.3 Έμμεση ανίχνευση παρασίτου	32
8.4 Ανοσοδιάγνωση	34
8.4.1 Κυτταρική ανοσία	34
8.4.2 Χυμική ανοσία	35
8.4.2.1 Ορολογικές δοκιμασίες	36
9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	40
9.1 Πενταδύναμες ενώσεις αντιμονίου (Sb)	42
9.2 Αμφοτερικίνη Β	45
9.3 Μιλτεφοσίνη	47
9.4 Παρομομυκίνη	48
9.5 Πενταμιδίνη	48
9.6 Αλλοπουρινόλη	48
9.7 Κετοκοναζόλη	49
9.8 Δομπεριδόνη	49
9.9 Άλλα φάρμακα	50
9.10 Συστήματα διανομής	50
9.11 Ανοσοθεραπεία	52
9.12 Η θεραπεία στην πράξη	52
10. ΕΛΕΓΧΟΣ-ΠΡΟΛΗΨΗ	55
10.1 Θεραπεία ή ευθανασία	55
10.2 Έλεγχος φορέα	57
10.3 Αποτροπή νυγμάτων	58
11. ΕΜΒΟΛΙΑ	60
11.1 Cani Leish®	62
11.2 Προεμβολιακός έλεγχος-Speed Leish K™	65
12. ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ	68
12.1 Περιστατικό 1	68
12.2 Περιστατικό 2	71
12.3 Περιστατικό 3	74
13. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια των σπουδών μου στο τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, με κατεύθυνση Ζωικής Παραγωγής, στο Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, κατά τα έτη 2017-2018.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα κά. Μαζαράκη Κυριακή, επίκουρη καθηγήτρια του Α.Τ.Ε.Ι.Θ., για την αποδοχή της αίτησής μου για εκπόνηση πτυχιακής εργασίας. Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Καραμήτρο Ανέστη που με δέχτηκε στο κτηνιατρείο του για την πραγματοποίηση του εργαστηριακού σκέλους της εργασίας, καθώς και την κτηνίατρο κά. Αποστολακούλη Φωτεινή για την πολύτιμη βοήθεια, επιστημονική κατάρτιση και καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διεκπεραίωσή του.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λείσμανίαση είναι μια ασθένεια που προκαλείται από διάφορα είδη του πρωτοζώου *Leishmania spp.* Τον ενδιάμεσο ξενιστή αποτελούν θηλυκοί φλεβοτόμοι ενώ οι τελικοί ξενιστές, οι οποίοι τελικά εμφανίζουν και τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι διάφορα σπονδυλωτά, όπως ο σκύλος και ο άνθρωπος.

Σε ότι αφορά στη λείσμανίαση του σκύλου ή αλλιώς CanL (Canine Leishmaniasis), το παράσιτο βρίσκεται ευρέως εξαπλωμένο μέσα στον οργανισμό, προκαλώντας μια πολυσυστημική λοίμωξη.

Η διάγνωση της CanL μπορεί να γίνει με ένα συνδυασμό μεθόδων όπως είναι η ανίχνευση του παρασίτου στους ιστούς και τα υγρά του ζώου, η ανοσοδιάγνωση, οι αιματολογικές, βιοχημικές και ορολογικές εξετάσεις.

Για την αντιμετώπισή της έχουν αναπτυχθεί διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα που κάνουν χρήση παρασιτοκτόνων, παρασιτοστατικών και ανοσορυθμιστικών φαρμάκων και έχουν ως στόχο την υποχώρηση των συμπτωμάτων και την παρασιτολογική ίαση του ζώου. Παρόλα αυτά, δεν είναι πάντοτε σίγουρο ότι η μόλυνση οδηγεί σε νόσο και εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων αλλά ούτε και αν το ζώο θα παρουσιάσει πλήρη ανάρρωση, υποτροπή ή παραμονή σε λανθάνουσα κατάσταση μετά τη θεραπεία.

Αυτό το γεγονός δημιουργεί το πρόβλημα των σκύλων-φορέων, οι οποίοι αποτελούν πηγές μετάδοσης και εξάπλωσης της νόσου. Έτσι, για αποτελεσματικότερο έλεγχο της CanL, απαιτείται η επιβολή όχι μόνο θεραπείας αλλά και πρόληψης, με ένα συνδυασμό στρατηγικών ελέγχου του φορέα (ψεκασμοί με αντομοκτόνα), αποτροπής νυγμάτων (ειδικά κολάρα και λουσίων), καθώς και με εμβολιασμό των σκύλων.

Στο εργαστηριακό μέρος της εργασίας παρουσιάζονται 3 περιστατικά CanL, οι διαγνωστικές εξετάσεις που οδήγησαν στη διαπίστωση της νόσου, καθώς και η εκάστοτε στρατηγική αντιμετώπισης της νόσου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος λείσμανίαση αναφέρεται σε μια χρόνιας εξέλιξης, πρωτοζωικής αιτιολογίας, με πολυσυστημικές εκδηλώσεις νόσο, η οποία προκαλείται από διάφορα είδη του πρωτοζώου *Leishmania*.^{[1][50]}

Είναι γνωστά περισσότερα από 40 είδη *Leishmania*, σε ολόκληρο τον κόσμο. Κάποια από αυτά καθώς και η γεωγραφική τους εξάπλωση είναι ^[2]:

α) *Leishmania infantum*: Μεσόγειος, Μέση Ανατολή, Αραβία, Ιράκ, Ιράν, Κίνα, Αμερική (μετά το 2000)

β) *Leishmania donovani*: Ινδία, Αφρική, Σρι Λάνκα

γ) *Leishmania chagasi*: Αμερική (συνώνυμο με *Leishmania infantum*)

δ) *Leishmania tropica*: Ασία, Αφρική, Ευρώπη

ε) *Leishmania major*: Μέση Ανατολή, Ιράν

στ) *Leishmania aethiopica*: Αφρική

ζ) *Leishmania enriettii*: παγκοσμίως

η) *Leishmania peruviana*: Αμερική

θ) *Leishmania mexicana* complex: Αμερική

ι) *Leishmania braziliensis* complex: Αμερική

Σε κάθε περίπτωση, τον ενδιάμεσο ξενιστή της νόσου αποτελούν οι θηλυκοί φλεβοτόμοι ή κοινώς σκνίπες. Από τα 800 είδη φλεβοτόμων που έχουν μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί σε όλο τον κόσμο, τα 98 περίπου διαπιστώθηκε ότι είναι μεταδότες των *Leishmania spp.* Ειδικότερα, οι φλεβοτόμοι του γένους *Phlebotomus spp.* είναι μεταδότες του παρασίτου σε Ευρώπη, Ασία και Αφρική (Παλαιός Κόσμος), ενώ οι φλεβοτόμοι του γένους *Lutzomyia spp.* στην Αμερική (Νέος Κόσμος). Στις μεσογειακές χώρες βρέθηκαν συνολικά 21 είδη φλεβοτόμων (18 *Phlebotomus spp.* και 3 *Sergentomyia spp.*)^[5].

Τους τελικούς ξενιστές αποτελούν διάφορα σπονδυλωτά που λειτουργούν ως αποθήκη ή δεξαμενή του παρασίτου στη φύση και έτσι ενδέχεται να νοσήσουν από λείσμανίαση. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται ο σκύλος, ο λύκος, η αλεπού, το τσακάλι, η γάτα, ο επίμυς, ο κρικητός, οι όρνιθες, οι νυχτερίδες, οι σαύρες καθώς επίσης και ο άνθρωπος^[6].

Οι κλινικές εκδηλώσεις και τα συμπτώματα της νόσου ποικίλουν και εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος και το στέλεχος του παρασίτου και την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή ^[6]. Η λεισμανίαση, ανάλογα με τις κλινικές εκδηλώσεις της στον άνθρωπο διακρίνεται σε δερματική, βλεννογονοδερματική και σπλαχνική (γνωστή και ως kala-azar) ^[2]. Η λεισμανίαση του σκύλου ή αλλιώς CanL (Canine Leishmaniasis) εκδηλώνεται ως σπλαχνική νόσος που χαρακτηρίζεται και από δερματικές βλάβες, οι οποίες όμως πάντα σχετίζονται με την εξάπλωση του παρασίτου στα εσωτερικά όργανα του ζώου ^[6].

Σε ότι αφορά στην επιδημιολογία της νόσου, περισσότεροι από 12 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν σε 98 χώρες και κάθε χρόνο κάνουν την εμφάνισή τους περίπου 2 εκατομμύρια νέα κρούσματα ^[3]. Η CanL εμφανίζεται σε 50 εκ των 98 αυτών χωρών και κυρίως στην Κίνα, τη Βραζιλία και τη λεκάνη της Μεσογείου ^[6]. Στους παράγοντες οι οποίοι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης περιλαμβάνονται τα δημογραφικά δεδομένα του εκάστοτε πληθυσμού καθώς και η οικονομική ανάπτυξη και συμπεριφορά του, όπως επίσης και η αστικοποίηση σε συνδυασμό με την αποψίλωση των δασών κ.ά. ^[3]

Η λήψη μέτρων για την πρόληψη και αντιμετώπιση της λεισμανίασης αποτελεί επιτακτική ανάγκη και αφορά στον έλεγχο του ξενιστή, τον έλεγχο του φορέα, την έγκαιρη διάγνωση, την αποτελεσματική θεραπεία, την επιτήρηση της νόσου, και την ανάπτυξη νέων και οικονομικά προσβάσιμων εμβολίων και φαρμάκων ^[4].

2. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

2.1 Φορείς

Οι μοναδικοί φορείς του πρωτοζώου Leishmania είναι διάφορα είδη δίπτερων αρθροπόδων που ανήκουν στα γένη Phlebotomus και Lutzomyia και ονομάζονται φλεβοτόμοι ή κοινώς σκνίπες. Όπως προαναφέρθηκε, οι φλεβοτόμοι του γένους Phlebotomus (Εικόνα 1), απαντώνται στις ηπείρους του Παλαιού Κόσμου, ενώ αυτοί του γένους Lutzomyia κυρίως στην αμερικάνικη ήπειρο. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 800 είδη, μόνο τα 98 εκ των οποίων έχει

αποδειχθεί ότι αποτελούν δυνητικούς φορείς του παρασίτου (42 είδη *Phlebotomus* και 56 είδη *Lutzomyia*)^[7].

Πρόκειται για νυκτόβιους οργανισμούς, μεγέθους έως 3mm, που δραστηριοποιούνται κατά κανόνα μετά τη δύση του ηλίου και τα ενδιαίτημά τους περιλαμβάνουν σκοτεινές και υγρές περιοχές, όπως είναι οι φλοιοί και τα φυλλώματα, τα πεσμένα φύλλα, τα λαγούμια διάφορων ζώων, τα αναχώματα τερμιτών και μυρμηγκιών, διάφορες σχισμές και ρωγμές όπως επίσης και περιοχές με απορρίματα^[9]. Οι αρσενικοί και θηλυκοί φλεβοτόμοι τρέφονται με φυσικές πηγές γλυκόζης, ενώ η διατροφή μονάχα των θηλυκών απαιτεί και πηγές αίματος, συστατικό απαραίτητο για την ωρίμανση των αυγών τους. Τα στοματικά μόρια των σκνιπών είναι μυζητικού τύπου και χαρακτηρίζονται από την παρουσία προβοσκίδας με την οποία απομυζούν αίμα νύσσοντας τον ξενιστή τους. Η επιλογή του ξενιστή ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φλεβοτόμου^[10].



Εικόνα 1: Ο φλεβοτόμος *phlebotomus papatasi*.^[235]

Ο βιολογικός κύκλος των φλεβοτόμων διαρκεί περίπου 6 εβδομάδες. Μετά την ενηλικίωση των θηλυκών ξεκινά η απομύζηση αίματος, ακολουθούμενη από την ωρίμανση και γονιμοποίηση των αυγών, τα οποία εναποτίθενται σε ομάδες των 40-70, σε διάφορα υγρά και σκοτεινά σημεία. Μετά την εκκόλαψη οι προνύμφες

εξελίσσονται σε νύμφες και τέλος εμφανίζονται τα ενήλικα έντομα, τα οποία δε ζουν περισσότερο από 14-21 ημέρες^[11].

2.2 Τελικοί ξενιστές

Ως τελικοί ξενιστές της *Leishmania* έχουν χαρακτηριστεί σχεδόν 70 είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων τρωκτικών, υρακοειδών, μαρσιποφόρων, αρμαντίλλων, ανθρωποειδών και κυνοειδών, καθώς και του ανθρώπου. Οι τελικοί ξενιστές είναι απαραίτητοι για την ολοκλήρωση και επανεκκίνηση του βιολογικού κύκλου του παρασίτου και είναι αυτοί που εμφανίζουν και τις κλινικές εκδηλώσεις της λείσμανιάσης^[8].

2.3 Το παράσιτο

Έχουν ταυτοποιηθεί 53 είδη του γένους *Leishmania* (Εικόνα 2), εκ των οποίων εκείνα που έχουν συνδεθεί με τα περισσότερα περιστατικά λείσμανιάσης αποτελούν τα *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. donovani* και *L. infantum* ή αλλιώς *L. chagasi*, ενώ οι κυριότεροι τελικοί ξενιστές τους ανήκουν κυρίως σε διάφορες ομάδες σπονδυλωτών θηλαστικών όπως είναι τα τρωκτικά, τα κυνοειδή και ο άνθρωπος^[13].



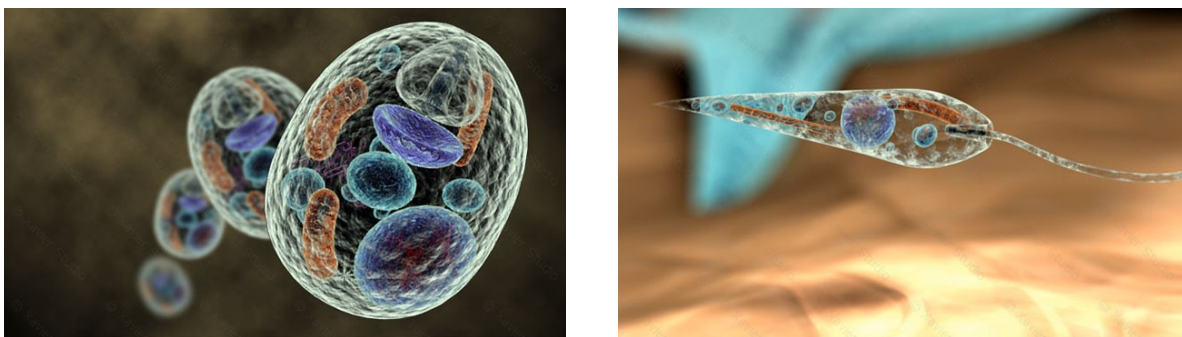
Εικόνα 2: Το πρωτόζωο *Leishmania infantum*.^[236]

Τα πρωτόζωα του γένους *Leishmania* μεταδίδονται στους τελικούς ξενιστές τους χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσους ξενιστές τους θηλυκούς φλεβοτόμους που προαναφέρθηκαν ^[12].

2.3.1 Δομή

Πρόκειται για μονοκύτταρους ευκαρυώτες χωρίς κυτταρικό τοίχωμα που διαθέτουν έναν καλά σχηματισμένο πυρήνα και διάφορα οργανίδια όπως είναι οι κινητοπλάστες και τα μαστίγια που εμπλέκονται στην κίνηση του πρωτοζώου ^[14]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του παρασίτου μέσα στα κύτταρα του ξενιστή, είναι ένας περικυτταρικός μανδύας λιπιδοφωσφογλυκάνης ^[2]. Ανάλογα με το στάδιο του κύκλου ζωής του παρασίτου, αυτό απαντάται σε δύο διαφορετικές μορφές ^[16], (Εικόνα 3):

- Αμαστιγωτή, η οποία εντοπίζεται στο εσωτερικό των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (μακροφάγων), καθώς και στο κυκλοφορικό σύστημα του τελικού ξενιστή. Πρόκειται για την ακίνητη μορφή του πρωτοζώου. Στερείται εξωτερικών μαστιγίων, ενώ ένα μικρό σε μήκος μαστίγιο είναι ενσωματωμένο στο πρόσθιο άκρο του παρασιτικού κυτάρου χωρίς να προεξέχει από αυτό. Η αμαστιγωτή μορφή είναι σχήματος οβάλ και δεν ξεπερνά σε μήκος τα 3-6μm και σε πλάτος τα 1-3μm.



Εικόνα 3: Αμαστιγωτή μορφή του πρωτοζώου *Leishmania donovani* (αριστερά). Προμαστιγωτή μορφή του πρωτοζώου *Leishmania donovani* (δεξιά). ^[237]

- Προμαστιγωτή μορφή, η οποία εντοπίζεται στον πεπτικό σωλήνα του ενδιάμεσου ξενιστή. Πρόκειται για την εξωκυττάρια, κινητή μορφή του παρασίτου και φέρει ένα μακρύ μαστίγιο που προεξέχει από το πρόσθιο άκρο του κυττάρου. Η προμαστιγωτή μορφή είναι ατρακτοειδούς σχήματος με το μήκος της να φτάνει τα 15-30μm και το πλάτος τα 5μm.

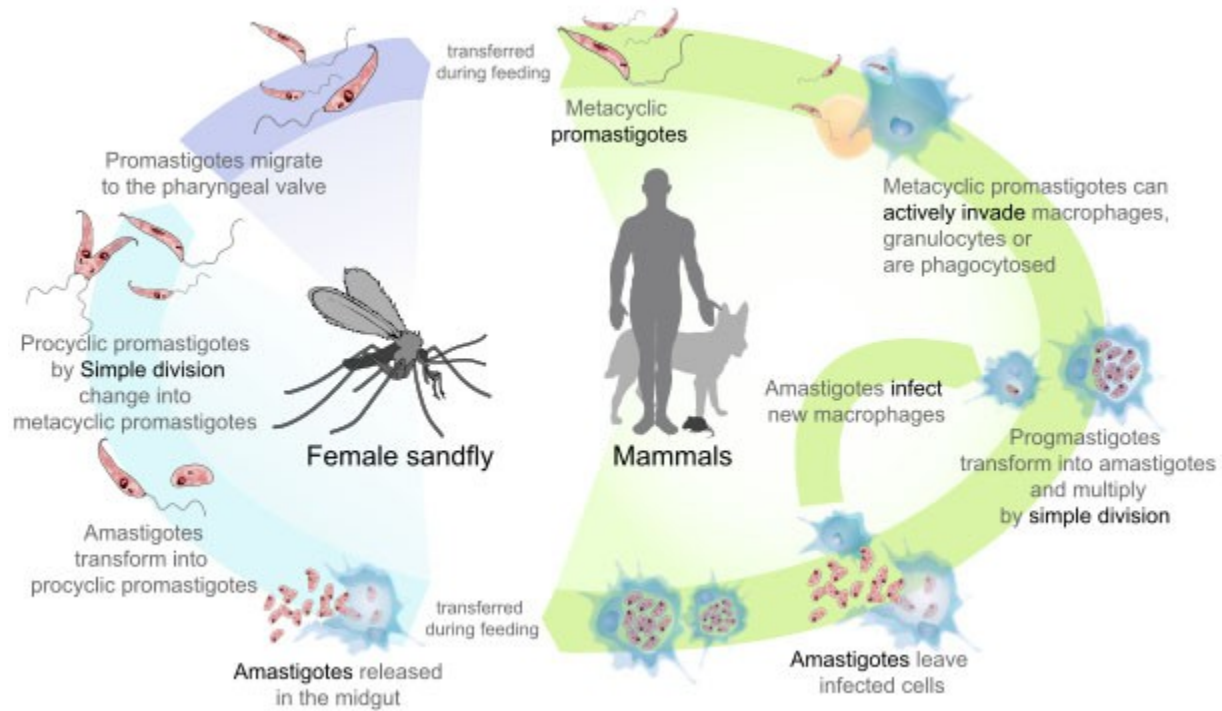
2.3.2 Κύκλος ζωής του παρασίτου

Ο κύκλος ζωής του παρασίτου (Εικόνα 4) περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό του μέσα στα μακροφάγα του τελικού ξενιστή, στη συνέχεια την πρόσληψή του από τον ενδιάμεσο ξενιστή-φορέα, τη μετάδοσή του σε άλλο τελικό ξενιστή κ.ο.κ. [20]

Πιο συγκεκριμένα, ο θηλυκός φλεβοτόμος μολύνεται όταν κατά την απομύζηση αίματος από κάποιο μολυσμένο άνθρωπο ή ζώο προσροφά μακροφάγα που φέρουν την αμαστιγωτή μορφή του πρωτοζώου. Αυτή, στη συνέχεια, απελευθερώνεται στο οπίσθιο τμήμα του μεσεντέρου του φλεβοτόμου [17]. Εκεί, μέσα σε διάστημα 4-25 ημερών το παράσιτο μετατρέπεται στην προμαστιγωτή, κινητή μορφή του και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται με απλή διχοτόμηση. Καθώς συμβαίνει ο πολλαπλασιασμός και μέσα σε διάστημα 4-7 ημερών, μετακυκλικές προμαστιγωτές μορφές του μεταναστεύουν προς το φάρυγγα και την προβοσκίδα του εντόμου. Αυτή η παρασιτική μορφή διαφέρει από την πολλαπλασιαζόμενη μορφή, είναι ανθεκτική στην πέψη από μακροφάγα και ικανή να μολύνει πλέον νέους ξενιστές ώστε να ολοκληρωθεί ένας κύκλος μετάδοσης [18].

Ένας νέος κύκλος μετάδοσης ξεκινά όταν κατά τη διάρκεια του νύγματος από τον φλεβοτόμο η προμαστιγωτή μορφή της *Leishmania* ενοφθαλμίζεται στο δέρμα κάποιου σπονδυλωτού. Στο σημείο εισχώρησης, το παράσιτο φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα του ξενιστή, μετατρέπεται στην αμαστιγωτή μορφή του και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται λύοντας τα και εισβάλλοντας σε άλλα, ενώ ταυτοχρόνως μεταφέρεται από αυτά σε διάφορα όργανα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (σπλήνας, ήπαρ, λεμφαδένες, μυελός των οστών). Αυτή η διαδικασία ευθύνεται για τις κλινικές εκδηλώσεις της

νόσου οι οποίες εξαρτώνται από το είδος του παρασίτου και του ιστού που αυτό έχει προσβάλλει [19].



Εικόνα 4: Κύκλος ζωής του πρωτοζώου *Leishmania* spp.^[238]

2.3.3 Μηχανισμοί ενδοκυτταρικής επιβίωσης

Όταν το παράσιτο εισέλθει στον οργανισμό-ξενιστή προσλαμβάνεται από τα φαγοκύτταρα και εγκολπώνεται μέσα σε δομές που ονομάζονται ενδο-λυσοσώματα, με σκοπό τη θανάτωσή του [21] [22]. Παρόλα αυτά, η *Leishmania* διαθέτει ποικίλους μηχανισμούς για να διαφεύγει την άμυνα του ξενιστή, ώστε να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται μέσα στα κύτταρα του. Μερικούς από αυτούς τους μηχανισμούς αποτελούν οι εξής [23]:

- αντίσταση στα ενδοσωμικά ένζυμα των φαγοκυττάρων που σκοπό έχουν την πέψη του παρασίτου.

- αναστολή της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου και άρα αποφυγή οξειδωτικής έκρηξης, η οποία αποσκοπεί στην αύξηση της τοξικότητας εντός του ενδοσώματος και κατ' επέκταση στη θανάτωση του πρωτοζώου.
- αναστολή της ενεργοποίησης του συστήματος συμπληρώματος και άρα της ενεργοποίησης άλλων λεμφοκυττάρων, όπως είναι τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα που σκοπό έχουν την καταστροφή των προσβεβλημένων από μακροφάγων.
- αναστολή ενεργοποίησης της απόπτωσης των προσβεβλημένων ουδετερόφιλων για περίπου 2-3 μέρες, χρόνος που απαιτείται για τη μετανάστευση των μακροφάγων στο σημείο της μόλυνσης. Τα μακροφάγα έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τα αρχικώς προσβεβλημένα ουδετερόφιλα και αποτελούν τα τελικά ξενιστικά κυτταρα του παρασίτου.
- έκκριση ειδικών χημειοκινών που προκαλούν τη στρατολόγηση επιπλέον ουδετερόφιλων και μακροφάγων στο σημείο της μόλυνσης, με στόχο την εξάπλωση των συνεχώς πολλαπλασιαζόμενων παρασίτων.
- μεταμόρφωση στην αμαστιγωτή μορφή του πρωτοζώου, ικανή να πολλαπλασιάζεται μέσα στα φαγοκύτταρα του ξενιστή και τελικά να τα λύει προσβάλοντας νέα.

3. ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΤΟ ΣΚΥΛΟ

Όπως τονίστηκε παραπάνω, ο κύριος τρόπος μετάδοσης της CanL είναι μέσω του νύγματος από ένα θηλυκό φλεβοτόμο ο οποίος φέρει την προμαστιγωτή μορφή του παρασίτου. Ορολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το 50-60% των μολυσμένων σκύλων δεν εμφανίζει συμπτώματα, γεγονός που δυσκολεύει τον εντοπισμό και την αντιμετώπιση της νόσου ^{[24][25][26][27][28]}. Το 15% αυτών των σκύλων παρουσιάζει δυνατότητα αυτοϊασης ^[29] ενώ το υπόλοιπο ποσοστό, αργά ή γρήγορα, μπορεί να εκδηλώσει συμπτώματα και άρα να υποβληθεί σε θεραπεία ^[26]. Το 70% των σκύλων αυτών ανταποκρίνεται θετικά στη θεραπεία, όμως αυτή είναι πλήρως επιτυχής μόνο στο 20% των περιπτώσεων. Οι υπόλοιποι σκύλοι μπορεί να εμφανίσουν υποτροπή της νόσου ή να παραμείνουν

ασυμπτωματικοί, μεταδίδοντας το παράσιτο σε φλεβοτόμους, σε ποσοστό 20-30% των περιπτώσεων ^{[30][31]}. Η πιθανότητα μετάδοσης της νόσου από το μολυσμένο σκύλο σε φλεβοτόμο είναι πολύ υψηλή και αγγίζει το 54% για ασυμπτωματικούς σκύλους και το 70% για εκείνους που παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα ^[32].

Πέρα από τη μετάδοση της νόσου με ενδιάμεσο ξενιστή έχουν σημειωθεί και άλλοι τρόποι που δεν απαιτούν την παρουσία φλεβοτόμου. Πιο συγκεκριμένα, η κάθετη μετάδοση από τη μολυσμένη μητέρα στο νεογνό, είτε κατά τη διάρκεια του τοκετού είτε κατά τη διάρκεια της κύησης μέσω του πλακούντα, είναι εφικτή, καθώς έχει απομονωθεί το παράσιτο από το σπλήνα, το ήπαρ και τους λεμφαδένες νεογνών. Αυτού του είδους η μετάδοση της νόσου έχει παρατηρηθεί εκτός από το σκύλο, στον άνθρωπο και στον ποντικό ^[33].

Έχει, επίσης, παρατηρηθεί μετάδοση διά της σεξουαλικής επαφής στον άνθρωπο, τον ποντικό και το σκύλο ^[39]. Στον τελευταίο μάλιστα φαίνεται πως η μετάδοση είναι κυρίως μονόπλευρη προς το θηλυκό από το μολυσμένο αρσενικό, στο οποίο το παράσιτο είναι παρόν στο σπέρμα και σχετίζεται με διάφορες βλάβες των γεννητικών οργάνων, όπως είναι η επιδιδυμίτιδα, η ορχίτιδα και η χρόνια προστατίτιδα ^[38].

Μετάδοση του πρωτοζώου μπορεί επίσης να συμβεί και μέσω της μετάγγισης μολυσμένου αίματος ^[36].

Τέλος, έχει παρατηρηθεί η εμφάνιση και εξάπλωση της νόσου σε πληθυσμούς σκύλων που ζουν σε περιοχές όπου δεν ενδημούν φλεβοτόμοι, γεγονός που υπονοεί την πιθανή αλλά όχι αποδεδειγμένη μετάδοση από σκύλο σε σκύλο μέσω της απλής επαφής, για παράδειγμα μέσω εκδορών του δέρματος ^[34].

Η μολυσματικότητα ενός σκύλου που φέρει το παράσιτο σχετίζεται με τρόπο αντιστρόφως ανάλογο με τον αριθμό των CD4⁺ λεμφοκυττάρων του ^[35]. Αυτό προκύπτει από μελέτη η οποία δείχνει ότι 2 μήνες μετά από πειραματική μόλυνση σκύλου, μόνο το 10% των φλεβοτόμων που τρέφονται από το αίμα του μολύνονται. Αυτό το μοτίβο παραμένει σχεδόν σταθερό για περίπου 4 μήνες, αλλά ακριβώς πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων του ζώου πάνω

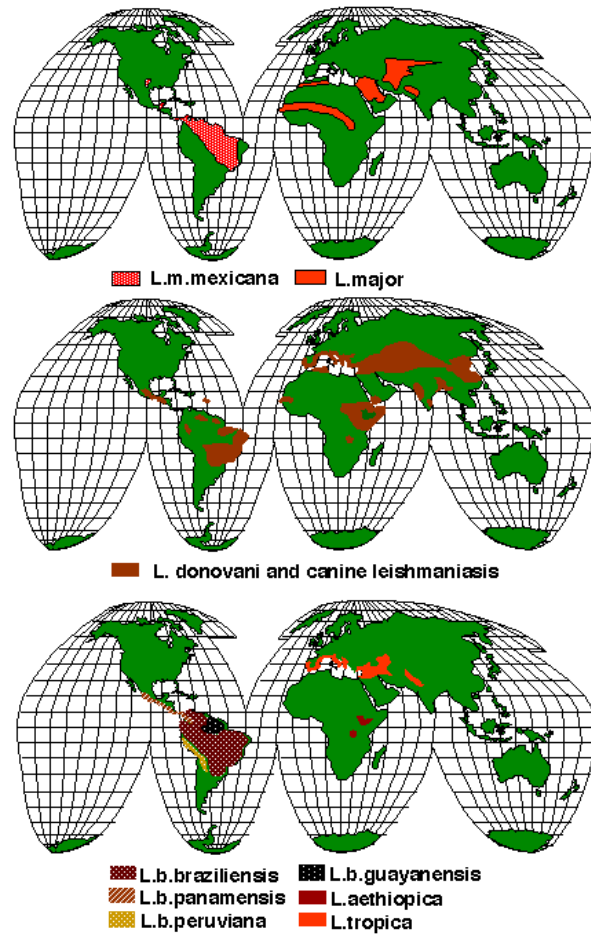
από το 60% των φλεβοτόμων που νύσσουν το σκύλο μολύνονται. Αυτή η χρονική στιγμή της έναρξης των συμπτωμάτων σχετίζεται με μια σημαντική πτώση στον αριθμό των CD4⁺ λεμφοκυττάρων, ένα γεγονός-κλειδί στην παθογένεια της CanL ^[36]. Άλλη σχετική μελέτη έδειξε ότι οι ασυμπτωματικοί σκύλοι δε μεταδίδουν το παράσιτο, ενώ μόνο οι μισοί από εκείνους που παρουσίασαν συμπτώματα μόλυναν τους φλεβοτόμους σε ποσοστό 5-22.5% ^[37]. Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μολυσματικότητα μπορεί να εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως είναι η διατροφή του σκύλου, η επιθετικότητα του παρασιτικού είδους και το είδος του φλεβοτόμου, οι οποίοι διαδραματίζουν ρόλο στην ένταση της μεταδοτικότητας της νόσου ^[36].

4. ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ

Η επιζωοτιολογία μελετά κυρίως την κατανομή, τη συχνότητα και τους καθοριστικούς παράγοντες μιας νόσου.

Σε ότι αφορά στην CanL (Εικόνα 5), αυτή ενδημεί κυρίως στην κεντρική και νοτιοανατολική Ασία, στη λεκάνη της Μεσογείου, στα Βαλκάνια, στη βόρεια Αφρική καθώς επίσης και στην Κεντρική και Νότια Αμερική, όμως δεν περιορίζεται σε αυτές τις περιοχές ^[40]. Για παράδειγμα, ενώ κάποτε η CanL δεν εμφανιζόταν καθόλου στις Η.Π.Α., κατά το έτος 1999 παρατηρήθηκε έξαρσή της στους κυνηγετικούς σκύλους και έκτοτε έχει εμφανιστεί σε διάφορες πολιτείες, καθώς επίσης και στον Καναδά ^[41]. Η εμφάνιση της νόσου σε μη ενδημικές περιοχές οφείλεται κυρίως στην εισαγωγή σκύλων από ενδημικές περιοχές ή στην παρουσία σκύλων που έχουν ταξιδέψει σε αυτές, όπου και μολύνθηκαν.

Στις ενδημικές περιοχές, η νόσος παρουσιάζει υψηλότερη νοσηρότητα της τάξης του 63%-80%, αλλά τα σοβαρά κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται σε ποσοστό <40% ^[43]. Οι ασυμπτωματικοί σκύλοι καθιστούν δύσκολη την ακριβή εκτίμηση των επιδημιολογικών παραμέτρων και έτσι καθίσταται απαραίτητη η εφαρμογή ειδικών διαγνωστικών τεχνικών.



Εικόνα 5: Γεωγραφική εξάπλωση της λείσμανιάσης που προκαλείται από τα διάφορα είδη *Leishmania*. Στο μεσαίο χάρτη φαίνεται η γεωγραφική εξάπλωση της CanL.^[239]

Ενδεικτική μελέτη από τη Μαγιόρκα της Ισπανίας έδειξε ότι ενώ το 13% των σκύλων που μελετήθηκαν εμφάνιζε κλινικά συμπτώματα, το 26% ήταν οροθετικό και το 63% εμφάνιζε το DNA του παρασίτου στο αίμα. Παρόμοιες μελέτες δείχνουν ποσοστά επιπολασμού που αγγίζουν μέχρι και το 80% στη Γαλλία και το 67% στην Ισπανία ^[43]. Σε ότι αφορά στον ελληνικό πληθυσμό, μεταξύ 73 ασυμπτωματικών σκύλων, το 12,3% ήταν οροθετικό και το 63% θετικό στην παρουσία του DNA του παρασίτου στο αίμα. Γενικώς, το ποσοστό των οροθετικών σκύλων κυμαίνεται μεταξύ 14,5%-24%

στην Ιταλία, στο 3%-17% στη Γαλλία, στο 5%-18% στην Ισπανία και περίπου στο 8,5% στην Πορτογαλία. Υψηλότερα ποσοστά επιπολασμού που αγγίζουν το 33% και 36% απαντώνται στη νότια Αμερική, στη Βενεζουέλα και στη Βραζιλία αντίστοιχα. Ο ρυθμός εμφάνισης νέων κρουσμάτων ανά τον κόσμο δεν έχει μελετηθεί εκτενώς αλλά εκτιμάται γύρω στο 3%-6,5% ετησίως ^[47].

Η νόσος μπορεί να εμφανιστεί και στα δύο φύλα σε όλες τις φυλές και ηλικίες. Το κυνηγόσκυλο της Ίμπιζα, καθώς και ημίαιμοι σκύλοι από ενδημικές περιοχές έχουν αναπτύξει κάποιας μορφής ανοσία ^[44]. Αντιθέτως, κάποιες αιμομικτικές ράτσες, όπως είναι ο γερμανικός ποιμενικός, το μπόξερ και το ροτβάιλερ, μπορεί να είναι πιο ευάλωτες καθώς χαρακτηρίζονται από γενετική προδιάθεση στην CanL ^[45].

Οι άγριοι ή αδέσποτοι σκύλοι, καθώς επίσης και όσοι σκύλοι εκτελούν αγροτικές εργασίες στην ύπαιθρο ή είναι σκύλοι φύλακες σε αγροτικές περιοχές είναι περισσότερο εκτεθειμένοι σε νύγματα μολυσμένων φλεβοτόμων και συνεπώς στην CanL ^[46].

Το φύλο δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα κινδύνου, αν και η εμφάνιση της νόσου είναι περισσότερο συχνή σε γέρικους αρσενικούς παρά θηλυκούς σκύλους.

Οι πιο ευάλωτες ηλικιακές ομάδες είναι αυτές των 1-4 ετών και >7 ετών. Σκύλοι που ανήκουν στην πρώτη ηλικιακή ομάδα είναι κυρίως γενετικά προδιατεθειμένοι στην CanL ή ανοσοκατεσταλμένοι για διάφορους λόγους, όπως είναι ο υποσιτισμός ή προηγούμενες μολύνσεις από άλλα παθογόνα. Στη δεύτερη ηλικιακή ομάδα ανήκουν κυρίως σκύλοι που παρουσιάζουν ταυτόχρονα και άλλα νοσήματα, γερασμένο ανοσοποιητικό σύστημα, ή συνδυασμό των δύο ^[46].

Ο καθοριστικότερος παράγοντας στην εμφάνιση της νόσου είναι η ανοσολογική αντίδραση του κάθε σκύλου και η επιθετικότητα του εκάστοτε στελέχους του παρασίτου. Αναλυτικότερα, μολυσμένοι σκύλοι από την ίδια ενδημική περιοχή μπορούν να παρουσιάσουν διαφορετικές αποκρίσεις. Αυτό σημαίνει ότι μετά τη μόλυνση κάποιοι σκύλοι είναι ικανοί να ελέγξουν το παράσιτο και να μην εμφανίσουν κλινικά συμπτώματα αμέσως ή ακόμη και καθόλη τη διάρκεια της

ζωής τους, ενώ άλλοι σκύλοι παρουσιάζουν έντονα κλινικά συμπτώματα αμέσως μετά την περίοδο επώασης του παρασίτου στο αίμα τους, η οποία διαρκεί περίπου 2-4 μήνες ^[47]. Έτσι λοιπόν, οι πιο ευαίσθητοι σκύλοι θα εμφανίσουν λεμφαδενοπάθειες (93%), δερματίτιδες (90%), ονυχογρύπωση (75%), απώλεια βάρους (26%), καχεξία (24%), κινητικά προβλήματα (23%), επιπεφυκίτιδες (18%), επίσταξη (9%) καθώς επίσης και έντονη ανοσολογική αντίδραση με υψηλά ποσά αντισωμάτων στο αίμα και εξασθενημένη κυτταρική ανοσία ^[48]. Παρόλα αυτά, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Ταρραγόνα της Ισπανίας, παρατηρήθηκε ότι ακόμη και μεταξύ των σκύλων που παρουσίασαν συμπτώματα, το 15% ήταν σε θέση να αυτοϊαθεί παρακάμπτωντας την εδραίωση της νόσου ^[49].

Εκτός από τους σκύλους, ξενιστές της *Leishmania* αποτελούν και λύκοι, αλεπούδες και τσακάλια, συμμετέχοντας στον κύκλο ζωής του παρασίτου στα άγρια περιβάλλοντα, αλλά λόγω των μικρών τους αριθμών και της απόστασης από κατοικημένες περιοχές δε θεωρούνται απειλητική δεξαμενή της νόσου, με εξαίρεση τις αλεπούδες οι οποίες πολλές φορές έρχονται σε στενή επαφή με οικόσιτα ζώα. Τέλος, το παράσιτο έχει απομονωθεί και από ερπετά, όρνιθες, άλογα, κουνέλια και γάτες που όμως αποτελούν περιστασιακούς φορείς χωρίς επιδημιολογική σημασία ^[46].

5. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Ο όρος μόλυνση αναφέρεται στην επαφή του ζώου με τον παθογόνο παράγοντα κατά το νύγμα. Το τι θα συμβεί μετά εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη-επιθετικότητα του παρασίτου και από το ανοσοποιητικό σύστημα του σκύλου. Αν το παράσιτο κατορθώσει να εγκατασταθεί και να πολλαπλασιαστεί μέσα στο σκύλο επέρχεται λοίμωξη. Αν αυτή, με τη σειρά της, δεν αντιμετωπιστεί είτε από το αμυντικό σύστημα του σκύλου είτε με θεραπεία, τότε θα παρουσιαστούν κλινικά συμπτώματα, δηλαδή νόσος ^[50].

Οι ανοσολογικές αποκρίσεις των σκύλων στη *Leishmania* κυμαίνονται σε ένα ευρύ φάσμα και εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες. Έτσι λοιπόν, η μόλυνση

από *Leishmania* μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση βαριάς μορφής νόσου, με έντονα συμπτώματα, η οποία αν δε θεραπευτεί οδηγεί στο θάνατο, στην εκδήλωση ελαφράς μορφής της νόσου με ήπια συμπτώματα ή ακόμη και σε απουσία συμπτωμάτων^[52].

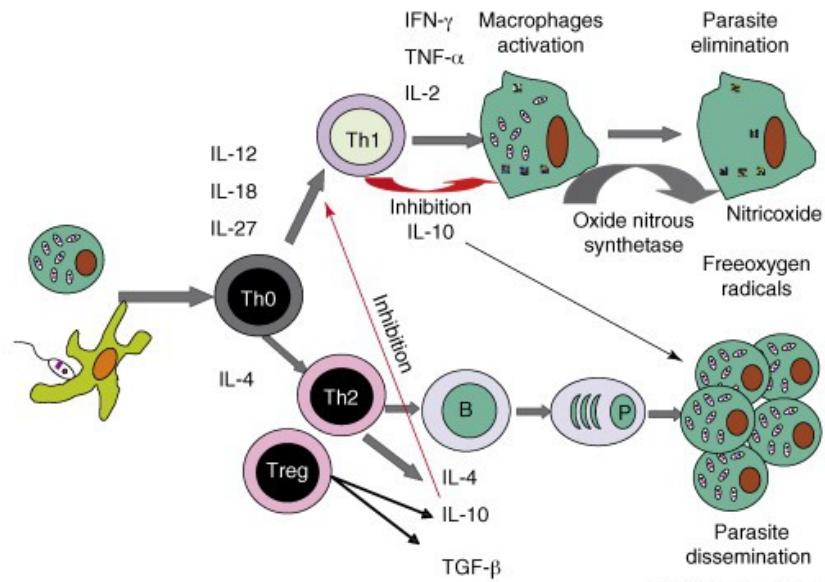
Αναλυτικότερα, η *Leishmania* με την προμασιγωτή της μορφή ενοφθαλμίζεται στο δέρμα. Εκεί, την πρώτη γραμμή άμυνας αποτελούν τα μονοκύτταρα, τα οποία τη φαγοκυτταρώνουν. Στη δεύτερη γραμμή άμυνας, τα ιστικά φαγοκύτταρα, τα κύτταρα του Langerhans και τα κερατινοκύτταρα, ικανά να παρουσιάζουν το νέο αυτό αντιγόνο στα λεμφοκύτταρα, τα οποία ευαισθητοποιούνται ώστε να εκκινήσουν την παραγωγή εξειδικευμένων κυττάρων, ή κοινώς να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς άμυνας που συνολικά καλούνται κυτταρική και χυμική ανοσία. Ειδικότερα στη λείσμανίαση, η κυτταρική ανοσία αποτελεί και την προστατευτική ανοσία που δεν είναι άλλη από την έντονη διέγερση των T1 βοηθητικών λεμφοκυττάρων (Th1) για την παραγωγή ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) , ιντερλευκίνης-2 (IL-2) και TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), ενός παράγοντα νέκρωσης όγκων που σχετίζεται με τη ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού και κατ'επέκταση με τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης^[50]. Οι ουσίες αυτές ενεργοποιούν τα μακροφάγα που δρουν καταλυτικά, φονεύοντας τις ενδοκυτταρικές, αμασιγωτές μορφές του παρασίτου, μέσω της παραγωγής μονοξειδίου του άνθρακα (NO)^[51].

Σημαντικό ρόλο στην καθυστέρηση εδραίωσης της νόσου διαδραματίζει και μια άλλη ιντερλευκίνη, η IL-12, η οποία λειτουργεί αυξάνοντας την παραγωγή IFN- γ . Πιθανολογείται πως παρόμοια λειτουργία έχει και η IL-18. Ένας ακόμη μηχανισμός που βοηθά στην αντιμετώπιση της νόσου από το ανοσοποιητικό σύστημα του σκύλου είναι η μεσολάβηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων ή αλλιώς CD8⁺ λεμφοκυττάρων, τα οποία ανιχνεύονται σε ασυμπτωματικούς σκύλους αλλά όχι σε σκύλους με συμπτώματα και εμπλέκονται στην άμεση λύση των μακροφάγων που έχουν μολυνθεί από το παράσιτο. Οι περισσότεροι μολυσμένοι σκύλοι είναι πιθανό να αναπτύξουν κάποιο επίπεδο κυτταρικής ανοσίας που σχετίζεται με την αύξηση των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων αλλά αυτή η

απόκριση μειώνεται όσο η νόσος εξελίσσεται. Συνήθως η ανάπτυξη αποτελεσματικής κυτταρικής ανοσίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με το παρασιτικό φορτίο του αίματος ^[50].

Αντίθετα, στην περίπτωση της χυμικής ανοσίας, (διέγερση για παραγωγή Β-λεμφοκυττάρων/αντισωμάτων), αυτή όχι μόνο δεν εμποδίζει την εξάπλωση αλλά καθίσταται επιβλαβής. Συγκεκριμένα, κατά την έντονη διέγερση των Β-λεμφοκυττάρων παρατηρείται αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων, με ταυτόχρονη διέγερση των Th2-λεμφοκυττάρων και παραγωγή ιντερλευκίνης-4 (IL-4) και ιντερλευκίνης-5 (IL-5). Οι δύο αυτές κυτοκίνες δρουν αναταγωνιστικά της IFN- γ και της ενεργοποίησης των μακροφάγων ώστε δεν ευνοείται η καταστροφή του πρωτοζώου ^[50].

Ακόμη, παρατηρείται έντονη παραγωγή ιντερλευκίνης-10 (IL-10) από τα CD25⁺ Th2-λεμφοκύτταρα σε σκύλους που παρουσιάζουν συμπτώματα. Αυτή η ιντερλευκίνη ρυθμίζει τις Th1 και Th2 αποκρίσεις, αναστέλλοντας τη μικροβιοκτόνο δράση των μολυσμένων μακροφάγων, γεγονός που βοηθά στην εξέλιξη της νόσου ^[53]. Ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα παραγωγή υψηλών επιπέδων ανοσοσφαιρινών (IgG1 και IgE) που είναι ανίκανες να προσβάουν την καλά προστατευμένη ενδοκυτταρική αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου. Σε ασυμπτωματικούς σκύλους επικρατεί η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανοσοσφαιρίνης-2 (IgG2). Παρόλα αυτά, άλλες μελέτες δείχνουν την παραγωγή IgG2 αντισωμάτων και σε σκύλους που εμφανίζουν συμπτώματα, απλώς ο τίτλος τους είναι μικρότερος. Όσο εξαπλώνεται η λοίμωξη και διεγείρεται η παραγωγή αντισωμάτων, αυξάνεται και η ποσότητα του κυκλοφορούντος αντιγόνου, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων που επικάθονται στους υμένες ποικίλων ιστών όπως το βασικό πέταλο του αγγειώδους σπειράματος και άλλων αγγείων, των αρθρικών υμένων και επιφανειών καθώς και αλλού, με αποτέλεσμα ενεργοποίηση μηχανισμών φλεγμονής και εγκατάσταση αλλοιώσεων στα όργανα αυτά ^[52].



Εικόνα 6: Η ανάπτυξη κυτταρικής ανοσίας μπορεί να οδηγήσει στην αντιμετώπιση του παρασίτου (πάνω), ενώ η ανάπτυξη χυμικής ανοσίας μπορεί να ευνοήσει την εξάπλωση του παρασίτου στον οργανισμό. ^[240]

Στην περίπτωση λοιπόν που δεν είναι δυνατή η ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας και συνεπώς ο περιορισμός της λοίμωξης στο σημείο του ενοφθαλμισμού, η *Leishmania* διασπείρεται δια μέσου των φαγοκυττάρων και αιματογενώς σε όλα τα όργανα, καθώς εισβάλλει σε όλα τα ιστικά κύτταρα που αναλαμβάνουν ρόλο φαγοκυττάρου, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται κυτταρικές διηθήσεις από μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, τα οποία θα έλεγε κανείς ότι “στραγγαλίζουν” τα εκάστοτε παρεγχυματικά κύτταρα που έτσι δυσλειτουργούν ^[50].

Πέρα από την παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων και κυτταρικών διηθήσεων φαίνεται ότι ενεργοποιούνται και μηχανισμοί παραγωγής αυτοαντισωμάτων. Έτσι σε μη ενδημικές περιοχές η νόσος συγχέεται πολλές φορές με ερυθηματώδη λύκο ^[50].

Με βάση τα παραπάνω, οι προσβεβλημένοι σκύλοι μπορούν να διαχωριστούν χονδροειδώς σε 2 ομάδες. Σε εκείνους στους οποίους επικρατούν τα Th1-λεμφοκύτταρα και αναπτύσσουν έντονη κυτταρική ανοσία, με χαμηλή παραγωγή

αντισωμάτων και επομένως αυτοθεραπεύονται ή μπορούν να θεραπευτούν και σε εκείνους που επικρατούν τα Th2-λεμφοκύτταρα με έντονη διέγερση χυμικής ανοσίας, οι οποίοι ασθενούν βαριά και η θεραπεία μπορεί να μην είναι αποδοτική (Εικόνα 6). Οι παραπάνω καταστάσεις παρότι φαίνεται να εδράζονται και σε γονιδιακές παραμέτρους δεν είναι στατικές. Τουτέστιν, είναι δυνατή η μετάπτωση από Th1 σε Th2 αποκρίσεις. Η παρουσία σύμμικτων λοιμώξεων (*Ehrlichia*, *Babesia*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*, *Bartonella* και *Dirofilaria*) ή άλλων παθολογικών καταστάσεων (κακή διατροφή, νεοπλάσματα) μπορούν να μετατρέψουν τον τύπο ανοσίας Th1 σε Th2 ^[50].

Έτσι, αν σε επίπεδο ρουτίνας αντί της απλής γενικής εξέτασης αίματος ήταν να δυνατό να εφαρμόζονται κυτταρομετρικές μέθοδοι ικανές να προσδιορίζουν την επικράτηση των Th1 ή Th2 λεμφοκυττάρων, αλλά και τους υποπληθυσμούς αυτών (CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, CDC25⁺ κ.ά.), σε συνδυασμό με την αξιολόγηση της κλινικής εικόνας, ο προσδιορισμός της πρόγνωσης και της θεραπείας θα ήταν πολύ πιο ακριβής ^[50].

