



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

**Διερεύνηση συλλοίμωξης
HIV - πρωτόζωων παρασίτων
σε ορούς HIV+ ασθενών**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΠΟΛΛΩΝ ΔΑΡΕΙΟΣ ΖΑΡΕ ΧΟΡΜΙΖΙ

ΑΜ: 62117118

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΕΣ

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ DVM, PhD

ΜΑΡΙΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ Βιολόγος, MSc, PhD

ΑΘΗΝΑ 2022



FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES

**Investigation of HIV co-infection
with protozoan parasites
in sera of HIV+ patients**

THESIS

APOLLON DAREIOS ZARE CHORMIZI

CANDIDATE NUMBER: 62117118

SUPERVISORS

CHRYSANTHI VOGIATZAKI DVM, PhD

MARIA TSOUMANI Biologist MSc, PhD

ATHENS 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΜΑΡΙΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ

Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος ΑΠΟΛΛΩΝ ΔΑΡΕΙΟΣ ΖΑΡΕ ΧΟΡΜΙΖΙ του ΜΟΧΑΜΑΝΤ ΧΟΥΣΕΪΝ, με αριθμό μητρώου 62117118 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ του Τμήματος ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών



Ευχαριστίες

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την κα. Βογιατζάκη Χρυσάνθη και την κα. Τσουμάνη Μαρία για την εμπιστοσύνη, την συνεργασία, την συνεννόηση και ιδιαίτερα την κα. Βογιατζάκη για την στήριξη και τις πολύτιμες εργαστηριακές συμβουλές.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την κα. Διολή Χρυσούλα και την κα. Γεωργατζάκου Χαρά για την διευκόλυνση της εύρεσης αναλώσιμων στις εργαστηριακές αίθουσες.

Ευχαριστίες στην μητέρα μου και σε όσους/όσες αναγνωρίζουν την εξελικτική μου πορεία στον χρόνο.

Πίνακας περιεχομένων

1. Περίληψη.....	1
1.1 Summary	1
2. Εισαγωγή	2
3. Θεωρητικό Μέρος	3
3.1 <i>Toxoplasma Gondii</i>	3
3.1.1 Κύκλος ζωής	3
3.1.1.1 Οξεία φάση της λοίμωξης	4
3.1.1.2 Χρόνια φάση της λοίμωξης	5
3.1.2 Επιδημιολογία	5
3.1.3 Ανοσοπαθογένεια	6
3.1.4 Κλινικές Εκδηλώσεις.....	8
3.1.5 Πρόγνωση.....	9
3.1.6 Εργαστηριακή διάγνωση	9
3.2 <i>Leishmania spp.</i>	10
3.2.1 Εισαγωγικά Στοιχεία.....	10
3.2.2 Επιδημιολογία	13
3.2.2.1 Σπλαχνική λεισμανίαση.....	13
3.2.2.2 Δερματική λεισμανίαση	13
3.2.2.3 Η επίπτωση της νόσου στην Ελλάδα.....	14
3.2.3 Ανοσοπαθογένεια	15
3.2.4 Κλινικές εκδηλώσεις.....	16
3.2.4.1 Σπλαχνική λεισμανίαση.....	16
3.2.4.2 Δερματική και βλεννογονοδερματική λεισμανίαση	16
3.2.4.3 Post-Kalar-Azar Δερματική λεισμανίαση	17
3.2.5 HAART και Λεισμανίαση.....	17
3.2.6 Εργαστηριακή Διάγνωση.....	17
3.2.6.1 Ανοσολογικές Μέθοδοι.....	18
3.3 <i>Human Immunodeficiency Virus</i>	20
3.3.1 Γενικά στοιχεία.....	20
4. Πειραματικό Μέρος	22
4.1 Σκοπός	22
4.2 Υλικά – Μέθοδοι	22

4.2.1 Δείγματα ορών	22
4.2.2 Σχεδιασμός μελέτης	22
4.2.3 Αρχές Ανοσολογικών Μεθόδων	23
4.2.3.1 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	23
4.2.3.2 Western Blot.....	23
4.2.4 Εργαστηριακές τεχνικές	24
4.2.4.1 Ανίχνευση IgG έναντι του πρωτοζώου <i>T. gondii</i>	24
4.2.4.2 Ανίχνευση IgG έναντι του πρωτοζώου <i>L. Infantum</i>	25
4.3 Δήλωση Ηθικής	25
4.4 Αποτελέσματα	26
4.4.1 Συλλοίμωξη <i>T. gondii</i> – HIV	26
4.4.2 Συλλοίμωξη <i>L. infantum</i> – HIV.....	27
4.4.3 <i>L. infantum</i> – <i>T. gondii</i> – HIV	29
5. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	29
6. Βιβλιογραφία	31

1. Περίληψη

Σκοπός: Σκοπός της ερευνητικής διπλωματικής εργασίας είναι η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι πρωτόζωων παρασίτων, σε ορούς θετικών στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (*Human Immunodeficiency Virus, HIV*) ασθενών. Τα υπό προσδιορισμό αντισώματα έναντι των πρωτόζωων *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) και *Leishmania infantum* (*L. infantum*) ανήκουν στην τάξη IgG. Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν επαρκή διαθέσιμα δεδομένα για τον επιπολασμό πρωτόζωων παρασίτων σε ασθενείς με *HIV*.