6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Κατά τη σπλαχνική CanL, το παράσιτο είναι εξαπλωμένο εκτενώς μέσα στον οργανισμό εδραιώνοντας μία πολυσυστημική λοίμωξη που προσβάλλει το σπλήνα, το ήπαρ, τους λεμφαδένες, το μυελό των οστών, τους νεφρούς, το δέρμα και άλλα όργανα (Εικόνα 7). Αντιθέτως, στον άνθρωπο η λοίμωξη περιορίζεται μόνο στο μυελό των οστών, το σπλήνα και το ήπαρ ^{[54][55][56][57]}.

Αμέσως μετά το νύγμα του μολυσμένου φλεβοτόμου, τα παράσιτα διανέμονται στους λεμφαδένες και το σπλήνα μέσω του αίματος και της λέμφου και εν συνεχεία μεταναστεύουν στο ήπαρ και τους νεφρούς. Αργότερα, προσβάλλεται το αναπαραγωγικό σύστημα, το δέρμα, το πεπτικό σύστημα, η ουροδόχος κύστη, το αναπνευστικό σύστημα κ.ά. ^[58]

Η παρουσία του πρωτοζώου σε πολυάριθμους ιστούς ενεργοποιεί φλεγμονώδεις αντιδράσεις που προκαλούν διαταραχές στις λειτουργίες των οργάνων του ξενιστή και συνεπώς κλινικά συμπτώματα, με το τυπικότερο ιστοπαθολογικό

εύρημα της νόσου να αποτελεί η κοκκιωματώδης φλεγμονώδης αντίδραση που επάγεται από την παρουσία των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου εντός των μακροφάγων ^[70].



Εικόνα 7: Κλινικές εκδηλώσεις της CanL. Πυώδης κερατοεπιπεφυκίτιδα με περιοφθαλμική δερματίτιδα (πάνω αριστερά), αλλοιώσεις του δέρματος του προσώπου με πολυεστιακή αποφολιδωτική δερματίτιδα (πάνω δεξιά), επίσταξη (κάτω αριστερά), ονυχογρύπωση (κάτω κέντρο) και δερματικό έλκος του ωτός (κάτω δεξιά). ^[240]

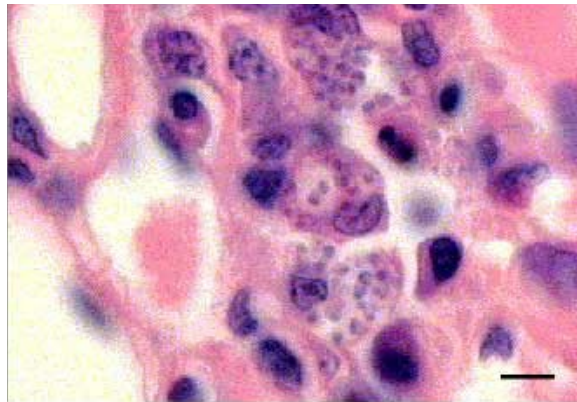
6.1 Δέρμα

Οι δερματικές βλάβες αποτελούν χαρακτηριστικό σύμπτωμα σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις CanL και σχετίζονται με την εκάστοτε ανοσολογική απόκριση. Στην απόκριση κατά την οποία επάγεται αντίσταση στη νόσο, παρατηρείται δερματίτιδα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυτάρων Langerhans, κερατινοκυττάρων τα οποία εκφράζουν το σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τύπου II (MHC class II), T-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και παρασίτων στη δερμίδα ^[59]. Στην απόκριση σε πιο επιρρεπείς σκύλους, παρατηρείται απουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και παρουσία μολυσμένων από *Leishmania*

μακροφάγων στις κακώσεις του δέρματος. Επίσης, συνυπάρχει μείωση της περιεκτικότητας του δέρματος σε ινοβλάστες κολλαγόνου τύπου I και αύξηση περιεκτικότητας σε ινοβλάστες τύπου III, γεγονός που σχετίζεται συνήθως με τη δημιουργία ελκών ^[60].

6.2 Νεφροί

Η νεφροπάθεια που σχετίζεται με την CanL μπορεί να εξελιχθεί από ασυμπτωματική πρωτεϊνουρία έως νεφροσικό σύνδρομο (πρωτεϊνουρία, υπολευκοματιναιμία και οίδημα) ή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που χαρακτηρίζεται από σπειραματονεφρίτιδα, διάμεση σωληναριακή νεφρίτιδα και αμυλοείδωση ^[71].

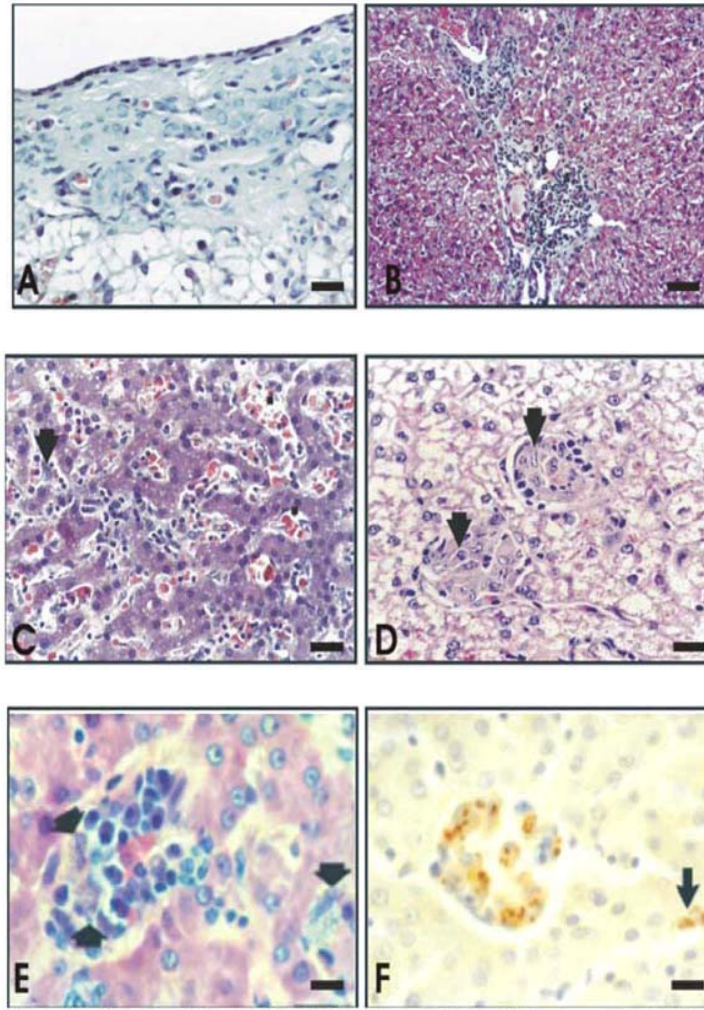


Εικόνα 9: Ιστοπαθολογικό εύρημα του νεφρού σε σκύλο με CanL. Στο διήθημα βρέθηκαν διάμεσα φλεγμονώδη μονοπύρρηνα κύτταρα καθώς και μακροφάγα που περιείχαν αμαστιγωτές μορφές *Leishmania spp.* στο κυτταρόπλασμά τους. ^[242]

Πιο συγκεκριμένα, στους νεφρούς εμφανίζονται βλάβες στα σπειράματα και τα σωληνάκια των νεφρών που προκαλούνται από το σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων IgG ^[61]. Τα τελευταία σχετίζονται με την εμφάνιση οξείας σπειραματονεφρίτιδας, η οποία οδηγεί τελικά σε νεφρική ανεπάρκεια. Η παρουσία T-λεμφοκυττάρων στις νεφρικές κακώσεις (Εικόνα 9) υποδηλώνει και την ανάπτυξη κυτταρικής ανοσίας στις περιπτώσεις σπειραματονεφρίτιδας ^[62]. Να σημειωθεί ότι σε σκύλους που δεν αναπτύσσουν ή αναπτύσσουν ελάχιστη χυμική ανοσία δεν εμφανίζεται νεφρική ανεπάρκεια ^[63].

6.3 Ήπαρ

Η μορφολογία του ήπατος διαφοροποιείται, καθώς παρουσιάζονται φλεγμονώδεις κυτταρικές μάζες που αφορούν την κάψα Glisson, την πυλαία τριάδα και τα ηπατικά λοβία, εμφανίζονται κοκκιώματα που αποτελούνται από μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, υπερπλασίες και υπερτροφία των κυττάρων Kurrfer (Εικόνα 10).

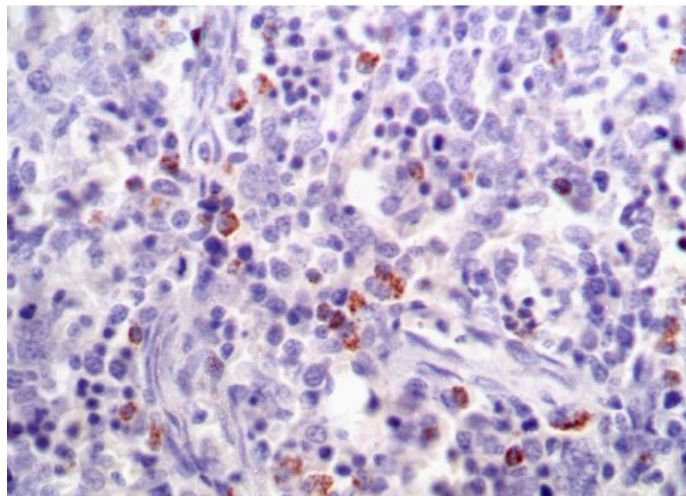


Εικόνα 10: Ηπατικά ιστολογικά δείγματα σκύλων που έχουν μολυνθεί με *Leishmania chagasi*. Χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση στην κάψα Glisson (A), χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση στην πυλαία τριάδα (B), υπερτροφία και υπερπλασία των κυττάρων Kurrfer (C), κοκκίωμα των ηπατικών λοβίων (D), παρουσία αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου στο εσωτερικό μακροφάγων κοκκιώματος (E) και στο εσωτερικό ενός κυττάρου Kurrfer (F). ^[243]

Η παρασιτική μόλυνση αλλάζει και τη μορφολογία των ηπατοκυττάρων, τροποποιώντας το ενδομεμβρανικό σύστημα και κατ' επέκταση το μεταβολισμό του ήπατος ^[64]. Ειδικότερα, παρουσιάζεται διόγκωση και σχηματισμός κενотоπίων (υδροπικός εκφυλισμός και στεάτωση). Παρατηρείται τέλος, συμφόρηση των κολποειδών τριχοειδών αγγείων που προκαλείται από αιμοσιδήρωση, δηλαδή εναπόθεση αιμοσιδηρίνης στα αγγειακά τοιχώματα ^[64].

6.4 Σπλήνας

Σε ότι αφορά στο σπλήνα, η CanL προκαλεί σπληνομεγαλία λόγω της αύξησης μονοκυττάρων και μακροφάγων (Εικόνα 11), αύξησης του ινώδους συνδετικού ιστού, καθώς και από αλλαγές στη δομή των αγγείων. Έτσι, παρατηρείται μια γενικότερη αποδιοργάνωση του λεμφικού ιστού που περιβάλλει την κεντρική αρτηρία του λευκού πολφού. Ταυτόχρονα, στον ερυθρό πολφό προκαλείται αυξημένος πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων και συσσώρευση κυττάρων πλάσματος και μολυσμένων μακροφάγων. Τέλος, παρουσιάζεται υπερτροφία των λεμφοζιδίων και δραματική ελάττωση των T-λεμφοκυττάρων ^[65].



Εικόνα 11: Αμαστιγωτές μορφές *Leishmania* στο εσωτερικό μακροφάγων στο σπλήνα σκύλου με CanL. ^[244]

6.5 Κυκλοφορικό σύστημα

Βλάβες προκαλούνται και σε αρτηρίες διαφόρων οργάνων όπως στο δέρμα, στον πεπτικό σωλήνα, στους νεφρούς, στου οφθαλμούς (πρόσθια ραγοειδίτιδα, επιπεφυκίτιδα, ξηρά κερατοεπιπεφυκίτιδα, βλεφαρίτιδα), στους πνεύμονες και αλλού ^[66]. Ακόμη, η παρουσία ιζημάτων IgG ανοσοσφαιρινών στα αγγεία μεταβάλλει τη διαπερατότητά τους, προκαλώντας προβλήματα στο κυκλοφορικό σύστημα (αναιμία, λεμφοκυτταροπενία, θρομβοκυτταροπενία, αύξηση ολικών πρωτεϊνών στο αίμα, διαταραχές δευτερογενούς αιμόστασης, ινωδόλυση, εωσινοπενία, μονοκυτταροπενία και λιγότερο συχνά ήπια λευκοκυττάρωση, λευκοκυτταροπενία, ουδετεροφιλία και ουδετεροπενία) που οδηγούν σε συμπτώματα όπως επίσταξη, αιματουρία και αιμορραγική διάρροια ^[66].

6.6 Μυοσκελετικό σύστημα

Ανωμαλίες στην κινητική ικανότητα των σκύλων με CanL προκαλούνται από την παρουσία αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου και ιζημάτων IgG στα μυϊκά κύτταρα, όπου προκαλούν ατροφία και νέκρωση στο μυϊκό ιστό ^[67]. Η διαβρωτική και μη διαβρωτική πολυαρθρίτιδα οφείλονται στην παρουσία αμαστιγωτών μορφών στο αρθρικό υγρό. Τα τραυματισμένα οστά παρουσιάζουν περιοστικές και ενδομυελικές πολλαπλασιαστικές αλλοιώσεις και συχνά οστεόλυση του μυελού και του φλοιού των οστών. Τέλος, η ανοσολογική απόκριση είναι δυνατόν να οδηγήσει και στην εμφάνιση αυτοάνοσων καταστάσεων, όπως είναι η χρόνια πολυμυϊτιδα που χαρακτηρίζεται από παρουσία διηθήσεων μονοπύρηνων κυττάρων, τα οποία εμπεριέχουν αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, καθώς και από εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στο μυϊκό ιστό, σε συνδυασμό με την παραγωγή αντισωμάτων ενάντια των μυϊκών ινών ^[67].

Αυτή η εκτεταμένη καταστροφή των ιστών και των οργάνων των προσβεβλημένων σκύλων είναι χαρακτηριστική και μπορεί να συγκριθεί με περιπτώσεις ανθρώπινης λεϊσμανίασης, όταν αυτή συνδυάζεται με προσβολή από τον ιό HIV, όπου η έλλειψη άμυνας των ασθενών αυτών ευνοεί την

εξάπλωση του παρασίτου σε πολλά σημεία του σώματος ^[68]. Έτσι, η πολυσυστημική αυτή λοίμωξη στους σκύλους οφείλεται στη σοβαρή ανοσοκαταστολή που προκαλείται από το παράσιτο, μια ανοσοκαταστολή που αρχικά αφορά μόνο ειδικές αποκρίσεις εναντίον του παρασίτου, αλλά τελικά επηρεάζει όλες τις λειτουργίες όλων των T-λεμφοκυττάρων ^[69].

7. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Τα κλινικά συμπτώματα στο σκύλο μπορεί να εμφανιστούν μήνες ή ακόμη και χρόνια μετά τη μόλυνση. Ο χρόνος επώασης της *Leishmania* κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 2 και 15 μηνών. Το παθολογικό φάσμα ποικίλλει λόγω διαφορών στο στέλεχος του παρασίτου και στις αποκρίσεις του κάθε σκύλου οδηγώντας σε διάφορες κλινικές μορφές, από ανενεργές λοιμώξεις παρόλο που είναι ανιχνεύσιμη μια γενική διάδοση του παρασίτου στο σώμα, μέχρι πολύ οξείες λοιμώξεις όπου το παράσιτο δύσκολα ανιχνεύεται αλλά υπάρχουν σημαντικές οργανικές βλάβες και σοβαρή συμπτωματολογία ^[72]. Έτσι, οι διάφορες περιπτώσεις CanL μπορούν να διαχωριστούν σε οξείες, υποξείες, χρόνιες ή λανθάνουσες ανάλογα με την ένταση της νόσου (Πίνακας 1) και σε πολυσυμπτωματικές, ολιγοσυμπτωματικές ή ασυμπτωματικές ανάλογα με τα κλινικά συμπτώματα ^{[73][74]}(Πίνακας 2).

7.1 Πρώιμα συμπτώματα

Καθώς η νόσος δε γίνεται πολλές φορές αντιληπτή κατά τα πρώτα στάδια, τα πρώιμα συμπτώματα έχουν μελετηθεί καλύτερα σε πειραματικά μοντέλα. Σε γενικές γραμμές, δεν υπάρχει ξεκάθαρη και ακριβής συμπτωματολογία για αυτήν την περίοδο, κατά την οποία μπορεί να παρουσιαστούν μη ειδικές αλλαγές στη γενική κατάσταση του ζώου. Τέτοιες αλλαγές περιλαμβάνουν την αργή αλλά σταθερή απώλεια βάρους που συνοδεύεται από εξασθένιση και απάθεια. Μετά τον τρίτο μήνα, πολλές φορές, παρατηρούνται δερματικές βλάβες, όπως η απώλεια τριχώματος γύρω από τους οφθαλμούς και τα αυτιά, καθώς επίσης και

ελαφρές καρδιακές προσβολές, επιπεφυκίτιδες και πόνος κατά την ψηλάφηση των νεφρών. Σε μερικές περιπτώσεις υπάρχουν αιμορραγίες [75].

7.2 Λανθάνουσα περίοδος

Κατά αυτήν την περίοδο εμφανίζεται, στους περισσότερους σκύλους, ένας αριθμός μη-ειδικών συμπτωμάτων, όπως υπερθερμία (39°C-40°C), απάθεια, εξασθένηση, αλλαγές στην όρεξη, πολυδιψία, απώλεια βάρους κ.ά. [76][77][78]

Πίνακας 1: Στάδια της CanL σε συνάρτηση με τη συμπτωματολογία

Κλινικά στάδια (τίτλος αντισωμάτων)	Κλινικά συμπτώματα	Αιματολογικές διαταραχές
Στάδιο I: ήπια ασθένεια (αρνητικός έως χαμηλά θετικός)	Ήπια συμπτώματα: περιφερική λεμφαδενομεγαλία ή βλατιδώδης δερματίτιδα	Συνήθως καμία
Στάδιο II: μέτρια ασθένεια (χαμηλά έως υψηλά θετικός)	Συμπτώματα του σταδίου I και επιπλέον διάχυτες ή συμμετρικές δερματικές αλλοιώσεις (απολεπιστική δερματίτιδα, ονυχογρύπωση, έλκη), ανορεξία, απώλεια βάρους, πυρετός και επίσταξη	Ήπια μη αναγεννητική αναιμία
Στάδιο III: σοβαρή ασθένεια (μέτρια έως υψηλά θετικός)	Συμπτώματα του σταδίου I ή II και επιπλέον ανοσολογικές βλάβες όπως αγγειίτιδα, αρθρίτιδα, ραγοειδίτιδα και σπειραματονεφρίτιδα	Αναιμία, λεμφοκυτταροπενία, θρομβοκυτταροπενία
Στάδιο IV: πολύ σοβαρή ασθένεια (μέτρια έως υψηλά θετικός)	Συμπτώματα του σταδίου III και επιπλέον πνευμονική θρομβοεμβολή ή νεφρωσικό σύνδρομο και τελικού σταδίου νεφρική νόσος	Αιματολογικές διαταραχές του σταδίου III και επιπλέον ινωδόλυση, εωσινοπενία, μονοκυτταροπενία

Ένα πολύ χαρακτηριστικό σύμπτωμα αυτής της φάσης αποτελεί η λεμφαδενοπάθεια με διόγκωση των λεμφαδένων, εκ των οποίων όσοι βρίσκονται πίσω από τις αρθρώσεις και στις σιαγόνες μπορούν εύκολα να ψηλαφιστούν ^[79]. Σημειώνονται επίσης σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία ^[80].

Η CanL χαρακτηρίζεται από 4 δερματικές μορφές που μπορεί να εμφανιστούν σε διάφορους συνδυασμούς, με ή χωρίς την παρουσία κλινικών εκδηλώσεων ή παθολογικών καταστάσεων. Αυτές είναι η αποφολιδωτική δερματίτιδα με παρουσία άφθονων και μεγάλων φολίδων και εστιών αλωπεκίας, ιδιαίτερα στην κεφαλή, στα πτερύγια των αυτιών και στα άκρα και γύρω από τους οφθαλμούς, η οζώδης δερματίτιδα με όγκους ή οζίδια κυρίως στην κεφαλή τον τράχηλο και τα άκρα, η ελκώδης δερματίτιδα με έλκη διαμέτρου 0,5-5 cm που συνήθως εντοπίζονται εκεί όπου υπάρχουν οστέινες προεξοχές, στο ακρορίνιο, στα χείλη των πτερυγίων των αυτιών και στα χείλη του στόματος και η φλυκταινώδης δερματίτιδα με φλύκταινες ή εφελκίδες που εντοπίζονται κυρίως στα σχετικά άτριχα σημεία του σώματος (κάτω επιφάνεια κορμού, μασχάλες, εσωτερική επιφάνεια άκρων) ^[81].

Άλλες δερματικές αλλοιώσεις που είναι δυνατόν να συνυπάρχουν με τις παραπάνω δερματικές μορφές είναι η λειχνοειδής δερματίτιδα, η ονυχογρύπωση (Εικόνα 12), ο αποχρωματισμός και η υπερκεράτωση του ακρορρινίου και των πελματικών φυμάτων. Κατά την πορεία της νόσου μπορεί επίσης να εμφανιστούν, περιονυχία, ονυχογρύπωση και ονυχορρηξία ^[82].

Η δερματική συμπτωματολογία διαφέρει σε σκύλους και ανθρώπους, καθώς στους τελευταίους παρατηρείται μόνο τοπική φλεγμονή και τα κλινικά συμπτώματα περιορίζονται στο σημείο της μόλυνσης, ενώ στους σκύλους τα δερματικά συμπτώματα εμφανίζονται καθώς η νόσος εξελίσσεται στα εσωτερικά τους όργανα.

Στους οφθαλμούς είναι συνήθης η βλεννώδης ή βλεννοπυώδης επιπεφυκίτιδα με κιτρινωπό έκκριμα. Η βλέννη είναι ωχρή λόγω αναιμίας. Σύνηθες σύμπτωμα αποτελεί και η κερατίτιδα που οδηγεί σε εξελκώσεις του κερατοειδούς χιτώνα και τελικά σε τύφλωση ^[83]. Η ρινική καταρροή χαρακτηρίζεται αρχικά από ορώδες

έκκριμα που σταδιακά εξελίσσεται σε πυοβλεννώδες. Η ρινορραγία ή αλλιώς επίσταξη μπορεί να συμβαίνει από το ένα ρουθούνι ή αμφίπλευρα και μπορεί να είναι διαλείπουσα ή συνεχής ^[83].

Παρατηρείται επίσης μυϊκή ατροφία που αυξάνεται καθώς η νόσος εξελίσσεται ^[84]. Το νευρικό σύστημα μπορεί να εμφανίσει τρόμο, κινητικές δυσλειτουργίες και στα τελικά στάδια ακόμη και παράλυση των πίσω άκρων. Επίσης μπορεί να εμφανιστούν αρθρίτιδα, χλωτότητα και οστεομυελίτιδα ^[84].



Εικόνα 12: Ονυχογρύπωση σε σκύλο με CanL ^[87]

7.3 Τελική φάση

Είναι δύσκολο να προβλεφθεί η τελική φάση της νόσου καθώς όπως αναφέρθηκε ο χρόνος εμφάνισης των συμπτωμάτων ποικίλλει από 2 μήνες μέχρι και χρόνια μετά τη μόλυνση. Κατά αυτή τη φάση, τα περισσότερα όργανα του σκύλου έχουν προσβληθεί και τα έλκη και οι εστίες αλωπεκίας είναι ευρέως εξαπλωμένα. Οι σκύλοι παρουσιάζουν καχεξία (Εικόνα 13) και ο θάνατος επέρχεται συνήθως λόγω νεφρικής ή ηπατικής ανεπάρκειας ^[75].



Εικόνα 13: Σκύλος με καχεξία, χαρακτηριστικό σύμπτωμα της CanL τελικού σταδίου ^[87]

Πίνακας 2: Συχνότητα των συμπτωμάτων σε 93 σκύλους με CanL ^[87]

Συμπτώματα	Αριθμός Σκύλων	Ποσοστό (%)
Λεμφαδενοπάθεια	86	93.5
Ονυχογρύπωση	69	75.0
Δερματικές βλάβες	54	58.7
Απώλεια βάρους	24	26.1
Καχεξία	22	23.9
Κινητικές ανωμαλίες	21	22.8
Υπνηλία	20	21.7
Επιπεφυκίτιδα	17	18.5
Ανορεξία	15	16.3
Πολυδιψία	12	13.0
Πολυφαγία	12	13.0
Ονυχορρηξία	10	10.9
Επίσταξη	8	8.7
Διάρροια	6	6.5
Αδιαθεσία	2	2.2
Βήχας	1	1.1

8. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της CanL δε διαφέρει ουσιαστικά από αυτή της λείσμανίασης στον άνθρωπο και περιλαμβάνει το συνδυασμό κλινικών, επιδημιολογικών, παρασιτολογικών και βιοχημικών εξετάσεων. Οι μέθοδοι διάγνωσης διακρίνονται σε εκείνες που εστιάζουν στην απομόνωση του παρασίτου από τον ξενιστή και μπορεί να είναι άμεσες ή έμμεσες και σε τεχνικές ανοσοδιάγνωσης οι οποίες ανιχνεύουν ξενιστικές ανοσολογικές αντιδράσεις, κυτταρικές ή χυμικές (Πίνακας 3).

8.1 Βιοχημικές εξετάσεις

Τα εργαστηριακά ευρήματα σε ότι αφορά στις πρωτεΐνες του ορού είναι κυρίως υπερσφαιριναιμία (πολυκλωνική βήτα ή/και γαμμασφαιριναιμία), υπολευκωματιναιμία και μείωση του κλάσματος λευκωματινών/σφαιρινών. Η γενική εξέταση αίματος συνήθως χαρακτηρίζεται από ήπια ως μέτρια μη αναγεννητική αναιμία, λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία, θρομβοκυτταροπάθεια, θρομβοκυτταροπενία και διαταραχές της δευτερογενούς αιμόστασης και ινωδόλυσης. Τέλος, η ανάλυση ούρων δείχνει ήπια ως βαριά πρωτεϊνουρία, νεφρική αζωθαιμία και αυξημένη δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων^[234].

8.2 Άμεση ανίχνευση παρασίτου

Εδώ κατατάσσονται οι ιστοχημικές και παρασιτολογικές εξετάσεις που σκοπό έχουν να ανιχνεύσουν την παρουσία του πρωτοζώου στους ιστούς και τα κύτταρα του σκύλου.

Στις ιστολογικές τομές των βιοψιών από το δέρμα συνήθως παρατηρείται κοκκιωματώδης, περιαγγειακή, οζώδης, διάχυτη ή λειχηνοειδής δερματίτιδα με ορθή ή παρακερατωτική υπερκεράτωση. Σε ένα μεγάλο ποσοστό περιστατικών δεν παρατηρούνται οι αμαστιγωτές μορφές, τόσο μέσα όσο και έξω από τα μονοπύρνα. Η δυσκολία της συγκεκριμένης μεθόδου έγκειται στην παρουσία μεγάλου αριθμού κυττάρων φλεγμονής στο σημείο της δερματικής βλάβης και

συνεπώς της βιοψίας, γεγονός που ενέχει μεγάλη πιθανότητα επιμόλυνσης του δείγματος ^[85].

Σε ότι αφορά τις παρασιτολογικές εξετάσεις, εφόσον διαπιστώνονται συμπτώματα CanL η διαγνωστική διερεύνηση θα πρέπει να ξεκινά με την εξέταση των λεμφογαγγλίων. Στους ασυμπτωματικούς σκύλους οι παρασιτολογικές εξετάσεις είναι συχνά αρνητικές. Το θετικό τους όμως αποτέλεσμα, ιδιαίτερα όταν ο αριθμός των παρασίτων είναι μεγάλος, αποτελεί έμμεση απόδειξη καταστολής της κυτταρικής ανοσίας και δημιουργεί σκέψεις για μελλοντική εμφάνιση της νόσου και ενδεχομένως για ανάληψη θεραπευτικής προσπάθειας. Για τους λόγους αυτούς καλό είναι να εξετάζονται παρασιτολογικά τα λεμφογάγγλια όλων των σκύλων που προσκομίζονται για προληπτικό έλεγχο ^[86].

Την πιο συνηθισμένη τεχνική για τη διάγνωση της CanL αποτελεί η ταυτοποίηση του παρασίτου σε επιχρίσματα που έχουν ληφθεί από τους ιγνυακούς λεμφαδένες ή το μυελό των οστών του ζώου, με επεμβατικές μεθόδους και έχουν υποστεί ειδική χρώση ή καλλιέργεια. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ασυμπτωματικούς σκύλους ^[87].

Συγκεκριμένα, μετά τη λήψη του δείγματος ακολουθεί χρώση Giemsa ή άλλες χρώσεις Romanowsky ώστε να αποκαλυφθούν οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Η μικροσκοπική παρατήρηση χρωματισμένου επιχρίσματος μυελού των οστών θεωρείται περισσότερο ευαίσθητη από εκείνη των λεμφαδένων, αλλά σε κάθε περίπτωση η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται από παρασιτικό φορτίο και συνεπώς από τη σοβαρότητα της νόσου. Εναλλακτικά, το δείγμα χρησιμοποιείται για καλλιέργεια σε μέσο καλλιέργειας NNN (Novy-McNeal-Nicolle), ώστε να αποκαλυφθούν οι προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου. Οι μορφές αυτές μπορεί να είναι ορατές από την πρώτη κιόλας εβδομάδα της καλλιέργειας ή μετά την παρέλευση περισσότερων εβδομάδων κατά τις οποίες το αρχικό δείγμα υφίσταται ανακαλλιέργειες σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Για να θεωρηθεί μια καλλιέργεια αρνητική ως προς την ύπαρξη Leishmania πρέπει να έχουν πραγματοποιηθεί 4 επιτυχημένες, αρνητικές ανακαλλιέργειες ^[87].

Παρόλο που η καλλιέργεια δείγματος αυξάνει την ευαισθησία της διάγνωσης περίπου κατά 20%, συγκριτικά με την άμεση χρώση και μικροσκοπική παρατήρηση, παρουσιάζει δυσκολίες στην εφαρμογή, όπως είναι η μεταφορά μιας άγριας αποικίας του παρασίτου σε θρεπτικό μέσο, η καθυστέρηση του αποτελέσματος, και η μεγάλη πιθανότητα επιμόλυνσης. Έτσι, αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται περισσότερο σε επιδημιολογικές μελέτες που απαιτούν απομόνωση και βιοχημική ταυτοποίηση του παρασίτου, παρά σε εξετάσεις για τη διάγνωση πρώιμης μορφής της νόσου ^[87].

Μία τεχνική διαπίστωσης της ύπαρξης του παρασίτου σε ένα δείγμα, η οποία εγείρει έντονους ηθικούς προβληματισμούς και χρησιμοποιείται μόνο σε περιορισμένες ερευνητικές μελέτες, είναι η ξενοδιάγνωση μέσω της διαμόλυνσης ποντικών ή χάμστερ. Πιο συγκεκριμένα, τα πειραματόζωα ενοφθαλμίζονται με το ύποπτο δείγμα και μετά την παρέλευση 2 μηνών ο σπλήνας τους αφαιρείται και εξετάζεται για την παρουσία του παρασίτου ^[87].

Τέλος, διάγνωση μπορεί να γίνει και μέσω της επαφής του άρρωστου ζώου με φλεβοτόμους που δε φέρουν το παράσιτο, ώστε να διαπιστωθεί αν μετά την επαφή οι φλεβοτόμοι θα έχουν μολυνθεί. Αυτή η μέθοδος δεν αποτελεί εύχρηστο διαγνωστικό εργαλείο, αλλά επιδεικνύει μεγάλη χρησιμότητα σε επιδημιολογικές έρευνες, που αποσκοπούν στη μελέτη της φυσικής ιστορίας της CanL ^{[88][89]}.

8.3 Έμμεση ανίχνευση παρασίτου

Εκτός από την άμεση ανίχνευση του παρασίτου στους ιστούς του ξενιστή, έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι έμμεσης ανίχνευσης, οι οποίες περιλαμβάνουν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, όπως είναι ο άμεσος ανοσοφθορισμός. Μέσω του ανοσοφθορισμού διαφοροποιούνται οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου από τον υπόλοιπο ιστό, καθώς χρωματίζονται ειδικά, με φθορίζουσες χρωστικές. Ωστόσο, η πιο επιτυχημένη μέθοδος διάγνωσης της CanL, τα τελευταία χρόνια, αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή αλλιώς PCR (Polymerase Chain Reaction), με όλες τις παραλλαγές της, η οποία χαρακτηρίζεται από

αξιοημείωτη ευαισθησία και ειδικότητα και συνολικά 89%-100% επιτυχία σε σκύλους που εμφανίζουν συμπτώματα ^[87].

Η PCR μπορεί να διεξαχθεί χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο είτε γενομικό DNA του παρασίτου, είτε DNA των κινητοπλαστών αυτού, το οποίο έχει απομονωθεί από το αίμα, το δέρμα, τους λεμφαδένες, τους επιπεφυκότες ή το μυελό των οστών του μολυσμένου σκύλου. Παρόλο που η λήψη αίματος για την απομόνωση του DNA-στόχου δεν αποτελεί επεμβατική μέθοδο, το παρασιτικό φορτίο στο αίμα είναι χαμηλότερο σε σύγκριση με άλλους ιστούς και συνεπώς δεν προτιμάται. Η ειδικότητα και η ευαισθησία της PCR εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι οι εκκινητές, η μέθοδος με την οποία έχει απομονωθεί το DNA-στόχος, ο αριθμός αντιγράφων αυτού που υπάρχουν στο δείγμα, το υλικό της βιοψίας και το πρωτόκολλο της εκάστοτε PCR ^[87].

Διάφορες ορολογικές διαγνωστικές μέθοδοι που θα αναλυθούν παρακάτω, όπως είναι η δοκιμασία ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) και το στύπωμα Western είναι εξίσου αποτελεσματικά με την PCR ^[90]. Παρόλα αυτά, παρουσιάζουν διάφορα μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι δεν υπάρχει κοινή ομοφωνία σε ότι αφορά τις ζώνες πρωτεϊνών που εμφανίζονται στο στύπωμα Western, το γεγονός ότι υπάρχουν αμφιβολίες σχετικά με τη σταθερότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία ELISA, καθώς και το γεγονός ότι και οι δύο τεχνικές πρέπει να εφαρμόζονται σε εξειδικευμένα εργαστήρια ^[87].

Ένα ακόμη πλεονέκτημα της PCR έναντι στη δοκιμασία ELISA είναι ότι ακόμη και μετά από θεραπεία κατά της λεισμανίασης τα αντισώματα του σκύλου δεν ελαττώνονται αν δεν επέλθει πάροδος τουλάχιστον δύο μηνών και μπορεί να είναι ανιχνεύσιμα ακόμη και 2 χρόνια μετά τη θεραπεία. Έτσι η δοκιμασία ELISA η οποία ανιχνεύει αντισώματα ειδικά για το παράσιτο στον ορό του ξενιστή, αφήνει αμφιβολίες σχετικές με το αν έχει επέλθει πλήρης ανάρρωση μετά τη θεραπεία. Από την άλλη πλευρά, το DNA του παρασίτου σταματά να ανιχνεύεται από την PCR μετά την πάροδο 3 εβδομάδων από την καταστροφή του. Έτσι, ακόμη και σε σκύλους που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία, η PCR μπορεί να

ανιχνεύσει την επίμονη παρουσία βιώσιμων παρασίτων, ακόμη και αν έχει απομείνει πολύ μικρή ποσότητα αυτών και συνεπώς να διαπιστωθεί αν η θεραπεία ήταν επιτυχής ^[87].

Τέλος, η PCR αποτελεί ισχυρότατο εργαλείο επιδημιολογικών μελετών, λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της και άρα της ικανότητάς της να εντοπίζει ασυμπτωματικούς σκύλους-φορείς. Πιο συγκεκριμένα, η PCR έχει εντοπίσει την παρουσία του παρασίτου σε 24 από 30 ασυμπτωματικούς σκύλους στη Μασσαλία της Γαλλίας, υποδεικνύοντας ότι σε αυτήν την περιοχή το 80% περίπου των σκύλων είναι μολυσμένο. Παρομοίως, στο νησί της Μαγιόρκα στην Ισπανία όπου ενδημεί η CanL, βρέθηκε με τη χρήση της PCR ότι το 54% των υγιών σκύλων είναι ασυμπτωματικοί φορείς ^[87].

8.4 Ανοσοδιάγνωση

Σε αυτήν την κατηγορία υπάγονται διαγνωστικές μέθοδοι που στοχεύουν στην ανίχνευση ανοσολογικών αποκρίσεων του ξενιστή, ειδικών για τα αντιγόνα της *Leishmania*. Οι αποκρίσεις που μετρούνται μπορεί να είναι είτε κυτταρικές είτε χυμικές.

8.4.1 Κυτταρική ανοσία

Ένα πολύ συνηθισμένο τεστ που βασίζεται στην κυτταρική ανοσολογική απόκριση του σκύλου στη *Leishmania*, είναι το δερματικό τεστ καθυστερημένης υπερευαισθησίας, ή αλλιώς Montenegro skin test ή τεστ λείσμανίνης (*leishmanin test*). Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τον ενοφθαλμισμό απενεργοποιημένων προμαστιγωτών μορφών *Leishmania* στο δέρμα του σκύλου, σε συγκέντρωση 3×10^5 ^[91]. Το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό αν μετά την παρέλευση 48 ή 72 ωρών από την εφαρμογή του τεστ, εμφανιστεί ένας δακτύλιος μεγαλύτερος των 5 mm σε διάμετρο γύρω από το σημείο του ενοφθαλμισμού, όπου το δέρμα θα παρουσιάζει σκλήρυνση ^[91].

8.4.2 Χυμική ανοσία

Η ειδική χυμική ανοσολογική απόκριση που παρατηρείται στην CanL είναι συνήθως πολύ έντονη, με παρουσία υψηλών τίτλων αντισωμάτων IgG, γεγονός που καθιστά την ορολογική διάγνωση ευρέως διαδεδομένη. Από τις ορολογικές εξετάσεις σκύλων μπορεί να προκύψουν οι εξής περιπτώσεις ^[87]:

α) Σκύλοι με συμπτωματολογία και πολύ ισχυρή θετική ορολογική αντίδραση. Αυτή η ομάδα αφορά περίπου το 90-95% των μολυσμένων σκύλων οι οποίοι είναι αρνητικοί στο δερματικό τεστ. Από αυτούς τους σκύλους είναι πολύ εύκολο να απομονωθεί το παράσιτο.

β) Σκύλοι με αμφίβολη ή αρνητική ορολογική αντίδραση, αλλά εμφανή συμπτώματα της νόσου. Αυτή η ομάδα αφορά περίπου το 5% των περιπτώσεων. Οι λόγοι για τους οποίους δεν υπάρχει ξεκάθαρο θετικό αποτέλεσμα είναι συνήθως η ανάγκη ρύθμισης της διαγνωστικής τεχνικής που χρησιμοποιείται ή κάποιο πρόβλημα ανοσολογικής φύσης του σκύλου, το οποίο ελαττώνει ή εκμηδενίζει την απόκριση χυμικής ανοσίας. Το δερματικό τεστ είναι αρνητικό σε αυτήν την ομάδα και τη νόσο επιβεβαιώνει η απομόνωση του παρασίτου από τους ιστούς.

γ) Ασυμπτωματικοί σκύλοι με υψηλό, χαμηλό ή καθόλου τίτλο αντισωμάτων. Σε αυτήν την ομάδα ανήκουν σκύλοι με τίτλους αντισωμάτων οι οποίοι παρουσιάζουν διακυμάνσεις. Το δερματικό τεστ δίνει συνήθως αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ είναι σχετικά εύκολο να απομονωθεί το παράσιτο από τους λεμφαδένες ή το μυελό των οστών. Οι σκύλοι που ανήκουν σε αυτήν την ομάδα θα εμφανίσουν τη νόσο μετά από ένα σχετικά μεγάλο διάστημα λανθάνουσας φάσης.

δ) Ανθεκτικοί σκύλοι χωρίς σημάδια της νόσου. Εδώ ανήκουν σκύλοι που παρουσιάζουν αρνητικό αποτέλεσμα σε ορολογικά τεστ, τίτλους αντισωμάτων με διακυμάνσεις, θετικό δερματικό τεστ και υψηλά επίπεδα IFN- γ , γεγονός που σημαίνει προστατευτική απόκριση των Th1-λεμφοκυττάρων. Η απομόνωση του παρασίτου από αυτήν την ομάδα είναι δύσκολη και η μόλυνση συνήθως είναι δυνατό να ανιχνευθεί μόνο με PCR. Ο σκύλος μπορεί να παραμείνει σε αυτήν την

κατάσταση επ' αόριστον ή να εμφανίσει σημάδια CanL λόγω συνύπαρξης παραγόντων που προκαλούν αποδυνάμωση και τελικά απώλεια της κυτταρικής ανοσίας. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι η ηλικία, κάποια συνυπάρχουσα μόλυνση κ.ά.

ε) Αντιδράσεις διασταύρωσης. Παρόλο που κάποιοι σκύλοι δεν έχουν μολυνθεί από *Leishmania*, εμφανίζουν χαμηλό τίτλο αντισωμάτων λόγω μόλυνσης από άλλα συγγενή παράσιτα, όπως από *Trypanosoma*. Μπορεί ακόμη και να έχουν έρθει σε επαφή με στελέχη *Leishmania* αλλά η μόλυνση να μην εξελίχθηκε. Αυτές οι περιπτώσεις οδηγούν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα και απαιτούν επανεξέταση με χρήση διαφορετικής διαγνωστικής μεθόδου.

8.4.2.1 Ορολογικές δοκιμασίες

Για την ανίχνευση των αντισωμάτων στον ορό χρησιμοποιούνται διάφορες δοκιμασίες, όπως είναι το τεστ αντισωματικού ανοσοφθορισμού IFAT (ImmunoFluorescence Antibody Test), το άμεσο τεστ συγκόλλησης αντισωμάτων DAT (Direct Agglutination Test), η δοκιμασίες ELISA και dot-ELISA, το στύπωμα Western και το τεστ ανοσοχρωματογραφίας. Όλες οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούν ως αντιγόνα είτε ολόκληρα παράσιτα είτε διαλυτά εκχυλίσματα τμημάτων τους. Εκείνες οι οποίες χρησιμοποιούν ολόκληρα παράσιτα, όπως το τεστ IFAT, παρέχουν επαναλήψιμα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, για αυτό και προτιμώνται περισσότερο από τους κτηνιάτρους ^[87].

Συνήθως, για να θεωρηθεί ότι ένας σκύλος νοσεί από CanL πρέπει να υπάρχει συμφωνία μεταξύ ορολογικών και παρασιτολογικών εξετάσεων. Αυτό γιατί, πολλές φορές είναι αδύνατο να απομονωθεί το παράσιτο από τους ιστούς του σκύλου, παρόλο που οι ορολογικές εξετάσεις είναι θετικές ή και το αντίστροφο, γεγονός που οδηγεί σε ψευδώς θετικό ή ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα. Ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται σε ανοσολογικές αντιδράσεις που προκλήθηκαν από μόλυνση με κάποιο άλλο παράσιτο όπως από *Babesia canis* ^[92], *Trypanosoma congolense*, ή *Trypanosoma evansi* ^{[93][94]}. Ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται σε χαμηλή ευαισθησία του τεστ που

χρησιμοποιήθηκε. Επίσης, σε μολυσμένους σκύλους που βρίσκονται ακόμη στα αρχικά στάδια της νόσου μπορεί ο τίτλος αντισωμάτων να είναι πολύ χαμηλός ώστε να ανιχνευθεί ή σε σκύλους που αρχικά θεωρήθηκαν οροθετικοί στη συνέχεια ο τίτλος αντισωμάτων τους να μειώθηκε κάτω από τα ανιχνεύσιμα επίπεδα που επιτρέπουν κάποια διαγνωστικά τεστ ^[87].

Το στύπωμα Western έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από το τεστ IFAT και από τη δοκιμασία ELISA αλλά η διαδικασία δεν έχει ακόμη τυποποιηθεί και έτσι μπορεί να μην είναι τόσο αξιόπιστη. Πιο συγκεκριμένα, η ερμηνεία των ζωνών που λαμβάνονται από το στύπωμα είναι αμφιλεγόμενη και σε κάθε εργαστήριο διαφορετική. Υπάρχει φυσικά μια αλληλουχία συγκεκριμένων ζωνών που υπονοεί την ύπαρξη μόλυνσης/νόσου ^[87]. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι σε πειραματικά μολυσμένους σκύλους η πρώτη πρωτεϊνική ζώνη που υποδεικνύει μόλυνση είναι αυτή των 26 kDa ακόμη και αν το τεστ IFAT βγει αρνητικό. Οι επόμενες ζώνες που εμφανίζονται είναι αυτές των 50-57 kDa και 42 kDa όταν ο σκύλος βρίσκεται ακόμη σε λανθάνουσα φάση. Η ζώνη των 26 kDa είναι χαρακτηριστική της οξείας φάσης της νόσου ενώ αυτές των 42, 76 και 86 kDa χαρακτηρίζουν τη λανθάνουσα φάση. Οι ζώνες των 34-35,5 kDa εμφανίζονται σε σκύλους που πρόκειται να αναπτύξουν νόσο με σοβαρή συμπτωματολογία ^[95].

Το μοτίβο των ζωνών που εμφανίστηκαν σε πειραματικά μολυσμένους σκύλους είναι παρόμοιο με εκείνο που εμφανίστηκε σε σκύλους που μολύνθηκαν με φυσικό τρόπο, με χαρακτηριστική τη ζώνη των 26 kDa κατά την οξεία φάση της νόσου και πριν τη θεραπεία ^[95]. Επομένως, αυτή η πρωτεϊνική ζώνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης επίπτωσης σε επιδημιολογικές μελέτες και κλινικές δοκιμασίες ^[96].

Το γεγονός ότι οι συμβατικές ορολογικές διαγνωστικές τεχνικές χρησιμοποιούν ακατέργαστα αντιγόνα που μπορεί να είναι είτε ολόκληρες αμαστιγωτές ή προμαστιγωτές μορφές του παρασίτου, είτε διαλυτά εκχυλίσματα τμημάτων τους, ελαττώνει σημαντικά την ειδικότητά τους. Για να ξεπεραστεί λοιπόν αυτός ο περιορισμός, διάφορα εργαστήρια ερευνούν την ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν για αντιγόνα *Leishmania*, ώστε να τα χρησιμοποιήσουν για την

ανάπτυξη ειδικότερων ορολογικών διαγνωστικών μεθόδων. Μελετάται λοιπόν η αντισωματική απόκριση των μολυσμένων σκύλων σε διάφορα ανασυνδυασμένα αντιγόνα *L. infantum*, όπως είναι οι ιστόνες H2A ^[97], H3 ^[98], H2B και H4 ^[99], οι πρωτεΐνες θεμικού σοκ Hsp70 ^[100] και Hsp83 ^[101], οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες P0 ^[102], P2a και P2b ^[102], καθώς και οι πρωτεΐνες gp63 ^[103], PSA ^[104] και KMP-11 ^[105]. Έχει επίσης δειχθεί ότι τα ανασυνδυασμένα αντιγόνα A2 ^[106] και νουκλεοσιδική υδρολάση ^[107] του *L. donovani* αναγνωρίζονται από τα αντισώματα του ορού σκύλων με CanL και ειδικά το δεύτερο έχει προταθεί ως δείκτης εξέλιξης της νόσου, καθώς ανιχνεύεται κυρίως από ανοσοσφαιρίνες της τάξης IgG1. Τέλος, έχει προταθεί η χρήση ενός χιμαιρικού αντιγόνου που αποτελείται από το συνδυασμό των αντιγονικών καθοριστών των ριβοσωμικών πρωτεϊνών P0, P2a και P2b καθώς και της ιστόνης H2A του *L. infantum* ^[108].

Παρόλο που έχουν κατά καιρούς κατασκευαστεί διάφορα ανασυνδυασμένα αντιγόνα για τη βελτίωση των ορολογικών διαγνωστικών τεχνικών της CanL, μόνο ένα έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από τη δοκιμασία ELISA, το ανασυνδυασμένο αντιγόνο K39 ^{[109][110][111]}. Αυτό το αντιγόνο περιλαμβάνει επαναλήψεις μια αλληλουχίας 39 αμινοξέων, τα οποία σχηματίζουν έναν επίτοπο παρόμοιο με την πρωτεΐνη κινεσίνη του *L. chagasi*. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται κυρίως στις αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου και είναι υψηλώς συντηρημένη μεταξύ των ειδών *Leishmania* ^[112]. Η διαγνωστική τεχνική rK39-ELISA παρουσιάζει 93%-100% ευαισθησία και 99%-100% ειδικότητα σε σκύλους που εμφανίζουν ξεκάθαρα συμπτώματα της νόσου ^[110]. Σε ότι αφορά ασυμπτωματικούς σκύλους, η μέθοδος έχει μικρότερη ευαισθησία, καθώς έχει εμφανίσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για σκύλους που παρασιτολογικά ήταν θετικοί. Αυτό συμβαίνει ίσως διότι τα αντισώματα κατά του rK39 αντιγόνου ανιχνεύονται κυρίως κατά τη φάση ενεργής νόσου ^[87].

Πρόσφατα έκαναν την εμφάνισή τους και ειδικές ταινίες ανοσοχρωματογραφίας που χρησιμοποιούν ως δείκτη το αντιγόνο rK39, οι οποίες όμως παρουσιάζουν πολύ χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα, της τάξης του 72%-77% και 61%-75% αντίστοιχα. Πιθανότατα, ο λόγος για τη χαμηλή ειδικότητα είναι η αντίδραση

διασταύρωσης του rK39 με κάποιον άγνωστο παράγοντα του αίματος των σκύλων, καθώς η ίδια τεχνική παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα σε ανθρώπους που έχουν μολυνθεί από *Leishmania*. Οι μέθοδοι ανοσοχρωματογραφίας είναι εξαιρετικά χρήσιμες σε έρευνες πεδίου, λόγω της ευκολίας χρήσης και της ταχείας εμφάνισης αποτελεσμάτων, επιτρέποντας άμεση παρέμβαση του κτηνιάτρου. Παρόλα αυτά χρήζουν βελτίωσης με στόχο την υψηλότερη ειδικότητα και ευαισθησία τους ^[87].

Πίνακας 3: Διαγνωστικές μέθοδοι της CanL

Ανίχνευση του παρασίτου

Άμεση ανίχνευση

- Μικροσκοπική παρατήρηση (χρώση Giemsa)

- Κυτταροκαλλιέργεια

- Πειραματικός ενοφθαλμισμός σε επιρρεπή στην CanL ζώα

- Ξενοδιάγνωση

Έμμεση ανίχνευση

- Ανοσοιστοχημικές μέθοδοι (ανοσοϋπεροξειδάση, μονοκλωνικά αντισώματα κ.τ.λ.)

- Υβροδισμός με DNA ανιχνευτές

Ανοσοδιάγνωση

- Κυτταρική ανοσία (δερματικό τεστ λείσμανίνης)

Χυμική ανοσία

- Ανοσοδιάχυση

- Ανοσοηλεκτροφόρηση

- Μέθοδοι συγκόλλησης

- Τεστ έμμεσου ανοσοφθορισμού αντισωμάτων

- ELISA, dot-ELISA, ELISA με ανασυνδυασμένα αντιγόνα

- Στύπωμα Western

- Τεστ ανοσοχρωματογραφίας

Τελικά, δεν υπάρχει κάποια τεχνική που να χαρακτηρίζεται από 100% ευαισθησία και ειδικότητα. Επομένως, η επιλογή της διαγνωστικής μεθόδου εξαρτάται από τις ανάγκες και το στόχο της εκάστοτε εξέτασης, που μπορεί να είναι η διάγνωση μιας κλινικής περίπτωσης, η αξιολόγηση μιας θεραπείας ή η ταυτοποίηση πιθανών φορέων της νόσου.

9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Παρόλο που η ανίχνευση του παρασίτου σε ένα μολυσμένο σκύλο είναι μέγιστης σημασίας, η πραγματική σημασία της παρουσίας του εγείρει προβληματισμούς. Όπως προαναφέρθηκε, η εξαφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων δε συνάδει απαραίτητα με την εκρίζωση του παρασίτου και ένας σημαντικός αριθμός σκύλων που υποβάλλονται σε θεραπεία, τα κλινικά συμπτώματα των οποίων παύουν μετά τη λήξη αυτής, ανακτούν την ικανότητα να μολύνουν φλεβοτόμους μερικούς μήνες μετά. Επίσης, δεν είναι πάντοτε σίγουρο ότι η μόλυνση θα οδηγήσει σε νόσο και εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων ούτε ότι ο σκύλος θα παρουσιάσει πλήρη ανάρρωση, υποτροπή ή παραμονή σε λανθάνουσα κατάσταση μετά τη θεραπεία. Η θεραπεία θα πρέπει να ξεκινά μόλις διαγνωστεί η CanL ανεξάρτητα από το αν ο σκύλος εμφανίζει ή όχι συμπτώματα. Στα ασυμπτωματικά ζώα η έγκαιρη έναρξη της θεραπείας αποτρέπει την εμφάνιση των συμπτωμάτων και επιπλέον μειώνει τον κίνδυνο της μετάδοσης του πρωτοζώου στους φλεβοτόμους. Ορισμένοι ερευνητές συνιστούν να μην αναλαμβάνεται θεραπευτική προσπάθεια στα κλινικά εκείνα περιστατικά που εμφανίζουν νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου λόγω της δυσμενούς πρόγνωσης ^[14]. Κανένας σχεδόν σκύλος με CanL και νεφρική ανεπάρκεια 3ου σταδίου (ουραιμικό σύνδρομο) δεν επέζησε, παρά την εντατική υποστηρικτική αγωγή και την κατάλληλα τροποποιημένη αντιλειτουργική θεραπεία. Όμως και στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να ξεκινήσει η θεραπεία εφόσον ζητηθεί από τον ιδιοκτήτη του ζώου, ο οποίος θα πρέπει προηγουμένως να ενημερωθεί για τις μικρές πιθανότητες επιτυχίας.

Στόχοι της θεραπείας είναι η υποχώρηση των συμπτωμάτων η αποκατάσταση των αιματολογικών και βιοχημικών διαταραχών και γενικά η κλινική ίαση. Στους ασυμπτωματικούς σκύλους η θεραπεία θα πρέπει να αποτρέψει την εκδήλωση των συμπτωμάτων^[114]. Απώτερος σκοπός και στις δύο περιπτώσεις είναι η πλήρης εξουδετέρωση του πρωτοζώου (παρασιτολογική ίαση), προκειμένου να αποτραπεί η υποτροπή μετά τη διακοπή της θεραπείας. Επιπλέον, η θεραπεία μπορεί να διεγείρει την προστατευτική κυτταρική ανοσία μέσω των Th1. Με τον τρόπο αυτό ενδέχεται να επέλθει οριστική ίαση λόγω της καταστροφής των παρασίτων από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και να αποτραπεί η επανεμφάνιση της νόσου σε περίπτωση μελλοντικής επαναμόλυνσης^{[115][116][117]}. Στις περιοχές όπου η νόσος ενδημεί η πιθανότητα μόλυνσης των φλεβοτόμων από τα ζώα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία θα πρέπει ουσιαστικά να μηδενιστεί^[118]. Δυστυχώς, δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα κανένα θεραπευτικό πρωτόκολλο με το οποίο να επιτυγχάνονται όλοι οι παραπάνω στόχοι στην CanL^[114].

Όπως προαναφέρθηκε, η θεραπεία ξεκινά μόνο μετά από διαπίστωση μόλυνσης η οποία γίνεται με την ανίχνευση αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου είτε σε δείγμα βιοψίας είτε σε αναρρόφημα μυελού των οστών ή λεμφαδένων. Η διαπίστωση της μόλυνσης με *Leishmania* μπορεί επίσης να γίνει, όπως προαναφέρθηκε, με ορολογικές διαγνωστικές μεθόδους, το θετικό αποτέλεσμα των οποίων πρέπει να συνάδει και με την παρουσία κλινικών συμπτωμάτων, ακόμη και αν δεν είναι δυνατή η ανίχνευση του παρασίτου σε δείγματα βιοψίας. Πριν την έναρξη της θεραπείας είναι καλό να εκτιμάται η γενική κατάσταση του σκύλου, δηλαδή η θερμοκρασία, το βάρος, το μέγεθος του σπλήνα, η παρουσία ή μη συμπτωματολογίας, το αίμα και οι ηπατική και νεφρική λειτουργία. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας θα πρέπει να διεξάγονται τακτικές εξετάσεις των ηπατικών, καρδιακών και νεφρικών λειτουργιών^[113].

Η απόκριση στη θεραπεία είναι συνήθως γρήγορη, που σημαίνει ότι μέσα σε διάστημα λίγων ημερών η γενική κατάσταση του σκύλου βελτιώνεται σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, ο πυρετός εξαφανίζεται, το βάρος αρχίζει να επανέρχεται σε

φυσιολογικά επίπεδα, η διόγκωση της κοιλιακής χώρας μειώνεται, οι δερματικές βλάβες επουλώνονται και η φυσιολογική εικόνα του αίματος αποκαθίσταται. Στις περιπτώσεις που δεν παρατηρείται βελτίωση συνήθως συνυπάρχει κάποια άλλη μόλυνση ή πρόκειται για μόλυνση με στέλεχος ανθεκτικό στη θεραπεία. Μετά το πέρας της θεραπείας, πρέπει να διεξάγονται βιοχημικές, κλινικές και παρασιτολογικές εξετάσεις, ώστε οι σκύλοι που έχουν φαινομενικά θεραπευτεί να εξετάζονται τακτικά για ανίχνευση πιθανής υποτροπής^[113].

Οι θεραπείες που εφαρμόζονται για την αντιμετώπιση της CanL είναι οι ίδιες με εκείνες που εφαρμόζονται στη λείσμανίαση του ανθρώπου από το δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα, με διαφορές μόνο στη μέθοδο χορήγησης και τη δοσολογία. Οι φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται διακρίνονται σε παρασιτοκτόνες-παρασιτοστατικές και σε ανοσορυθμιστικές. Οι πρώτες είναι οι πεντασθενείς ενώσεις αντιμονίου που αποτελούν και φάρμακα πρώτης επιλογής, η αλλοπουρινόλη, η παρομομυκίνη (αμινοσιδίνη), η αμφοτερικίνη Β και η μιλτεφοσίνη, που αποτελούν δευτερεύουσες επιλογές. Συνήθως οι ενώσεις αυτές χορηγούνται μέσα σε λιπιδικούς σχηματισμούς, αν και υπάρχουν και άλλα μόρια-φορείς φαρμακευτικών ενώσεων που είναι εξίσου αποτελεσματικά^[119].

Σε ότι αφορά στις ανοσορυθμιστικές φαρμακευτικές ουσίες (γλυκοκορτικοειδή, λεβαμιζόλη, LiF2), αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς σε συνδυασμό με λείσμανιοκτόνες-λείσμανιοστατικές ουσίες ενώ υπάρχουν και άλλες (IFN- γ , IL-2, IL-12) που πρόκειται να δοκιμαστούν στο άμεσο μέλλον. Η έλλειψη κατάλληλα σχεδιασμένων ερευνών δυσκολεύει την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των ουσιών αυτών^[114].

9.1 Πενταδύναμες ενώσεις αντιμονίου (Sb)

Ο μηχανισμός δράσης του αντιμονίου έναντι στη *Leishmania* δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, αλλά εικάζεται ότι παρεμβαίνει στο μεταβολισμό του παρασίτου, μπλοκάροντας κυρίως την παραγωγή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP)^[120]. Η πιο ενεργή ένωση αντιμονίου κατά της λείσμανίασης είναι, επί του παρόντος, το Sb^{III}, ενώ

χρησιμοποιείται και το $Sb^{V[121]}$. Σήμερα κυκλοφορούν στην αγορά 2 εμπορικά φάρμακα που βασίζονται σε ενώσεις αντιμονίου, η αντιμονιακή μεγλουμίνη ή MA ή Glucantime® και το στιβογλυκονικό νάτριο ή SSG ή Pentostam®.

Τα πρωτόκολλα χορήγησης των ενώσεων αντιμονίου, δηλαδή η δοσολογία και η διάρκεια της εκάστοτε θεραπείας ποικίλουν διότι η φαρμακοκινητική του αντιμονίου στους σκύλους δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Η πιο συνηθισμένη θεραπεία περιλαμβάνει 100 mgMA/kg/d και αντιστοιχεί σε 27,5 mg Sb^V /kg/d. Συνήθως η θεραπεία πραγματοποιείται σε κύκλους των 15 ημερών με ενδιάμεσες παύσεις των 7-10 ημερών^[122].

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος χορήγησης περιλαμβάνει ενδομυϊκή ένεση που ακολουθείται από ενδοφλέβια ένεση^{[123][124]}. Μελέτες της φαρμακοκινητικής των ενώσεων του αντιμονίου δείχνουν ότι η υποδόρια χορήγησή του παρουσιάζει καλή βιοδιασπορά και για αυτό το λόγο έχει αρχίσει να προτιμάται^[125].

Οι δυσμενείς επιπτώσεις της τοξικότητας των ενώσεων αντιμονίου είναι αναστρέψιμες και ως εκ τούτου η διακοπή θεραπείας λόγω παρενεργειών εφαρμόζεται μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις. Στις παρενέργειες περιλαμβάνονται μυοσκελετικά προβλήματα, όπως αρθραλγίες και μυαλγίες, γαστρεντερικά προβλήματα, όπως διάρροια, ναυτία, κοιλιακός πόνος και ανορεξία, ήπια παγκρεατίτιδα και αλλαγές στην ηπατική λειτουργία^[113]. Κατά τη θεραπεία με Sb^V μπορεί να εμφανιστούν στην περιοχή του εμβολιασμού αποστήματα, ινώσεις και αιμορραγίες λόγω της υψηλής ποσότητας χορήγησης^[126]. Κατά την ενδοφλέβια χορήγηση είναι πιθανόν να παρουσιαστεί φλεβίτιδα αν συμβεί εξαγγείωση του φαρμάκου^[124]. Τέλος, οι ηπατικές και νεφρικές δυσλειτουργίες που μπορεί να εμφανιστούν είναι δύσκολο να διαπιστωθεί εάν προκλήθηκαν από τη χορήγηση του αντιμονίου ή από τη νόσο καθεαυτή.

Συνοψίζοντας, κατά την έναρξη της θεραπείας μπορεί να παρατηρηθεί μια γενική επιδείνωση της κατάστασης του σκύλου που συνοδεύεται από σημαντική άνοδο των αντισωμάτων στον ορό, η οποία οφείλεται στη μαζική απελευθέρωση αντιγόνων που προκαλείται από τη θανάτωση των αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου^{[127][128]}. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθούν και αντιδράσεις

υπερευαισθησίας, όπως κοκκιώματα, δερματικοί όζοι, κερατίτιδες και ελκώδεις επιπεφυκίτιδες^[126].

Οι περισσότεροι σκύλοι που υποβάλλονται σε θεραπεία με Sb^V έχουν εμφανή κλινική βελτίωση, εκτός από όσους παρουσιάσουν ηπατικές επιπλοκές ή σπειραματονεφρίτιδα ή όσους έχουν μολυνθεί με στελέχη *Leishmania* ανθεκτικά στο αντιμόνιο. Ακόμη, ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των σκύλων που λαμβάνουν φάρμακα αντιμόνιου υποτροπιάζουν μετά από κάποιο χρονικό διάστημα που μπορεί να φτάσει και τα 5 έτη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρασιτολογική θεραπεία μπορεί να μην είναι 100% επιτυχής^{[129][124]}.

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που τελικά φτάνει στα όργανα-στόχους μετά από κάθε εμβολιασμό. Κατά κάποιους επιστήμονες η απόκριση στο αντιμόνιο είναι καλύτερη όταν χορηγούνται οι υψηλότερες δυνατές συγκεντρώσεις^{[130][131]}. Από την άλλη πλευρά ορισμένοι θεωρούν προτιμότερη τη χορήγηση χαμηλότερων συγκεντρώσεων, τέτοιων που να πλησιάζουν την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του φαρμάκου, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα^{[132][133][125]}. Είναι όμως γενικά αποδεκτό ότι για μια ευνοϊκή απόκριση στο Sb^V απαιτείται σχετικά μεγάλη συνολική δόση, περίπου 3000 mgMA/kg. Με αυτόν τον τρόπο οι πιθανές υποτροπές σίγουρα καθυστερούνται. Παρόλα αυτά, έχει προταθεί, οι σκύλοι που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία κατά της CanL να υποβάλλονται σε επαναληπτικές θεραπείες κάθε 6 μήνες.

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόκριση στο Sb είναι το κλινικό στάδιο που βρίσκεται ο σκύλος όταν αρχίζει η θεραπεία. Έχει δειχθεί ότι η χορήγηση του φαρμάκου είναι περισσότερο αποτελεσματική στην αρχική φάση της νόσου με 88.4% επιτυχία έναντι 14.3% σε θεραπείες που ξεκίνησαν κατά τα ύστερα στάδια της νόσου^[113]. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την απόκριση στη θεραπεία είναι η ένταση των κλινικών συμπτωμάτων με ασυμπτωματικούς σκύλους να εμφανίζουν αποτελεσματική θεραπεία σε ποσοστό 47.2%, oligοσυμπτωματικούς σε ποσοστό 33% και πολυσυμπτωματικούς σε ποσοστό μόνο 11%^[134].

Σχετικά με την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του φαρμάκου στα σημεία δράσης του, έχει μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της χορήγησης Sb^V συσσωματωμένου με λιποσώματα σε σχέση με τη χορήγηση ελεύθερου Sb^V . Συγκρίνοντας την αποτελεσματική δόση 50 ή ED50 (Effective Dose 50), δηλαδή τη δόση που χρειάζεται ώστε να θεραπευτεί το 50% των σκύλων της εξεταζόμενης ομάδας, μεταξύ ελεύθερου και λιποσωμικού Sb , αποδείχθηκε ότι το δεύτερο ήταν 700 φορές πιο αποτελεσματικό, με επιτυχή καταστολή της νόσου σε ποσοστό 97,4%^[135].

9.2 Αμφοτερικίνη Β

Το αντιβιοτικό αμφοτερικίνη Β αποτελεί φάρμακο δευτερεύουσας επιλογής για τη θεραπεία της CanL και είναι ένα από τα πιο ισχυρά χημικά κατά της *Leishmania*^[119]. Ο μηχανισμός δράσης του βασίζεται στην πρόσδεσή του στην εργοστερόλη της κυτταρικής μεμβράνης του πρωτοζώου^[136]. Αυτή η συνένωση οδηγεί σε δομική αποδιοργάνωση της μεμβράνης, δημιουργία υδατικών πόρων που οδηγούν σε απώλεια των ενδοκυτταρικών συστατικών και τελικά θάνατο που επέρχεται από οσμωτική λύση του κυττάρου.

Τα πρωτόκολλα χορήγησης δεσοξυχολικής αμφοτερικίνης Β στους σκύλους ποικίλουν αν και όχι τόσο όσο εκείνα του αντιμονίου^[122]. Η συνιστώμενη δόση κυμαίνεται μεταξύ 0.1-1 mg/kg/d διαλυμένο σε δεξτρόζη 5%, χορηγούμενο σε αυξανόμενες δόσεις με αργή ενδοφλεβική έγχυση. Η χορήγηση μπορεί να είναι καθημερινή σε μικρές δόσεις ή σε μεγαλύτερες δόσεις κάθε δύο μέρες^[113]. Μπορεί επίσης να χορηγηθεί υποδορίως σε συγκεντρώσεις 0.5-0.8 mg/kg/d^[137].

Η αμφοτερικίνη Β, εκτός από τη σύνδεση με την εργοστερόλη της κυτταρικής μεμβράνης του παρασίτου, παρουσιάζει συγγένεια και με τις λιποπρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων των θηλαστικών, όπως είναι η χοληστερόλη, με τις οποίες συνδέεται, γεγονός που οδηγεί στην ενδοκύττωσή της. Αυτός είναι ο μηχανισμός που εξηγεί την ένταση των τοξικών παρενεργειών που προκαλούνται από την αμφοτερικίνη Β. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν πυρετό, τρόμο, ναυτία, εμετό, ανορεξία, μυαλγία, αρθραλγία και

προοδευτική απώλεια βάρους κατά τη διάρκεια της θεραπείας και διακρίνονται σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν εκείνες που σχετίζονται με την ταχύτητα έγχυσης του αντιβιοτικού, η οποία προκαλεί την απελευθέρωση προσταγλαδινών και TNF και στη δεύτερη ομάδα ανήκουν όσες σχετίζονται με τη δόση και τη διάρκεια χορήγησης^[138].

Η σημαντικότερη παρενέργεια της αμφοτερικίνης Β είναι η νεφροτοξικότητα. Πιο συγκεκριμένα, προκαλείται ελάττωση της σπειραματικής διήθησης και συνεπώς αύξηση της κρεατινίνης και του αζώτου ουρίας του ορού. Επίσης, μειώνεται ο ρυθμός καθαρισμού της κρεατινίνης και της ινουλίνης. Τέλος, παρατηρείται μείωση της οσμωτικότητας των ούρων, γεγονός που σχετίζεται με μειωμένη ροή του αίματος στους νεφρούς λόγω αγγειοσυστολής των προσαγωγών και απαγωγών αρτηριδίων^[139]. Η νεφροτοξικότητα σχετίζεται με τη δόση και τον τρόπο χορήγησης του φαρμάκου. Η θανατηφόρος δόση 50 ή LD50 (Lethal Dose 50) ή αλλιώς η δόση που αρκεί για τη θανάτωση του 50% των σκύλων που εξετάζονται είναι 3.5-5 mg/kg και ο θάνατος επέρχεται 48 ώρες μετά τη χορήγηση^[113]. Συνιστάται η καθημερινή εξέταση του σκύλου σε ότι αφορά στα επίπεδα κρεατινίνης του ορού και άλλων δεικτών της νεφρικής λειτουργίας. Αν η κρεατινίνη αυξηθεί πάνω από 2.5 mg/dL η θεραπεία πρέπει να διακοπεί έως ότου τα επίπεδά της να επανέλθουν στο φυσιολογικό^[140].

Σε ότι αφορά στην ηπατική λειτουργία, έχουν παρατηρηθεί ανωμαλίες, αλλά όχι τόσο έντονες. Συνήθως υπάρχει μια ελαφρά αύξηση της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης και της αλκαλικής φωσφατάσης^[141].

Τα αποτελέσματα που έχει επιδείξει η θεραπεία με αμφοτερικίνη Β είναι καλά με ποσοστό επιτυχίας 85%. Η επιτυχία της θεραπείας αποδεικνύεται από κανονικοποίηση του πρωτεϊνογράμματος, μείωση του τίτλου αντισωμάτων στον ορό και απουσία αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου σε αναρροφήματα μυελού των οστών.

Η ανάπτυξη λιπιδικών φορέων για τη μείωση της τοξικότητας της αμφοτερικίνης προσφέρει μεγαλύτερη ασφάλεια κατά τη θεραπεία με υψηλές δόσεις αλλά το κόστος αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για μαζική κτηνιατρική χρήση^[142]. Η

χορήγηση αμφοτερικίνης Β με λιπιδικούς φορείς δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και το μόνο αναγνωρισμένο λιποσωμικό φάρμακο αμφοτερικίνης αποτελεί το AmBisome[®], το οποίο όμως έχει μέτρια αποτελέσματα^[143].

Από την άλλη, η συσσωμάτωση αμφοτερικίνης Β με ένα λιπιδικό γαλάκτωμα (Intralipid[®]), ευνοεί τη διανομή του φαρμάκου στους ιστούς και μειώνει την τοξικότητά του, ειδικότερα αν χορηγείται κάθε 48 ώρες. Μετά τη θεραπεία παρατηρείται σημαντική μείωση στον τίτλο των ειδικών αντισωμάτων, ενώ μειώνεται και το παρασιτικό φορτίο στο 82% των εξεταζόμενων σκύλων. Στο 55,5% αυτών, ήταν αδύνατο να απομονωθεί το παράσιτο από τους ιστούς τους ακόμη και ένα χρόνο μετά τη θεραπεία. Όλοι οι σκύλοι παρουσίασαν γρήγορη βελτίωση αλλά η ανταπόκρισή τους στη θεραπεία εξαρτήθηκε από την αρχική κατάσταση στην οποία βρισκόταν πριν ξεκινήσουν τη θεραπεία^[144].

9.3 Μιλτεφοσίνη

Το δραστικό συστατικό μιλτεφοσίνη είναι ένα ανάλογο φωσφολιπιδίου που αποτελείται από εστέρες με ποικίλες, μακράς αλύσου, κορεσμένες και ακόρεστες αλκυλικές ομάδες^[145]. Έχει αποδειχθεί ότι έχει παρόμοια δομή με συστατικά που μεταβολίζονται από το παράσιτο και δρα εναντίον του αναστέλλοντας τη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης και προκαλώντας διαταραχή των οδών μετάδοσης των σημάτων του κυτάρου^[146]. Το Milteforan[®] αποτελεί το πρώτο κτηνιατρικό ιδιοσκεύασμα σε μορφή πόσιμου διαλύματος. Η βολική αυτή φαρμακοτεχνική μορφή διευκολύνει τη χορήγηση από τον ιδιοκτήτη του νοσούντος σκύλου, μαζί με την τροφή.

Η χορήγηση μιλτεφοσίνης γίνεται από το στόμα στη δόση των 2 mg/kg/d μαζί με τροφή για 28 μέρες^[147]. Πλεονεκτήματα αυτού του φαρμάκου αποτελούν η ταχεία απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα καθώς και το μεγάλο χρονικό διάστημα παραμονής του σε ενεργή και αμετάβλητη μορφή στους ιστούς του ζώου, λόγω της μακράς ημιπεριόδου αποβολής^{[148][149][129]}. Σε ότι αφορά την τοξικότητα, αυτή είναι πολύ μικρή καθώς λαμβάνει χώρα χαμηλός ρυθμός ηπατικής μεταβολικής αποδόμησης σε χολίνη, ένα φυσικό, αβλαβές συστατικό^[149]

^[150]. Επίσης, η μιλτεφοσίνη δεν αποβάλλεται από τους νεφρούς, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για θεραπεία σε σκύλους με νεφρική δυσλειτουργία, χωρίς να απαιτείται τροποποίηση της δοσολογίας^{[149][150]}. Η μιλτεφοσίνη είναι δυνατόν να επιφέρει παρασιτολογική ίαση σε ποσοστό 90% ^[151].

9.4 Παρομομυκίνη

Η παρομομυκίνη (αμινοσιδίνη) χορηγείται ενδοφλέβια, ενδομυϊκά ή μερικές φορές μόνο τοπικά, σε συγκεντρώσεις 15 mg/kg/d^[152]. Ο μηχανισμός δράσης της έναντι στη *Leishmania* δεν είναι γνωστός αλλά εικάζεται ότι επιδρά στη φυσιολογική λειτουργία των ριβοσωμάτων, εμποδίζοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών^[153]. Ο συνδυασμός παρομομυκίνης με άλλα φάρμακα είναι πιο αποτελεσματικός και μειώνει τη διάρκεια της θεραπείας^[119]. Οι σκύλοι που υποβάλλονται σε θεραπεία με Glucantime® και παρομομυκίνη παρουσιάζουν σημαντική βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων και μείωση του τίτλου των ειδικών αντισωμάτων στο ορό^[154].

9.5 Πενταμιδίνη

Η πενταμιδίνη αποτελεί έναν αντιπρωτοζωϊκό παράγοντα, ο οποίος επηρεάζει τα μιτοχόνδρια^[155], προκαλώντας διάσπαση του DNA των κινητοπλαστών και μείωση του αριθμού των ριβοσωμάτων^[156]. Η συνιστώμενη δόση για τη θεραπεία της CanL είναι 4 mg/kg/d ενδομυϊκά, 3 φορές την εβδομάδα για 5-7 εβδομάδες^[156]. Οι ανεπιθύμητες ενεργειες περιλαμβάνουν ερεθισμούς, όπως τοπικό πόνο και αποστήματα στο σημείο της έγχυσης.

9.6 Αλλοπουρινόλη

Πρόκειται για έναν αναστολέα της ξανθινοξειδάσης, του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Αυτή η πουρίνη δρα ως λανθασμένο νουκλεοτίδιο που συσσωματώνεται με το παραστικό RNA, τροποποιώντας τη δομή του και αναστέλλοντας τη σύνθεση των παρασιτικών πρωτεϊνών^[157]. Η συνιστώμενη δόση είναι 20 mg/kg/d στοματικώς, διαιρεμένη σε

2 ή 3 δόσεις ημερησίως^[158]. Η θεραπεία διαρκεί 1-6 μήνες. Η χορήγησή της μαζί με άλλα φάρμακα μπορεί να παρουσιάζει συνεργατικά αποτελέσματα, αυξάνοντας το ρυθμό ανάρρωσης του σκύλου. Η χρήση αλλοπουρινόλης δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην πρωτογενή θεραπεία αλλά είναι αρκετά σημαντική για την καθυστέρηση των υποτροπών και τη μείωση της συχνότητάς τους^[113].

9.7 Κετοκοναζόλη

Πρόκειται για μια ιμιδαζόλη που αναστέλλει τη σύνθεση της εργοστερόλης, ενός απαραίτητου δομικού συστατικού της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων και της *Leishmania*^[159]. Επίσης, ενεργοποιεί διάφορες φωσφορυλάσες που εντείνουν τη γλυκογονόλυση, ελαττώνοντας τα αποθέματα γλυκογόνου. Τέλος, αναστέλλει τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων^[160]. Η στοματική χορήγηση 25 mg/kg/d είναι αρκετά αποτελεσματική για συμπτωματική θεραπεία, όχι όμως για εκρίζωση του παρασίτου.

9.8 Δομπεριδόνη

Η δομπεριδόνη έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στους ανθρώπους και στα σκυλιά, ως γαστροκινητικός και αντιεμετικός παράγοντας με τις δύο δραστηριότητές της να οφείλονται στον αποκλεισμό των υποδοχέων D2 ντοπαμίνης στο κέντρο του εμετού (προμήκη μυελό) και στο ανώτερο πεπτικό σύστημα.

Λιγότερο γνωστή είναι η ενδοκρινική δράση της υπερπρολακτιναιμίας που προέρχεται από τον αποκλεισμό των D2 υποδοχέων ντοπαμίνης στο επίπεδο της υπόφυσης. Αυτή η δράση της δομπεριδόνης προκαλεί την οξεία απελευθέρωση της προλακτίνης από την υπόφυση, πράγμα που οδηγεί σε παροδική κορύφωσή της στο αίμα για λίγες ώρες. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η προλακτίνη, εκτός από τη συμμετοχή στην ορμονική ρύθμιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας, παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, και ενεργεί όπως οι κυτταροκίνες.

Έχει περιγραφεί ότι τα επίπεδα προλακτίνης έχουν μεγάλη επίδραση στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πολλών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που εμπλέκονται τόσο στην κυτταρική όσο και στη χυμική ανοσία. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι, μέσω της διαφοροποίησης των άλλων κυτταροκινών, η προλακτίνη διεγείρει την κυτταρικού τύπου ανοσοαπάντηση προκαλώντας τα NK κύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα να παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα της κυτταροκίνης IFN- γ και η οποία, με τη σειρά της, τονώνει τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και την παρασιτοκτόνο δράση των NK κυττάρων, των ουδετερόφιλων και των μονοκύτταρων-μακροφάγων, ενάντια στη *Leishmania*.

Επίσης περιγράφεται, ότι η προλακτίνη προάγει τη σωστή παρουσίαση του αντιγόνου από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα στα λεμφοκύτταρα, ένα ουσιαστικό βήμα για τη δημιουργία μιας επαρκούς επίκτητης ανοσολογικής απάντησης, κυτταρικής κυρίως, με προστατευτική δράση κατά της λείσμανιάσης. Η ελάχιστη συνιστώμενη δόση είναι 0.5 mg/kg/d για 4 διαδοχικές εβδομάδες, είτε αναμεμιγμένο με την τροφή είτε απευθείας στο στόμα^[246].

9.9 Άλλα φάρμακα

Άλλα φάρμακα που χορηγούνται στοματικώς και έχουν χρησιμοποιηθεί σποραδικά για τη θεραπεία της CanL αποτελούν η ιπρακοναζόλη^[119], η μετρονιδαζόλη^[113] και η φλουκοναζόλη^[119].

9.10 Συστήματα διανομής

Μία από τις μεγαλύτερες προόδους που έχουν σημειωθεί στη θεραπεία της CanL τα τελευταία 30 χρόνια είναι η ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς ή αλλιώς φορέων του φαρμάκου, οι οποίοι επιτρέπουν τον έλεγχο της διαθεσιμότητάς του στο χώρο και στο χρόνο, τροποποιώντας τη διανομή του στους ιστούς και ευνοώντας τη μεταφορά του στα όργανα-στόχους, ελαττώνοντας έτσι σημαντικά την τοξικότητα, καθώς η χημική ένωση δεν είναι άμεσα εκτεθειμένη. Έτσι επιτυγχάνεται, επίσης, παρατεταμένη αποδέσμευσή του και άρα μεγαλύτερη

διάρκεια παραμονής του στο σώμα. Η φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική του φαρμάκου διαφέρει σημαντικά μεταξύ της ελεύθερης και της δεσμευμένης σε φορείς μορφής του καθώς διαφέρει η διανομή του, η συγκέντρωσή του στο πλάσμα του αίματος, η αλληλεπίδρασή του με πρωτεΐνες του πλάσματος, ο μεταβολισμός και η αποβολή του από το σώμα^[160].

Το μεγαλύτερο ίσως πλεονέκτημα της χρήσης συστημάτων διανομής είναι το γεγονός ότι απαιτούνται χαμηλότερες δόσεις για τη μείωση του παρασιτικού φορτίου^[161]. Ακόμη, η τοξικότητα μειώνεται σημαντικά ως αποτέλεσμα της χαμηλότερης απαιτούμενης δόσης και της ταχύτερης πρόσληψης των συστημάτων μεταφοράς από τα κύτταρα του ενδοθηλιακού συστήματος^[162]. Τέλος, οι σκύλοι όλο και συχνότερα εμφανίζουν ανοσία στην ελεύθερη μορφή του φαρμάκου, γεγονός που καθιστά αναγκαία την αύξηση της δόσης με συνακόλουθη αύξηση της τοξικότητας, γεγονός που μπορεί σε μεγάλο βαθμό να αποφευχθεί με τη χρήση συστημάτων μεταφοράς^[163].

Τα συστήματα μεταφοράς αμφοτερικίνης Β που κυκλοφορούν στην αγορά για τη θεραπεία της λείσμανίασης είναι τρία. Το ABLC (Abelcet[®]), είναι το απλούστερο και αποτελείται από βρόχους λιπιδικών συσσωματωμάτων αμφοτερικίνης Β, διαμέτρου 1600 και 6000 nm. Το μεγάλο τους μέγεθος ευνοεί τη φαγοκύττωσή τους από τα μακροφάγα. Το Amphocil[®] αποτελείται από αμφοτερικίνη Β παγιδευμένη μέσα σε δίσκους μορίων θειϊκού άλατος χοληστερόλης, μεγέθους 150 x 5 nm. Τέλος, το AmBisome[®] αποτελείται από φωσφολιπίδια τα οποία σχηματίζουν κυστίδια διαμέτρου 60-70 nm και επικαλύπτονται από δύο στρώσεις μεμβρανών, μεταξύ των οποίων εμπεριέχεται η δραστική ουσία. Το γαλάκτωμα που προκύπτει όταν αναμιγνύεται δεσοξυχολική αμφοτερικίνη Β (Fungizone[®]), με Intralipid[®] έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη θεραπεία της CanL, αλλά αυτό το πρωτόκολλο δεν έχει επισημοποιηθεί. Παρόλα αυτά είναι πολύ οικονομικότερο σε σχέση με τα υπόλοιπα λιπιδικά συστήματα μεταφοράς. Η γαλακτοματοποίηση με Intralipid[®] μειώνει σημαντικά τις ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με την έγχυση του φαρμάκου^[133].

Μέχρι σήμερα, τα λιπιδικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων δεν έχουν χρησιμοποιηθεί μαζικά για τη θεραπεία της CanL, εξαιτίας του υψηλού τους κόστους αλλά λόγω της αποτελεσματικότητάς τους θεωρείται αναγκαία η έρευνα με κατεύθυνση την επίτευξη κατασκευής χαμηλότερου κόστους αλλά εξίσου επιτυχημένων φορέων .

9.11 Ανοσοθεραπεία

Η προσέγγιση της ανοσοθεραπείας δεν έχει μελετηθεί πολύ. Έχουν παρατηρηθεί θεραπευτικά αποτελέσματα με απουσία υποτροπών ακόμη και μετά από 6 μήνες από τη χορήγηση Glucantime® και LiF2, ενός αντιγονικού κλάσματος *L. infantum* σε σκύλους με CanL^[64].

Λόγω των δραματικών αλλαγών στο ανοσοποιητικό σύστημα σκύλων που πάσχουν, έχει προταθεί η χρήση ανοσοτροποποιητών σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για τη θεραπεία της CanL. Τέτοιοι παράγοντες δρουν επηρεάζοντας και την κυτταρική αλλά και τη χυμική ανοσία. Για παράδειγμα, η πρεδνιζόνη και η πρεδνιζολόνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την ελάττωση του σχηματισμού συσσωματωμάτων αντιγόνου-αντισώματος. Τέτοιες θεραπείες συνιστώνται μόνο σε περιπτώσεις όπου παρατηρείται σχηματισμός ανοσοσυμπλεγμάτων^[113].

Ο κύριος σκοπός της χρήσης ανοσοτροποποιητών είναι η ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας και κατ' επέκταση των μακροφάγων. Ένας τέτοιος τροποποιητής που έχει χρησιμοποιηθεί περιστασιακά, σε συνδυασμό πάντα με κάποια από τις συμβατικές θεραπείες που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι η λεβαμιζόλη.

9.12 Η θεραπεία στην πράξη

Με βάση τα διεθνή δεδομένα^{[165][168][169][170][171]} και τα αποτελέσματα των ερευνών που έγιναν και γίνονται στην κλινική παθολογία των ζώων συντροφιάς μια αποτελεσματική θεραπεία συνίσταται στην ταυτόχρονη χορήγηση αντιμονιούχου μεγλουμίνης (75 mg/kg/12h υποδόρια) για ένα μήνα και αλλοπουρινόλης (10-15 mg/kg/12h στοματικώς) για 6 μήνες. Οι δόσεις των φαρμάκων αυτών θα πρέπει

να μειώνονται στο μισό περίπου σε ζώα με νεφρική ανεπάρκεια (αζωθαιμία, ουραιμία), στα οποία επιπλέον θα πρέπει να χορηγείται κατάλληλη υποστηρικτική αγωγή (χορήγηση ορών, ειδική διατροφή κτλ). Σε περιστατικά με έντονου βαθμού επίσταξη επιβάλλεται άμεση συμπτωματική θεραπεία με ενδοφλέβια χορήγηση δεξαμεθαζόνης, ψυχρά επιθέματα στο επιρρίνιο, υποδόρια χορήγηση αδρεναλίνης, επιπωματισμό των ρινικών κοιλοτήτων και συρραφή των μυκτήρων, καθώς και μετάγγιση αίματος. Δεδομένου ότι το κύριο αίτιο της επίσταξης είναι η αγγειίτιδα, μαζί με τα αντιλεισμανιακά φάρμακα χορηγείται πρεδνιζολόνη (1 mg/kg/d στοματικώς) για 5-10 μέρες και πεντοξιφυλλίνη (15 mg/kg/8h στοματικώς) για 3 μήνες. Με το σχήμα αυτό η πιθανότητα υποτροπής της επίσταξης είναι πολύ μικρή^[176].

Όταν στο τέλος του κύκλου θεραπείας με αντιμονιούχο μεγλουμίνη δε διαπιστωθεί κλινική βελτίωση ενδέχεται το συγκεκριμένο είδος *Leishmania* να είναι ανθεκτικό στα αντιμονιούχα. Έτσι θα πρέπει να ξεκινήσει νέος κύκλος θεραπείας με αμφοτερικίνη Β και αλλοπουρινόλη, με την προϋπόθεση ότι το ζώο δεν πάσχει από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Επισημαίνεται ότι οι περιπτώσεις αυτές δεν είναι, προς το παρόν τουλάχιστον, συχνές στη χώρα μας, πιθανότατα λόγω της σχετικά περιορισμένης χρήσης της αντιμονιούχου μεγλουμίνης στο παρελθόν. Εφόσον μετά το τέλος του πρώτου κύκλου θεραπείας με αντιμονιούχο μεγλουμίνη υπάρξει κλινική βελτίωση αλλά όχι κλινική ίαση, θα πρέπει ύστερα από διακοπή 10 περίπου ημερών, να αρχίσει 2ος κύκλος θεραπείας^[176].

Πριν από την έναρξη και καθόλη τη διάρκεια της θεραπείας επιβάλλεται η κλινική και εργαστηριακή εξέταση (αιματολογική, βιοχημική, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού, ανάλυση και ενδεχομένως καλλιέργεια ούρων, λόγος πρωτεϊνών/κρεατινίνης στα ούρα), αρχικά μία φορά το μήνα και στη συνέχεια 3-4 φορές το χρόνο^[165]. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται τόσο η αποτελεσματικότητα της θεραπείας όσο και η πιθανή εμφάνιση παρενεργειών.

Ύστερα από τη συμπλήρωση 6 μηνών συνεχούς θεραπείας με αλλοπουρινόλη θα πρέπει να γίνεται έλεγχος για το ενδεχόμενο παρασιτολογικής ίασης. Οι ορολογικές εξετάσεις θεωρούνται ακατάλληλες για το σκοπό αυτό, αφού σε

αρκετά περιστατικά ο τίτλος παραμένει θετικός, για αρκετό χρονικό διάστημα, μετά την πλήρη εξαφάνιση του πρωτοζώου. Σε άλλες περιπτώσεις, η νόσος υποτροπιάζει, σε σκύλους με αρνητικό τίτλο, λίγο μετά τη διακοπή της θεραπείας^{[165][173][174][175]}. Η παρασιτολογική εξέταση των λεμφογαγγλίων ή/και του μυελού των οστών έχει αξία μόνο σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, επειδή μετά τη θεραπεία ο αριθμός των πρωτοζώων είναι πολύ μικρός για να εντοπιστούν^[166]. Μετά από εξέταση 1000 οπτικών πεδίων σε επιχρίσματα οπού λεμφογαγγλίων και μυελού των οστών βρέθηκαν αμαστιγωτές μορφές *L. infatnum* στους περισσότερους όχι όμως σε όλους τους σκύλους που εξακολουθούσαν να είναι μολυσμένοι μετά το τέλος της θεραπείας με αλλοπουρινόλη. Δυστυχώς η εξέταση ενός τόσο μεγάλου αριθμού οπτικών πεδίων είναι τεχνικά δύσκολη και χρονοβόρα και επιπλέον ενδέχεται να πρραπλανήσει τον κτηνίατρο όταν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό. Η καλλιέργεια μυελού των οστών ή οπού λεμφογαγγλίων σε ειδικά υποστρώματα δε φαίνεται να είναι αξιόπιστη μέθοδος για τον έλεγχο των σκύλων στους οποίους γίνεται θεραπεία^[166]. Αντίθετα η δοκιμή PCR στο μυελό των οστών είναι πάρα πολύ ευαίσθητη και ειδική και μπορεί να διαφοροποιήσει με ασφάλεια τα ζώα που εξακολουθούν να είναι μολυσμένα από εκείνα που απαλλάχθηκαν από το πρωτόζωο^[171]. Κατά την επανεξέταση μετά το τέλος της θεραπείας συνίσταται, αρχικά, παρασιτολογική εξέταση στα λεμφογάγγλια και εφόσον είναι αρνητική, λήψη δείγματος μυελού των οστών, το οποίο θα εξετάζεται πρώτα παρασιτολογικά και στη συνέχεια, εφόσον δε βρεθούν τα πρωτόζωα, να πραγματοποιείται ανάλυση PCR^[176].

Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα των παρπάνω εξετάσεων είναι αρνητικό συνίσταται χορήγηση αλλοπουρινόλης για 6 επιπλέον μήνες. Αν μετά το διάστημα αυτό οι παρασιτολογικές εξετάσεις και η PCR εξακολουθούν να είναι αρνητικές, η θεραπεία θα πρέπει να διακοπεί^[165]. Σε αντίθετη περίπτωση οι κύκλοι θεραπείας με αλλοπουρινόλη (για 6 μήνες) και αντιμονιούχο μεγλουμίνη (για 1 μήνα), θα πρέπει να συνεχιστούν. Όμως είναι γεγονός ότι αρκετοί σκύλοι εξακολουθούν να παραμένουν μολυσμένοι, αν και είναι κλινικά υγιείς, ακόμα και ύστερα από χρόνια

συνεχούς θεραπείας. Η μόνη λύση στην περίπτωση αυτή είναι η εφόρου ζωής θεραπεία συντήρησης με αλλοπουρινόλη (20 mg/kg/d για μία εβδομάδα κάθε μήνα)^[168]. Σε περίπτωση άρνησης του ιδιοκτήτη του ζώου, η θεραπεία διακόπτεται και το μόνο που μπορεί να γίνει είναι ο κλινικός και εργαστηριακός έλεγχος σε τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να διαγιγνώσκονται έγκαιρα και να αντιμετωπίζονται ανάλογα, τυχόν μελλοντικές υποτροπές. Ιδιαίτερα, συνίσταται τακτικός ορολογικός έλεγχος, αφού ο τίτλος αντισωμάτων συνήθως αυξάνει πριν από την εμφάνιση των συμπτωμάτων^{[167][172]}. Την ίδια προγνωστική σημασία φαίνεται να έχει και η αύξηση της συγκέντρωσης των σφαιρινών στον ορό του αίματος ^[176].

10. ΕΛΕΓΧΟΣ-ΠΡΟΛΗΨΗ

Ο έλεγχος της CanL στοχεύει στη μείωση του αριθμού των κρουσμάτων της σπλαχνικής λεισμανίασης του ανθρώπου, μέσω της ελάττωσης της επικράτησης της νόσου στο σκύλο. Οι στρατηγικές που ακολουθούνται σε γενικές γραμμές είναι η θεραπεία των ανθρώπινων κρουσμάτων, η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των μολυσμένων σκύλων, οι ανοσολογικοί έλεγχοι και η θανάτωση όλων των οροθετικών σκύλων και τέλος ο ψεκασμός με εντομοκτόνα κατά των φλεβοτόμων^{[177][178][179][180][181][182][183][184]}.

10.1 Θεραπεία ή ευθανασία;

Η λύση της ευθανασίας συνίσταται από τον ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)^[187], από ορισμένους ερευνητές^[188] και από την ελληνική νομοθεσία, για όλους τους μολυσμένους σκύλους που διαβιούν όπου η νόσος ενδημεί, με το επιχείρημα ότι τα υπό θεραπεία ζώα αποτελούν πηγή μόλυνσης των υπόλοιπων σκύλων αλλά και του ανθρώπου. Προκειμένου όμως η θανάτωση των μολυσμένων σκύλων να μειώσει πράγματι τη συχνότητα της νόσου θα πρέπει να συντρέχουν οι παρακάτω προϋποθέσεις: 1) ο σκύλος να αποτελεί τη μοναδική ή έστω την κύρια δεξαμενή του *L. infantum* 2) ο έλεγχος για τη διαπίστωση των μολυσμένων ζώων να περιλαμβάνει το σύνολο των σκύλων που ζουν σε μια

περιοχή και να στηρίζεται σε εργαστηριακές μεθόδους με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα και 3) το ποσοστό των μολυσμένων σκύλων να είναι τόσο μικρό ώστε η θανάτωσή τους να είναι ηθικά και κοινωνικά αποδεκτή. Μέχρι σήμερα όμως δε φαίνεται ότι ισχύει κανένα από τα παραπάνω, τουλάχιστον στην Ελλάδα. Είναι γνωστό ότι εκτός από το σκύλο, τα άγρια σαρκοφάγα, τα πρόβατα και ορισμένα είδη τρωκτικών και πτηνών, όπως είναι για παράδειγμα οι κότες, μπορούν να μολυνθούν από *L. infantum*, χωρίς όμως να είναι γνωστές οι συνέπειες στην επιδημιολογία της νόσου στο σκύλο και στον άνθρωπο^{[186][189]}. Στην Ελλάδα ο έλεγχος του συνόλου ή έστω των περισσότερων σκύλων είναι αδύνατος, λόγω του τεράστιου αριθμού των αδέσποτων. Εξάλλου οι διάφορες ορολογικές μέθοδοι που συνήθως χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των μολυσμένων σκύλων δεν μπορούν, σε καμία περίπτωση, να θεωρηθούν ευαίσθητες, αφού το αποτέλεσμα είναι συνήθως ψευδώς αρνητικό στα περισσότερα ασυμπτωματικά ζώα. Η μόνη εξέταση που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εντοπίσει το σύνολο σχεδόν των μολυσμένων ζώων είναι η PCR, η οποία πρέπει απαραίτητα να γίνεται σε δείγμα από το μυελό των οστών^[190]. Όμως, η λήψη ενός τέτοιου δείγματος είναι τεχνικά δύσκολη και η τεχνική PCR, πέρα από το υψηλό κόστος και το χρονοβόρο της διαδικασίας, είναι αξιόπιστη μόνο όταν γίνεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια και από έμπειρο προσωπικό. Από τα παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η εφαρμογή της μεθόδου αυτής, στα πλαίσια ενός προγράμματος εκρίζωσης της λεισμανίασης, είναι αρκετά δύσκολη. Επιπλέον, σε ορισμένες τουλάχιστον περιοχές της χώρας, το ποσοστό των μολυσμένων σκύλων είναι τόσο υψηλό ώστε μια τέτοια μαζική θανάτωση είναι πρακτικά αδύνατη και παράλληλα έρχεται σε σύγκρουση με τα φιλοζωικά αισθήματα του κοινού. Εξάλλου, το θετικό αποτέλεσμα ενός τέτοιου μέτρου πάνω στη συχνότητα της λεισμανίασης του ανθρώπου αμφισβητείται, επειδή τα είδη του φλεβοτόμου που μεταδίδουν το πρωτόζωο ενδέχεται να παρουσιάζουν ειδικότητα ως προς τον ξενιστή^[191]. Έτσι, γίνεται εύκολα αντιληπτό το γιατί οι προσπάθειες περιορισμού της λεισμανίασης του σκύλου και του ανθρώπου, με τη μαζική θανάτωση των ορολογικά θετικών

σκύλων έχουν αποτύχει όχι μόνο στην Κεντρική και Νότια Αμερική αλλά και στην Ελλάδα^{[192][192]}.

Εκτός από την προοπτική μείωσης της συχνότητας της νόσου, ένας επιπλέον λόγος για τον οποίο οι κτηνίατροι συνιστούν τη λύση της ευθανασίας είναι ο φόβος ότι η παρουσία των μολυσμένων ζώων αυξάνει τον κίνδυνο μετάδοσης της νόσου στους υπόλοιπους σκύλους και στους ανθρώπους που ζουν στον ίδιο χώρο. Το επιχείρημα όμως αυτό καταρρέει εύκολα αν ληφθούν υπόψη τα επιδημιολογικά δεδομένα και το γεγονός ότι οι περισσότεροι φλεβοτόμοι που μεταδίδουν *L. infantum* μπορούν να διανύσουν απόσταση μέχρι και 2 km^[194].

Η χορήγηση των κατάλληλων αντιπρωτοζωικών φαρμάκων σε σκύλους με λείσμανίαση φαίνεται να μειώνει το ποσοστό μόλυνσης των φλεβοτόμων^[195]. Όταν μάλιστα κατά τη διάρκεια της θεραπείας τα ζώα περιοριστούν σε κλουβιά με λεπτό δικτυωτό τις βραδινές ώρες και ταυτόχρονα χρησιμοποιηθούν διάφορα εντομοαπωθητικά κατά τη θερμή περίοδο του χρόνου, περιορίζεται πολύ η πιθανότητα αυτή^{[196][197]}.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, οι κτηνίατροι οφείλουν να ενημερώνουν αναλυτικά τον ιδιοκτήτη του ζώου αναφορικά με τη διάρκεια, τις πιθανότητες επιτυχίας, τους κινδύνους και το κόστος που συνεπάγεται η θεραπεία, ώστε να αποφασιστεί από κοινού η τύχη του ζώου. Επισημαίνεται ότι, σε κάθε περίπτωση και με βάση την ισχύουσα νομοθεσία είναι υποχρεωτική η δήλωση κάθε περιστατικού στις αρμόδιες κτηνιατρικές υπηρεσίες^[185].

10.2 Έλεγχος φορέα

Ο έλεγχος της νόσου μέσω ελέγχου του πληθυσμού των φλεβοτόμων αποτελεί ένα περίπλοκο έργο, λόγω της μεγάλης βιοποικιλότητας των ειδών-φορέων που εμπλέκονται στη μετάδοση. Σε χώρες με εν ενεργεία εκστρατείες για τον έλεγχο της ελονοσίας που εστιάζουν στον ψεκάσμο των σπιτιών με εντομοκτόνα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην επίπτωση της λείσμανίασης, ειδικά στις περιοχές όπου η μετάδοση της νόσου οφειλόταν σε ενδόφιλα και οικοδίατα είδη^{[198][199][186][200]}. Παρόλο που αυτά τα έντομα είναι, προς το παρόν, αρκετά

ευαίσθητα στα χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα^{[201][202]}, δε θα πρέπει να παραβλεφθεί η πιθανή ανάπτυξη μελλοντικής ανθεκτικότητας, ειδικότερα αν τα συγκεκριμένα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται σε μαζική κλίμακα. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια ενός προγράμματος για τον έλεγχο της λείσμανιάσης με DDT στην Ινδία, παρατηρήθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο από το είδος *P. papatasi*^[203]. Επίσης, σε πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, επίσης, στην Ινδία, τα είδη *P. argentipes* και *P. papatasi* ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα περμεθρίνη και δελταμεθρίνη και περμεθρίνη και λάμδα-συσλοθρίνη αντίστοιχα^[204].

Τα μέτρα ελέγχου κατά του εντόμου εφαρμόζονται μόνο σε ενήλικα άτομα^[205]. Η εφαρμογή εντομοκτόνων σε σημεία όπου πιθανόν αναπτύσσονται οι προνύμφες και οι νύμφες του πρωτοζώου (αυλάκια, σπηλιές, τρύπες κ.τ.λ.), ενέχει σημαντικές τεχνικές δυσκολίες που αποκλείουν τη χρήση εντομοκτόνων σε μορφή σπρέι. Τα τελευταία συνιστώνται μόνο για κατοικημένες και γύρω περιοχές^[206]. Ο ψεκασμός πρέπει να γίνεται κυρίως στους εσωτερικούς τοίχους των σπιτιών, τις πόρτες, τα παράθυρα, τα ξύλινα υπόστεγα, τα σπιτάκια των σκύλων, τα κοτέτσια, τις τρύπες σε τοίχους, τους σωλήνες και αλλού. Ο ψεκασμός των σπιτιών για τον έλεγχο των ενδόφιλων ειδών φλεβοτόμων είχε καλά αποτελέσματα στην Ελλάδα, την Ινδία, το Ισραήλ, την Ιταλία και τη Ρωσία^{[207][199][208]} ^[201]. Παρόλα αυτά, τα μέτρα αυτά είναι μη ικανοποιητικά όταν πρόκειται για την εξουδετέρωση ημι-ενδόφιλων ειδών^[208].

10.3 Αποτροπή νυγμάτων

Ένα άλλο, εξαιρετικά αποτελεσματικό μέτρο για τον έλεγχο της λείσμανιάσης αποτελεί η άμεση εφαρμογή εντομοκτόνων με τη μορφή λοσιόν ή ειδικών κολάρων πάνω στους σκύλους. Αυτή η πρακτική στοχεύει στη μείωση των νυγμάτων από τους φλεβοτόμους και στην παροχή ολοκληρωμένης, ατομικής προστασίας για κάθε σκύλο^{[213][201][202]}. Υπάρχουν 2 μορφές φαρμάκων που χρησιμοποιούνται κατά αυτήν την πρακτική. Η μία είναι εντομοαπωθητική που αποτρέπει το νύγμα και η άλλη εντομοκτόνος που επιφέρει το θάνατο όποιου

φλεβοτόμου προσροφήσει αίμα από το σκύλο. Και στις δύο περιπτώσεις διακόπτεται η μετάδοση.

Τα συνθετικά πυρεθροειδή είναι τα κύρια φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αποτροπή των νυγμάτων των φλεβοτόμων^{[202][202]}. Τα πρώτα πειραματικά μοντέλα περιελάμβαναν το περιοδικό λουτρό του σκύλου σε εναιώρημα δελταμεθρίνης ενώ τα πιο πρόσφατα είναι τα κολάρα PVC εμβαπτισμένα σε δελταμεθρίνη (Scalibor®). Το εντομοκτόνο απελευθερώνεται παρατεταμένα ως αποτέλεσμα της τριβής μεταξύ του κολάρου και του τριχώματος του σκύλου. Η δελταμεθρίνη στη συνέχεια εισβάλλει στον υποδόριο κυτταρικό ιστό και διανέμεται στο λίπος που περιβάλλει όλη την επιφάνεια του ζώου, μέσα σε διάστημα 1-2 εβδομάδων ^[214]. Αυτή η μέθοδος μπορεί να μειώσει τα νύγματα εντόμων κατά 98% και να αυξήσει την αποτελεσματικότητα του εντομοκτόνου κατά 66%. Επίσης, δεν προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες ^{[213][215][216][217]}.

Διάφορες άλλες τοπικές εφαρμογές εντομοκτόνων έχουν εφαρμοστεί, χωρίς όμως τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα^{[217][218]}. Το πιο αποτελεσματικό είναι ένα διάλυμα περμεθρίνης (EXspot®) που εφαρμόζεται κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης του σκύλου σε μορφή αμπούλας. Μέσα σε μια εβδομάδα το εντομοκτόνο διανέμεται σε όλο το σώμα του ζώου και η συνολική μείωση των νυγμάτων από φλεβοτόμους αγγίζει το 77% μέσα σε 7 εβδομάδες^[219].

Άλλες χημικές ενώσεις, η αβερμεκτίνη και η πυριπροξифίνη (ένας ρυθμιστής ανάπτυξης του εντόμου), βρίσκονται σε πειραματικό έλεγχο πρώτης φάσης^[220].

Το αποτελεσματικότερο όμως μέτρο προφύλαξης των σκύλων από τα νύγματα των φλεβοτόμων αποτελεί η χορήγηση αλλοπουρινόλης (20 mg/kg) για 7 συνεχείς μέρες κάθε μήνα σε συνδυασμό με την επάλειψη του ζώου με την εντομοαπωθητική ουσία DEET (Autan®), στα σημεία τα οποία συνήθως νύσσουν οι φλεβοτόμοι, 3 φορές την εβδομάδα. Ένα αποτελεσματικό συνδυαστικό μέτρο αποτελεί η τοποθέτηση του ζώου σε κλωβό με λεπτό δικτυωτό που έχει ψεκαστεί με συνθετικά πυρεθροειδή, ειδικότερα με δελταμεθρίνη και μερμεθρίνη, κατά ώρες της εντονότερης δραστηριότητας των φλεβοτόμων (8μ.μ.-3π.μ.)^[222].

Συνοψίζοντας, για τον αποτελεσματικότερο έλεγχο της λείσμανίασης του σκύλου αλλά και του ανθρώπου, προτείνονται τα εξής μέτρα:

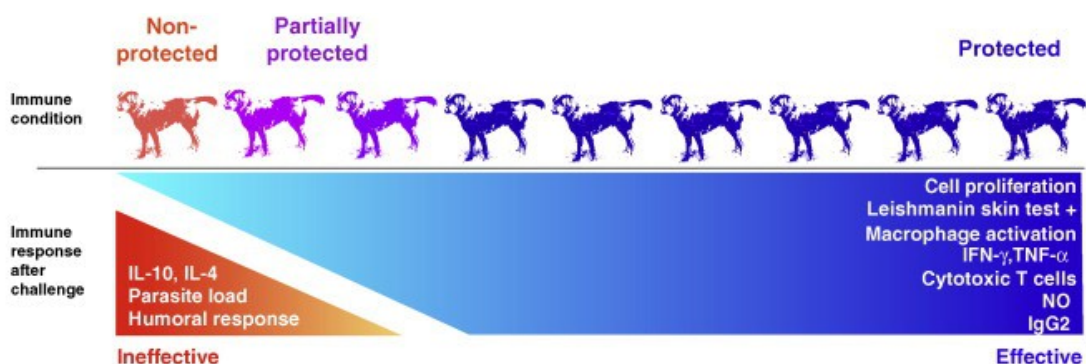
- βελτίωση του συστήματος καταγραφής, συλλογής και επεξεργασίας των κρουσμάτων
- προληπτική ετήσια ορολογική εξέταση
- προφύλαξη κατά τους θερινούς μήνες (Απρίλιο-Οκτώβριο) με χρήση περιλαιμίων PVC εμποτισμένων με πυρεθροειδή
- ψεκασμός του εσωτερικού των σκυλόσπιτων και της στρωμνής των ζώων.
- μείωση του αριθμού των τρωκτικών
- προώθηση ενημερωτικών φυλλαδίων και εκπαιδευτικών, ενημερωτικών προγράμματος
- περιορισμός των αδεσποτων σκύλων με στείρωση και υιοθεσία
- εξέταση των αδεσποτων σκύλων με παρέμβαση εμπλεκόμενων φορέων και ζωοφιλικών σωματείων^[212].

11. ΕΜΒΟΛΙΑ

Ο εμβολιασμός των σκύλων στις περιοχές όπου ενδημεί η νόσος αποτελεί την καλύτερη στρατηγική ελέγχου της ζωνοτικής σπλαχνικής λείσμανίασης του ανθρώπου, καθώς ο εμβολιασμός των σκύλων μειώνει δραματικά την επίπτωση στον άνθρωπο.

Για να θεωρηθεί ένα εμβόλιο αποτελεσματικό κατά της λείσμανίασης θα πρέπει να είναι ικανό να επάγει μακροπρόθεσμη και ισχυρή κυτταρική ανοσία (Εικόνα 15).

Αυτή η προσέγγιση είναι θεωρητικά εφικτή, αν σκεφτεί κανείς το γεγονός ότι δε νοσούν όλοι οι μολυσμένοι σκύλοι, πράγμα που σημαίνει ότι μερικοί αναπτύσσουν αυτόματα κάποιας μορφής ανοσία^{[223][224]}.



Εικόνα 15: Βιοδείκτες ανοσογονικότητας και αποτελεσματικότητας σε εμβολιασμένους για την CanL σκύλους. Οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για να μετρηθεί η αποτελεσματικότητα ενός εμβολίου ταυτοποιήθηκαν μετά τον εμβολιασμό σκύλων με αποτελεσματικά και αναποτελεσματικά εμβόλια κατά της CanL. Για να χαρακτηριστεί ένα εμβόλιο αποτελεσματικό πρέπει να είναι ικανό να επάγει μια ανοσολογική αντίδραση που χαρακτηρίζεται από την αύξηση των επιπέδων διαφόρων δεικτών, όπως είναι η ενεργοποίηση των μακροφάγων, ο πολλαπλασιασμός των PBMC κυττάρων μετά από επαφή με αντιγόνα *Leishmania*, η έκφραση των παραγόντων IFN- γ και TNF- α , η ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, η παραγωγή NO, το θετικό δερματικό τεστ λείσμανίνης και η παραγωγή ειδικών για τη *Leishmania* IgG2 αντισωμάτων (δεξιά). Η ποσοτικοποίηση αυτών των παραμέτρων επιτρέπει την ασφαλή εξαγωγή του συμπεράσματος ότι ο βαθμός προστασίας που επάγει το εκάστοτε εμβόλιο είναι αρκετά υψηλός και μακροπρόθεσμος, ώστε να ελεγχθεί η εξάπλωση του παρασίτου σε όλα τα εμβολιασμένα ζώα. Αντιθέτως, αυξημένα επίπεδα άλλων βιοδεικτών υποδεικνύουν την αναποτελεσματικότητα του εμβολίου που εξετάζεται, καθώς οι ανοσολογικές αποκρίσεις που επάγει είναι ανεπαρκείς με αποτέλεσμα το ζώο να είναι μερικώς ή καθόλου προστατευμένο. Τέτοιοι δείκτες είναι το αυξημένο παρασιτικό φορτίο, η αυξημένη έκφραση των ιντερλευκινών IL-10 και IL-4 καθώς και ειδικών για τη *Leishmania* αντισωμάτων του ορού (αριστερά). ^[245]

Έχουν δοκιμαστεί πολλά πρωτόκολλα ανοσοποίησης κατά της λείσμανίασης, τα οποία χρησιμοποιούν ένα εύρος αντιγόνων για την επαγωγή ανοσίας. Τα αντιγόνα που έχουν χρησιμοποιηθεί μπορεί να είναι ολόκληρα νεκρά παράσιτα ή τμήματά τους, ζωντανά εξασθενημένα παράσιτα, ανασυνδυασμένες ή συνθετικές πρωτεΐνες, συνθετικά πεπτίδια, μη πρωτεϊνικά αντιγόνα, ανοσογόνοι παράγοντες εκφραζόμενοι σε βακτήρια και ιούς, καθώς επίσης και “γυμνό” DNA του παρασίτου. Η πλειοψηφία τέτοιων εμβολίων έχει δοκιμαστεί σε πειραματικά μοντέλα ποντικών και ένας περιορισμένος αριθμός τους σε ανθρώπους.

Μία πρώτη προσπάθεια για ανοσοποίηση σκύλων με πρωτόκολλα που είχαν δοκιμαστεί σε ποντικούς όχι μόνο δεν ήταν επιτυχημένη, αλλά είχε ως αποτέλεσμα έξαρση της νόσου^[225]. Σε δεύτερη φάση εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα εμβολίων που περιείχαν ως φορείς προμαστιγωτών μορφών του *L. braziliensis* ή αποστειρωμένων παρασίτων *L. infantum* ή *L. major*, το βάκιλλο Calmette-Guerin (BCG)^[226]. Αυτά τα εμβόλια επέδειξαν επαγωγή κυτταρικής ανοσίας, καθώς προκάλεσαν πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων ή θετικό δερματικό τεστ λείσμανίνης. Τα ζώα που εμβολιάστηκαν με αυτά τα εμβόλια παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα μόλυνσης σε σχέση με ζώα που δεν είχαν εμβολιαστεί, αλλά αυτά τα εμβόλια επέδειξαν φτωχό αποτέλεσμα σε δοκιμές

πεδίου^[227]. Το πρώτο εμβόλιο που πρόσφερε ικανοποιητική προστασία ήταν ένα εμβόλιο φουκόζης-μαννόζης. Δύο χρόνια μετά τον εμβολιασμό με αυτό το εμβόλιο, μόνο το 8% των σκύλων ανέπτυξε τη νόσο σε σχέση με το 33% σκύλων που δεν είχαν εμβολιαστεί. Σε μία μεταγενέστερη μελέτη που χρησιμοποίησε το ίδιο εμβόλιο, σε συνδυασμό με τον παράγοντα QuilA[®]-σαπωνίνης, μόνο το 5% των εμβολιασμένων σκύλων ανέπτυξε κλινικά συμπτώματα σε σύγκριση με το 25% των μη εμβολιασμένων σκύλων^[228].

Πρόσφατα, έκαναν την εμφάνισή τους νέες στρατηγικές εμβολιασμού σκύλων που έχουν ήδη δοκιμαστεί σε ποντικούς. Μία από αυτές ήταν η χιμαιρική πολυ-παραγοντική αντιγονική πρωτεΐνη Q που σχηματίστηκε από τη συγχώνευση 5 τμημάτων τεσσάρων πρωτεϊνών, των Lip2a, Lip2b, P0 και της ιστόνης H2A^[229]. Το εμβόλιο χορηγήθηκε μαζί με ζωντανά βακτήρια BCG και προσέφερε προστασία σε 9 από τους 10 σκύλους.

11.1 Cani Leish[®]

Στις 14/03/2011, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή χορήγησε άδεια κυκλοφορίας, η οποία ισχύει σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση, στη Virbac S.A για το καινοτόμο εμβόλιο κατά της CanL, CaniLeish[®]^[231].

Το προϊόν διατίθεται υπό μορφή κόνεως και διαλύτη, για την παρασκευή ενέσιμου εναιωρήματος (Εικόνα 14). Πρόκειται για ένα λυόφιλο προϊόν που χρησιμοποιεί ως δραστικό αντιγονικό συστατικό τις πρωτεΐνες ESP (Excreted Secreted Proteins) του παρασίτου, σε ποσότητα ≥ 100 μg . Ως ανοσοενισχυτικό, για την αποτελεσματικότερη δράση του εμβολίου, χρησιμοποιείται καθαρό εκχύλισμα του φυτού *Quillaja saponaria* (QA-21), σε ποσότητα 60 μg . Το καθαρό κλάσμα QA-21 έχει τη δυνατότητα να διεγείρει την κυτταρική ανοσία, ενώ ταυτόχρονα παρέχει ένα καλό προφίλ ασφάλειας^[231].

Το CaniLeish[®] είναι αποδεδειγμένα αφαλές σε εργαστηριακές μελέτες αλλά και σε μελέτες πεδίου. Όπως προαναφέρθηκε δεν περιέχει ολόκληρο παράσιτο αλλά μόνο πρωτεΐνες του και άρα δεν είναι μολυσματικό ακόμη και σε ανοσοκατεσταλμένους σκύλους, ενώ ταυτόχρονα είναι πολύ καλά ανεκτό, με τη

σοβαρότερη ανεπιθύμητη ενέργεια να αποτελεί η εμφάνιση καλοήθους οιδήματος στο σημείο της έγχυσης που σε κάποιες περιπτώσεις συσχετίσθηκε με άλγος. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί σκλήρυνση στο σημείο έγχυσης μετά την πρώτη και δεύτερη έγχυση και αυτό οδήγησε σε παροδική αλωπεκία^[232].



Εικόνα 14: Το εμβόλιο Cani Leish[®] [231]

Το CaniLeish[®] επιφέρει την ενεργητική ανοσοποίηση σε σκύλους που δεν έχουν μολυνθεί με *Leishmania*, ηλικίας άνω των 6 μηνών^[231]. Αυτό γιατί, η κυτταρική ανοσία ωριμάζει αργότερα από τη χυμική επομένως ο εμβολιασμός σε σκύλους μικρότερους των 6 μηνών ενδέχεται να είναι αναποτελεσματικός. Το εμβόλιο χορηγείται ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης ενεργού λοίμωξης και κλινικά εκδηλωμένης νόσου, μετά από επαφή με την *Leishmania infantum*^[232]. Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου έχει αποδειχθεί σε σκύλους που υποβλήθηκαν σε πολλαπλή φυσική έκθεση στο παράσιτο, σε περιοχές με υψηλό μολυσματικό φορτίο. Η έναρξη ανοσίας συμβαίνει 4 εβδομάδες μετά το αρχικό πρόγραμμα εμβολιασμού και η διάρκεια ανοσίας ανέρχεται στο 1 έτος μετά τον τελευταίο (επαν-)εμβολιασμό^[233].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το εμβόλιο επιτρέπει στο ανοσοποιητικό σύστημα να απαντήσει με την επιθυμητή Th1 κυτταρική ανοσία σε περίπτωση μόλυνσης από το παράσιτο, δεν αποτρέπει όμως τους φλεβοτόμους από το να νύσσουν το σκύλο. Επομένως, μετά τον εμβολιασμό ο σκύλος συνεχίζει να μολύνεται με το παράσιτο αλλά σε μεγάλο βαθμό καταφέρνει να το αντιμετωπίσει και να περιορίσει την εξέλιξη της νόσου. Σύμφωνα με τις μελέτες αποτελεσματικότητας του εμβολίου, το 87,8% των εμβολιασμένων σκύλων δεν ανέπτυξε ενεργό λοίμωξη (συμπτωματική ή ασυμπτωματική) ακόμα και κάτω από ακραίες συνθήκες. Οι σκύλοι μπορούν να μολύνουν άλλους φλεβοτόμους κυρίως στο στάδιο της ενεργού λοίμωξης και της ενεργής νόσου. Με το εμβόλιο περιορίζεται ο αριθμός των σκύλων που θα αναπτύξουν αυτά τα δύο στάδια επομένως και ο αριθμός των σκύλων που είναι πιο μολυσματικοί. Σε εκείνα τα ζώα που θα αναπτύξουν τη νόσο, παρά το γεγονός ότι έχουν εμβολιαστεί, η εξέλιξη θα είναι γενικά πιο αργή και πιο ήπιας μορφής. Το γεγονός αυτό είναι υψίστης επιδημιολογικής σημασίας διότι το επίπεδο μολυσματικότητας σχετίζεται με την ανάπτυξη των προχωρημένων σταδίων της νόσου και άρα η μείωση του αριθμού των σκύλων που τα εμφανίζουν έχει σημαντικό αντίκτυπο σε περιοχές όπου γίνεται ευρεία χρήση του εμβολίου. Για ακόμη μεγαλύτερη προστασία κατά της CanL είναι καλό ο εμβολιασμός να συνδυάζεται με άλλα μέτρα προστασίας, όπως με τη χρήση προϊόντων με απωθητική/εντομοκτόνο δράση^[232].

Η σωστή χρήση του εμβολίου έγκειται στη διενέργεια προεμβολιακού ελέγχου με την πραγματοποίηση ενός γρήγορου διαγνωστικού τεστ (Speed Leish K™) πριν από τον εμβολιασμό. Αν το Speed Leish K™ είναι θετικό ο κτηνίατρος οφείλει να πραγματοποιήσει περαιτέρω εξετάσεις (IFAT, ELISA κτλ.), ώστε να διαπιστωθεί αν ο σκύλος είναι πράγματι μολυσμένος με *Leishmania infantum*. Αν αυτά τα τεστ είναι αρνητικά, συνίσταται ο εμβολιασμός. Αν όμως το αποτέλεσμα είναι ασθενώς θετικό, τότε πραγματοποιούνται και άλλες, διαφορετικές δοκιμασίες, το αρνητικό αποτέλεσμα των οποίων ακολουθείται από επανεξέταση μετά την παρέλευση 3 μηνών. Αντιθέτως, αν οι τελευταίες δοκιμασίες έχουν ισχυρά θετικό αποτέλεσμα,

είναι σχεδόν σίγουρη η ύπαρξη ενεργού νόσου, γεγονός που επιβάλλει την έναρξη κατάλληλου θεραπευτικού πρωτοκόλλου.

Από την άλλη πλευρά, αν το Speed Leish K™ έχει αρνητικό αποτέλεσμα εξαρχής, συνίσταται η έναρξη του εμβολιακού σχήματος με 3 υποδόριες δόσεις, η πρώτη από τον 6^ο μήνα ηλικίας, η δεύτερη 3 εβδομάδες μετά και η τρίτη 3 εβδομάδες μετά τη δεύτερη. Στη συνέχεια μόνο μια ετήσια επανάληψη (αναμνηστική δόση) είναι αρκετή για τη διατήρηση της ανοσίας^[232].

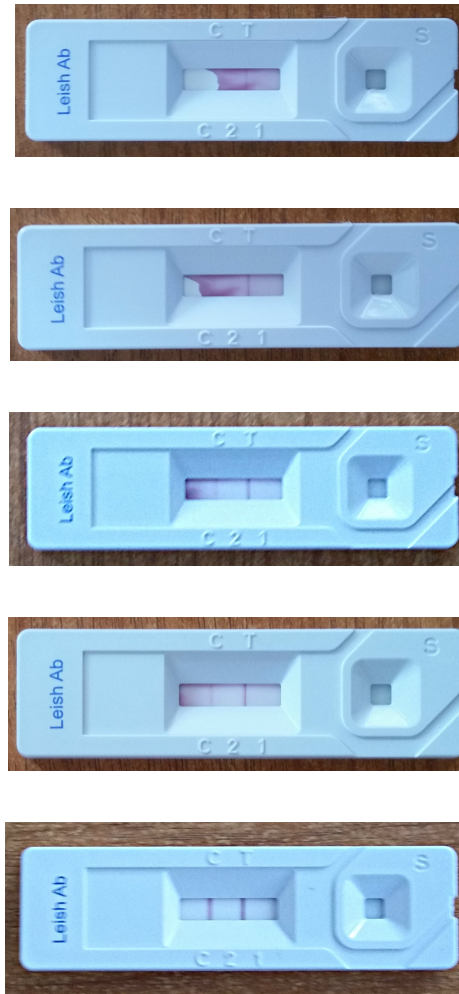
11.2 Προεμβολιακός έλεγχος-Speed Leish K™

Το Speed Leish K™ (Εικόνα 16) είναι ένα τεστ ταχείας διάγνωσης κατάλληλο τόσο για προεμβολιακό έλεγχο όσο και για το διαχωρισμό της φυσικής μόλυνσης από τα αντισώματα που προκύπτουν λόγω εμβολιασμού επειδή τα αντισώματα αντικινεσίνης δεν παράγονται μετά τον εμβολιασμό^[231].



Εικόνα 16: Το τεστ ταχείας διάγνωσης Speed Leish K™^[231]

Πιο συγκεκριμένα, οι κινεσίνες είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του κυττάρου της *Leishmania* και παράγονται σε όλα τα στάδια πολλαπλασιασμού του παρασίτου στο σκύλο. Η έντονη παραγωγή κινεσινών που παρουσιάζεται κατά της διάρκειας της κυτταρικής διαίρεσης οδηγεί σε έντονη ανοσοαπόκριση από τον ξενιστή από τα αρχικά ακόμη στάδια της μόλυνσης και εξιδικευμένη παραγωγή αντισωμάτων αντικινεσίνης^[231].



Εικόνα 17: Μία ακολουθία των διαοχικών σταδίων της εικόνας που έχει το γρήγορο τεστ για τη λείσμανίαση. Καθώς πραγματοποιείται η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, ένα θετικό τεστ καταλήγει στην εμφάνιση διπλής γραμμής ενώ ένα αρνητικό στην εμφάνιση μονής γραμμής.

Το Speed Leish K™ επιτρέπει την ανίχνευση αντισωμάτων αντικινεσίνης με τη χρήση του συμπλέγματος δέσμησης κινεσίνης ή KCC (Kinesin Capture Complex), ενός συμπλέγματος ειδικά επιλεγμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που διασφαλίζει για το Speed Leish K™ βέλτιστη εξειδίκευση με σκοπό να αποφεύγονται οι πιθανές διασταυρούμενες αντιδράσεις και επομένως τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Εικόνα 17). Ο συσχετισμός διαφόρων

ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών επιτρέπει στο σύμπλεγμα αυτό να διατηρεί μια ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία (98%) και εξειδίκευση (100%), σε όλα τα στάδια της μόλυνσης με συνολική ακρίβεια διάγνωσης που αγγίζει το 98,5%^[231].

12. ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ

Παρακάτω παρουσιάζονται τρία περιστατικά σκύλων που διαγνώστηκαν με λείσμανίαση στο Ιατρείο Μικρών Ζώων-Καραμήτρος Ανέστης, όπου πραγματοποιήθηκε το εργαστηριακό σκέλος της πτυχιακής εργασίας.

12.1 Περιστατικό 1

Ημιαίμος θηλυκός σκύλος, ηλικίας 8 ετών και βάρους 19 κιλών, προσκομίστηκε στο ιατρείο για κατάπτωση και εκτεταμένες δερματικές αλλοιώσεις.

Ευρήματα κλινικής εξέτασης

Απολεπιστική δερματίτιδα, δερματικά έλκη κυρίως στο επιρρίνιο αλλά και στα άκρα, ονυχογρύπωση, επιπεφυκίτιδα, περιφερική λεμφαδενομεγαλία, ανορεξία, θερμοκρασία (39,5°C), επίσταξη, κινητικές ανωμαλίες και γενικευμένη αδιαθεσία.

Αιματολογική εξέταση

Δείκτης	Τιμή	Φυσιολογικό Εύρος
Hct	32.5	37-55
Hg	10.2	12-18
WBC	19	6-16.9
MCHC	30	30-36
PLT	120	175-500
EOS	2	0-1.5

Βιοχημική εξέταση

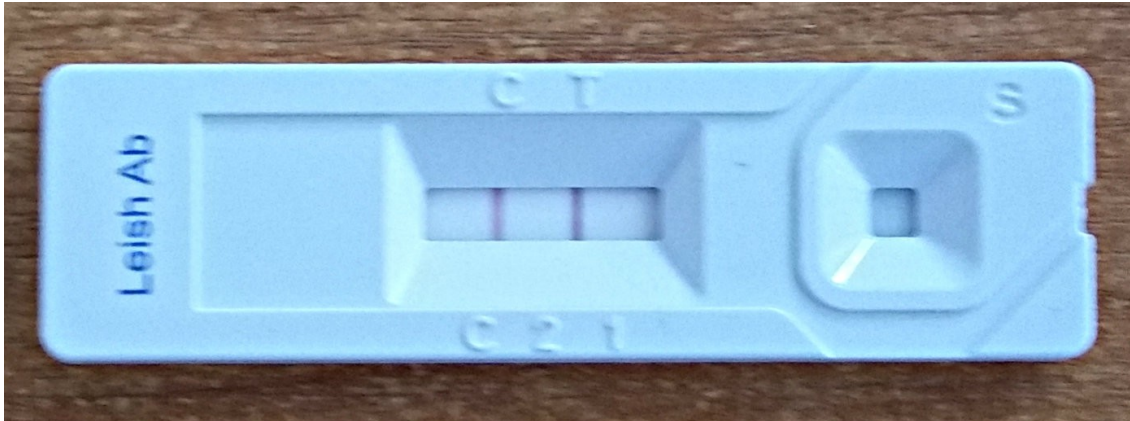
Δείκτης	Τιμή	Φυσιολογικό Εύρος
uREA	5.4	2.5-9.6
cREA	87	44-159



Εικόνα 18: Στις παραπάνω φωτογραφίες διακρίνονται ξεκάθαρα τα δερματικά έλκη στο επιρρίνιο και τα άκρα, η προχωρημένη επιπεφυκίτιδα, η ονυχογρύπωση, καθώς και η γενικότερη κατάρπτωση του σκύλου.

Ορολογική εξέταση

Test	Αποτέλεσμα
Leish	θετικό (+)



Εικόνα 19: Το θετικό ορολογικό τεστ με τη χαρακτηριστική διπλή γραμμή.

Μικροσκοπική εξέταση

Εξέταση δερματικών επιχρισμάτων αποκάλυψε υπερανάπτυξη Malassezia.

Θεραπεία

Χορηγήθηκε μιλτεφοσίνη 2mg/kg/24h για 28 ημέρες και αντιμυκητιακά.

12.2 Περιστατικό 2

Κυνηγετικός θηλυκός σκύλος, ηλικίας 6,5 ετών και βάρους 15 κιλών, προσκομίστηκε στο ιατρείο για κατάπτωση, ανορεξία και απώλεια βάρους.

Ευρήματα κλινικής εξέτασης

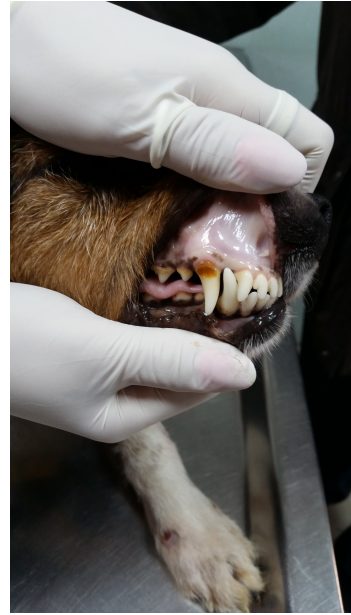
Ανορεξία, κατάπτωση, αδιαθεσία, απώλεια βάρους, δερματικά έλκη στα άκρα και την ουρά, θερμοκρασία (39,2°C), ωχρότητα στοματικού βλεννογόνου και περιφερική λεμφαδενομεγαλία.

Αιματολογική εξέταση

Δείκτης	Τιμή	Φυσιολογικό Εύρος
Hct	25.3	37-55
Hg	8.3	12-18
WBC	12.7	6-16.9
MCHC	29	30-36
PLT	135	175-500
EOS	1.5	0-1.5

Βιοχημική εξέταση

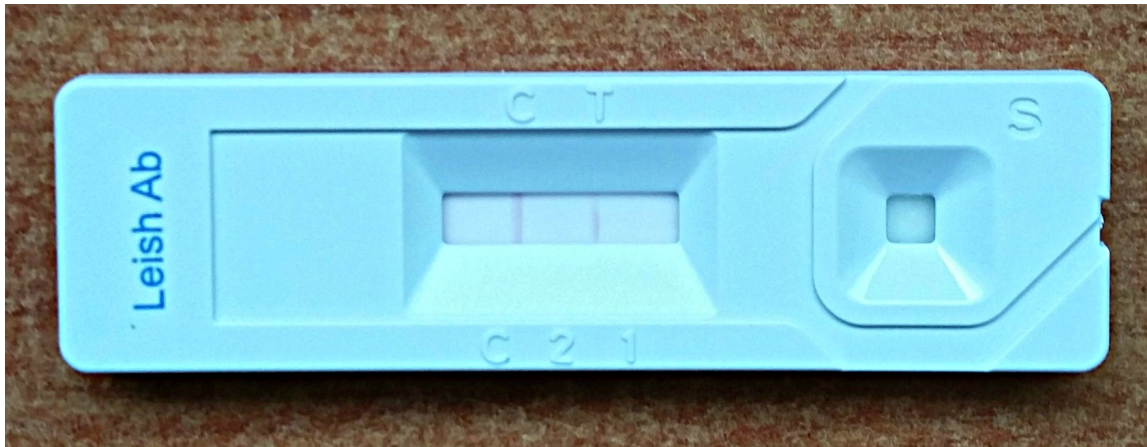
Δείκτης	Τιμή	Φυσιολογικό Εύρος
uREA	21	2.5-9.6
cREA	203	44-159



Εικόνα 20: Στις παραπάνω φωτογραφίες φαίνεται η ψηλάφηση των διογκωμένων περιφερικών λεμφαδένων (πάνω αριστερά), η ωχρότητα του στοματικού βλεννογόνου (πάνω δεξιά), η απώλεια βάρους και η γενική κατάπτωση του σκύλου (κέντρο), καθώς και τα δερματικά έλκη στα άκρα και την ουρά.

Ορολογική εξέταση

Test	Αποτέλεσμα
Leish	θετικό (+)



Εικόνα 21: Το θετικό ορολογικό τεστ με τη χαρακτηριστική διπλή γραμμή.

Θεραπεία

Δεν πραγματοποιήθηκε διότι κρίθηκε αναγκαία η ευθανασία του σκύλου, με συναίνεση του ιδιοκτήτη.

12.3 Περιστατικό 3

Ημίαιμος αρσενικός σκύλος, ηλικίας 5 ετών και βάρους 16 κιλών προσκομίστηκε στο ιατρείο με ανορεξία, απώλεια βάρους και αδιαθεσία.

Ευρήματα κλινικής εξέτασης

Απώλεια βάρους, θερμοκρασία (38°C), ανορεξία, περιφερική λεμφαδενομεγαλία και ωχρότητα στοματικού βλεννογόνου.

Αιματολογική εξέταση

Δείκτης	Τιμή	Φυσιολογικό Εύρος
Hct	45	37-55
Hg	15.8	12-18
WBC	9.9	6-16.9
MCHC	33.8	30-36
PLT	392	175-500
EOS	1.8	0-1.5

Βιοχημική εξέταση

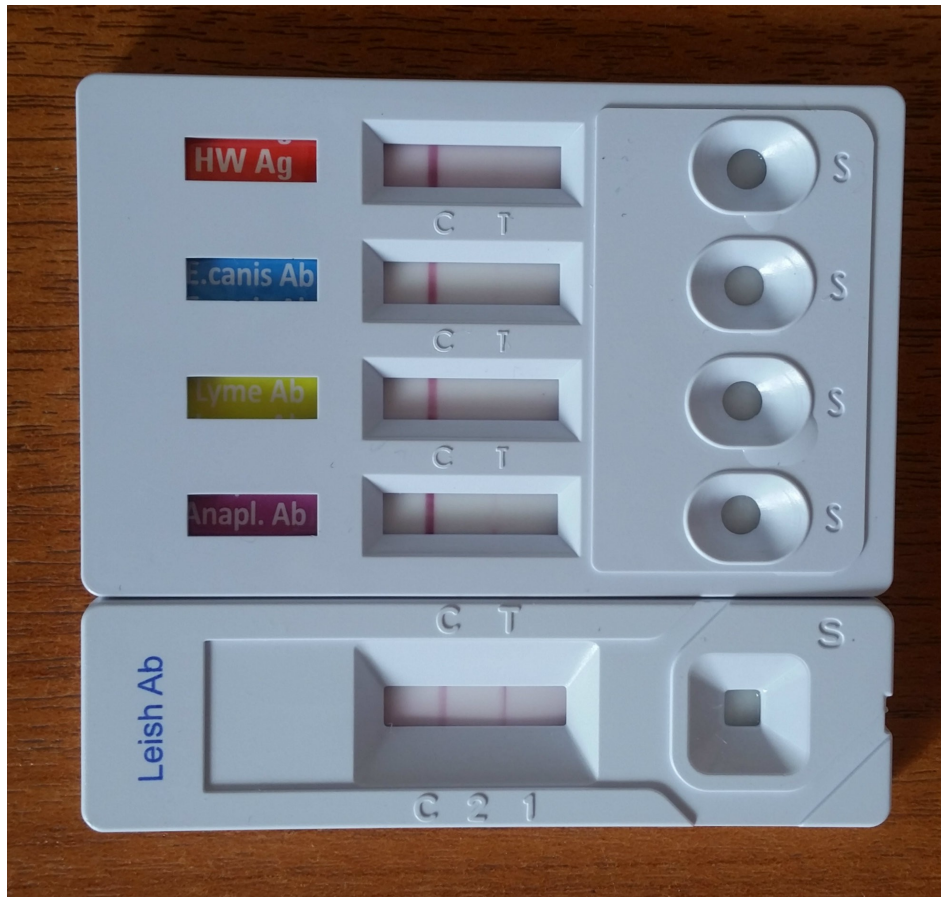
Δείκτης	Τιμή	Φυσιολογικό Εύρος
uREA	6.8	2.5-9.6
cREA	105	44-159

Ορολογική εξέταση

Test	Αποτέλεσμα
Leish	θετικό (+)
Anapl	Αρνητικό (-)
Lyme	Αρνητικό (-)
E. canis	Αρνητικό (-)
HW	Αρνητικό (-)



Εικόνα 22: Στις παραπάνω φωτογραφίες φαίνεται η εξέταση της ρινικής κοιλότητας (πάνω), η ωχρότητα του στοματικού βλεννογόνου (κέντρο) και η γενική κατάπτωση και απώλεια βάρους του σκύλου (κάτω).



Εικόνα 23: Το θετικό για λείσμανίαση ορολογικό τεστ με τη χαρακτηριστική διπλή γραμμή (κάτω) και τα υπόλοιπα αρνητικά ορολογικά τεστ, το σκουλήκι της καρδιάς, την ερλίχια, τη νόσο του Lyme και το ανάπλασμα.

Θεραπεία

Χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη 10mg/kg/24h και δομπεριδόνη 1mg/kg/12h για 30 ημέρες.

13. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δεδομένης της παγκόσμιας, σχεδόν, εξάπλωσης του πρωτοζώου *Leishmania*, των πολλών και πολυπληθών ειδών των φλεβοτόμων, του τεράστιου πληθυσμού των σκύλων αλλά και της επικινδυνότητας που προκύπτει για τον άνθρωπο, κατανοεί κανείς ότι η λεισμανίαση αποτελεί μείζον πρόβλημα υγείας, το οποίο απαιτεί την εφαρμογή άμεσων και αποτελεσματικών μέτρων αντιμετώπισης.

Όπως προαναφέρθηκε, η μόλυνση ενός σκύλου με *Leishmania* δεν οδηγεί πάντοτε σε νόσο και εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων. Επίσης, η έκβαση του εκάστοτε θεραπευτικού πρωτοκόλλου δεν μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια, καθώς μετά την εφαρμογή του το ζώο μπορεί να παρουσιάσει πλήρη ανάρρωση, υποτροπή ή παραμονή σε λανθάνουσα κατάσταση.

Τελικά, ο αποτελεσματικότερος έλεγχος της νόσου θα επέλθει με την επιβολή όχι μόνο θεραπείας αλλά και πρόληψης, με ένα συνδυασμό στρατηγικών ελέγχου του φορέα, αποτροπής των νυγμάτων, καθώς και με εμβολιασμό των σκύλων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. WHO (2014). **Leishmaniasis**. Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, No. 375
2. Στυλιανός. Θ. Χαραλαμπίδης. (2001). **Κτηνιατρική παρασιτολογία: Πρωτόζωα-Έλμινθες-Αρθρόποδα**. University Studio Press Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών Θεσσαλονίκη.
3. Sundar., S., Chakravarty., J. (2013). **Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy**. Expert opinion on pharmacotherapy 14, 53–63
4. Barrett., M.P., Croft., S.L. (2012). **Management of trypanosomiasis and leishmaniasis**. British medical bulletin 104, 175–96
5. Maroli., M., F eliciangeli M. D., Bichaud. L., Charpel. R. N., Gradoni. L. (2012). **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern**. Medical and Veterinary Entomology, 1-3
6. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). **Canine Leishmaniasis**. Advances in Parasitology 57, 6-9
7. Maroli., M., F eliciangeli M. D., Bichaud. L., Charpel. R. N., Gradoni. L. (2012). **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern**. Medical and Veterinary Entomology, 1-3
8. WHO. (2010) **Annual report**. Geneva
9. Bryceson. A., Hay. R. (1998). **Parasitic worms and protozoa**. Textbook of Dermatology 6, 1410-1421
10. Ρόζος. Γ. Ι. (2003). **Κουνούπια- Σκνίπες: Αναμένεται έξαρση**. Κυνηγεσία και Κυνοφιλία
11. Νεόφυτος. Κ. **Ενδοπαράσιτα**. Kynagon Positive Dog Training 48, 246.
12. Myler. P., Fasel. N. (2008). **Leishmania: After The Genome**. Caister Academic Press
13. Barrett., M.P., Croft., S.L. (2012). **Management of trypanosomiasis and leishmaniasis**. *British medical bulletin* 104, 175–96
14. UCLA. (2014). **Morphology and Life Cycle**
15. Myler. P., Fasel. N. (2008). **Leishmania: After The Genome**. Caister Academic Press
16. Pulvertaft. R.J., Hoyle. G.F. (1960). **Stages in the life-cycle of Leishmania donovani**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 54, 191–6
17. CDC, Division of Parasitic Diseases (DPDx). **Leishmaniasis**. <http://www.dDd.cdc.gov/dpdx>
18. **Protozoologia**. Protozoa Goldfus 1918
19. WHO. (2014). **Leishmaniasis Fact Sheet N° 375**

20. Χειμωνάς Χρ. (2001). 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Μικρων Ζώων.
21. Vannier-Santos., M.A., Martiny. A., de Souza. W. (2002). **Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading**. Current Pharmaceutical Design 8, 297–318
22. Paul. William. E. (1993). **Infectious Diseases and the Immune System**. Scientific American 94–95
23. <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/MED1094/Μαστιγοφόρα%20του%20αίματος%20και%20των%20ιστών.pdf>
24. Abranches, P., Silva-Pereira, M.C., Conceicao-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M. and Janz, J.G. (1991a). **Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection**. Journal of Parasitology 77, 557–561
25. Brandonisio, O., Carelli, G., Ceci, L., Consenti, B., Fasanella, A. and Puccini, V. (1992). **Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy)**. European Journal of Epidemiology 8, 273–276.
26. Gradoni, L., Pozio, E., Bettini, S. and Gramiccia, M. (1980). **Leishmaniasis in Tuscany (Italy) III. The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74, 421–422
27. Jambou, D., Marty, P., Jambou, R., Le Fichoux, Y., Haas, P., Jourdain, N. and Bayada, M. (1986). **Preliminary serological study on canine leishmaniasis in the Alpes-Maritimes Departement, France**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 80, 666–667
28. Mancianti, F., Gradoni, I., Gramiccia, M., Pieri, S. and Marconcini, A. (1986). **Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy**. Tropical Medicine and Parasitology 37, 110–112
29. Fisa, R., Gallego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrio, J., Gallego, J. and Portus, M. (1999). **Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus**. Veterinary Parasitology 83, 87–97
30. Gradoni, L., Maroli, M., Gramiccia, M. and Mancianti, F. (1987). **Leishmania infantum infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment**. Medical and Veterinary Entomology 1, 339–342
31. Alvar, J., Molina, R., San Andres, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., Gonzalez, F., San Andres, M.D., Boggio, J., Rodriguez, F., Sainz, A. and Escacena, C. (1994). **Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy**. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 88, 371–378

32. Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J.A., Lucientes, J. and 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.
33. Mancianti, F., Sozzi, S. (1995). **Isolation of Leishmania from a newborn puppy**.
34. Gibson, G., Abrams-Ogg, A. (2012). **Canine Transfusion Medicine**. Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine 2, 289-307
35. Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribañez, M.A., Alvar, J. and Castillo, J.A. (2000b). **Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper**
36. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). **Canine Leishmaniasis**. Advances in Parasitology 57, 6-9
37. Travi, B.L., Tabares, C.J., Cadena, H., Ferro, C. and Osorio, Y. (2001). **Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 64, 119–124
38. Riera, C., Valladares J.E. (1996). **Viable Leishmania infantum in urine and semen in experimentally infected dogs**. Parasitology Today 10, 412
39. Symmers, W.S., (1960). **Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain**. Lancet Infectious Diseases 1, 127-32
40. Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Bern, C., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. (2012) **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence**. PloS One 7, (5)
41. Guerin, P.J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S.L., Desjeux, P., Wasunna, M.K., Bryceson, A.D. (2002) **Visceral leishmaniasis current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda**. The Lancet Infectious Diseases 2, 494-501
42. Diaz-Espineira, M.M. and Slappendel, R.J. (1997). **A case of autochthonous canine leishmaniasis in The Netherlands**. Veterinary Quarterly 19, 69–71
43. Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. and Ferrer, L. (2001c). **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

44. Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J. and Ferrer, L. (2000). **The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection.** *Veterinary Parasitology* 90, 37–45
45. Abranches, P., Silva-Pereira, M.C., Conceicao-Silva, F.M., SantosGomes, G.M. and Janz, J.G. (1991a). **Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection.** *Journal of Parasitology* 77, 557–561
46. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). **Canine Leishmaniasis.** *Advances in Parasitology* 57, 6-9
47. Moreno, J., Alvar, J. (2002). **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model.** *TRENDS in Parasitology* 18, 399-405
48. Semiao-Santos, S.J. Harith, A., Ferreira, E., Pires, C.A., Sousa, C., Gusmão, R. (1995). **Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal.** *Parasitology Research* 81, 235–239
49. Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M. (1999). **Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus.** *Veterinary Parasitology* 83, 87–97
50. Β. Κοντός. (2001). **6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Μικρών Ζώων**
51. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). **Canine Leishmaniasis.** *Advances in Parasitology* 57, 6-9
52. Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamin, N., Campino, L., Schnur, L. and Jaffe, C.L. (1991b). **An experimental model for canine visceral leishmaniasis.** *Parasite Immunology* 13, 537–550
53. Barbieri. C.L. (2006). **Immunology of canine leishmaniasis.** *Parasite Immunology* 28, 271-345
54. Tryphonas., L., Zawidzka., Z., Bernard., M.A. and Janzen., E.A. (1977). **Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations.** *Canadian Journal of Comparative Medicine* 41, 1–12
55. Marzochi., M.C., Coutinho., S.G., De Souza., W.J., De Toledo., L.M., Grimaldi., G., Momen., H., Pacheco., R.S., Sabroza., P.C., De Souza., M.A., Rangel., F.B. and Tramontano., N.C. (1985). **Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977–1983).** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 80, 349–357

56. Longstaffe., J.A. and Guy., M.W. (1986). **Canine leishmaniasis: United Kingdom update**. Journal of Small Animal Practice 27, 663–667
57. Swenson., C.L., Silverman., J., Stromberg., P.C., Johnson., S.E., Wilkie., D.A., Eaton., K.A. and Kociba., G.J. (1988). **Visceral leishmaniasis in an English foxhound from an Ohio research colony**. Journal of the American Veterinary Medical Association 193, 1089–1092
58. Molyneux., D.H. and Ashford., R.W. (1983). **The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Animals**. London: Taylor & Francis
59. Fondevila., D., Vilafranca., M. and Ferrer., L. (1997). **Epidermal immunocompetence in** 60. Hervas. Rodriguez., J., Mozos., E., Mendez., A., Perez., J. and Gomez Villamandos., J.C. (1996). **Leishmania infection of canine skin fibroblasts *in vivo***. Veterinary Pathology 33, 469–473
61. Benderitter., T., Casanova., P., Nashkidachvili., L. and Quilici., M. (1988). **Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis**. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 82, 335–341
62. Costa., F.A., Guerra., J.L., Silva., S.M., Klein., R.P., Mendonca., I.L. and Goto., H. (2000). **CD4(p) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33, 1455–1458
63. Nieto., C.G., Navarrete., I., Habela., M.A., Serrano., F. and Redondo., E. (1992). **Pathological changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection**. Veterinary Parasitology 45, 33–47
64. Vianna., V.L., Takiya., C.M. and de Brito-Gitirana., L. (2002). **Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with Leishmania *donovani***. Parasitology Research 88, 829–836
65. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). **Canine Leishmaniasis**. Advances in Parasitology 57, 6-9
66. Tafuri., W.L., Rosa. de Oliveira., M., Melo., M.N. and Tafuri., W.L. (2001). **Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil**. Veterinary Parasitology 96, 203–212
67. Vamvakidis., C.D., Koutinas., A.F., Kanakoudis., G., Georgiadis., G. and Saridomichelakis., M. (2000). **Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*)**. Veterinary Record 146, 698–703
68. www.vibrac.gr
69. www.leishvet.org

70. <https://www.vectorbase.org/>
71. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/31349/title/Genome-Digest/>
72. <http://www.xavierstudio.com/PROMAST.html>
73. https://en.wikipedia.org/wiki/Leishmania#/media/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg
74. <http://www.bru.licr.org/~opperd/parasites/images/leishmap.gif>
75. www.controlkalaazar.gr