Υλικά-Μέθοδοι: Τα δείγματα ορών που ελέγχθηκαν αποτελούν ευγενική παραχώρηση από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος κατά το χρονικό διάστημα 2019-2020. Εξετάστηκαν για την παρουσία αντι-*L. infantum* ή/και αντι-*T. gondii* IgG αντισωμάτων. Για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι των πρωτόζωων *T. gondii* και *L. infantum* εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Indirect Immunofluorescence, IIF) και της ανοσοαποτύπωσης (Immunoblotting).

Αποτελέσματα: Για αντισώματα IgG έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* βρέθηκε θετικότητα 65,4% με την μέθοδο του IIF, ενώ με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης βρέθηκε θετικότητα 55,6%. Το 55,6% επί των εξετασθέντων ορών ήταν θετικό για αντισώματα IgG έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* και με τις δύο μεθόδους. Για αντισώματα IgG έναντι του πρωτοζώου *L. infantum* βρέθηκε θετικότητα 24,2% με την μέθοδο του IIF, ενώ με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης βρέθηκε θετικότητα 15,2%. Το 15,2% επί των εξετασθέντων ορών ήταν θετικό για αντισώματα IgG έναντι του πρωτοζώου *L. infantum* και με τις δύο μεθόδους.

Συμπεράσματα: Στην Ελλάδα υπάρχει σημαντικός αριθμός ασθενών με συλλοίμωξη *HIV* – πρωτόζωων παρασίτων. Επισημαίνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης σοβαρής κλινικής νόσου που διατρέχουν αυτοί οι ασθενείς.

1.1 Summary

Aim: This study aims to detect antibodies against protozoan parasites in the sera of *Human Immunodeficiency Virus (HIV)* - positive patients. The antibodies to be determined against *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) and *Leishmania infantum* (*L. infantum*) belong to the IgG class. In Greece, insufficient data are available on the prevalence of protozoan parasites in *HIV* patients.

Materials-Methods: The serum samples tested were kindly provided by the National AIDS Reference Center of Southern Greece in 2019-2020. They were tested for the presence of anti-*L. infantum* and/or anti-*T. gondii* IgG antibodies. For the detection of IgG antibodies against the protozoa *T. gondii* and *L. infantum*, the Indirect Immunofluorescence (IIF) and Immunoblotting tests were used.

Results: For IgG antibodies against *T. gondii*, a positivity of 65,4% was found by the IIF method, while by the Immunoblotting method a positivity of 55,6% was found. 55,6% of the tested sera were positive for IgG antibodies against the protozoan *T. gondii* by both

methods. For IgG antibodies against *L. infantum*, a positivity of 24,2% was found by the IIF method, while by the Immunoblotting method, a positivity of 15,2% was found. 15,2% of the tested sera were positive for IgG antibodies against the protozoan *L. infantum* by both methods.

Conclusions: In Greece, there is a significant number of patients with HIV with protozoan parasites co-infection. The risk of developing severe clinical disease in these patients is highlighted.

2. Εισαγωγή

Το 2020 περίπου 30,2 – 45,1 εκατομμύρια άνθρωποι ήταν μολυσμένοι με *HIV* παγκοσμίως, ενώ 1,5 εκατομμύρια μολύνθηκαν το ίδιο έτος¹. Στην Ελλάδα το 2020 διαγνώστηκαν και δηλώθηκαν 601 νέα περιστατικά *HIV*², ενώ το 2021 δηλώθηκαν 526 νέα περιστατικά. Το σύνολο των διαγνώσεων *HIV/AIDS* έως το 2021 στην Ελλάδα ανέρχεται στις 19.265 μολύνσεις³. Στην Ευρώπη, η τοξοπλάσμωση και η λεισμανίαση συγκαταλέγονται στις συχνότερες ευκαιριακές παρασιτικές λοιμώξεις. Οι μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, οι ανθρώπινες παρεμβάσεις και οι μετακινήσεις των πληθυσμών συμβάλλουν στην αύξηση της γεωγραφικής αλληλοεπικάλυψης των παθογόνων με συνέπεια την αύξηση της επίπτωσης των συλλοιμώξεων. Στα πλαίσια της συλλοιμώξεως με τον ιό *HIV* τα παθογόνα αναπτύσσουν πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις οι οποίες μέχρι και σήμερα δεν είναι πλήρως κατανοητές. Ωστόσο, έχει τεκμηριωθεί πως οι αλληλεπιδράσεις τους επιταχύνουν την ανάπτυξη καταστάσεων που καθορίζουν το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (*Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS*), την ενεργοποίηση μιας λανθάνουσας παρασιτικής λοίμωξης και επάγουν την ανεξέλεγκτη αναπαραγωγή των παρασίτων ή την διευκόλυνση της εγκατάστασης μιας πρωτογενούς παρασιτικής λοίμωξης, λόγω της προϋπάρχουσας ανοσοκαταστολής που προκλήθηκε από τον ιό. Η λήψη αντιρετροϊκής θεραπείας (*Antiretroviral Therapy, ART*) δεν φαίνεται να περιορίζει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης κλινικής τοξοπλάσμωσης σε αυτούς τους ασθενείς, αλλά έχει συμβάλει στην κατακόρυφη μείωση της θνησιμότητας⁴. Ωστόσο, δεν φαίνεται να ισχύει το ίδιο για την λεισμανίαση για λόγους που θα αναλυθούν στο θεωρητικό κομμάτι αυτής της εργασίας. Στην Ελλάδα, πιστεύεται πως η επίπτωση της συλλοιμώξεως *L. infantum - HIV* είναι σπάνια καθώς έχει καταγραφεί μικρός αριθμός περιπτώσεων^{5,6}.

3. Θεωρητικό Μέρος

3.1 *Toxoplasma Gondii*

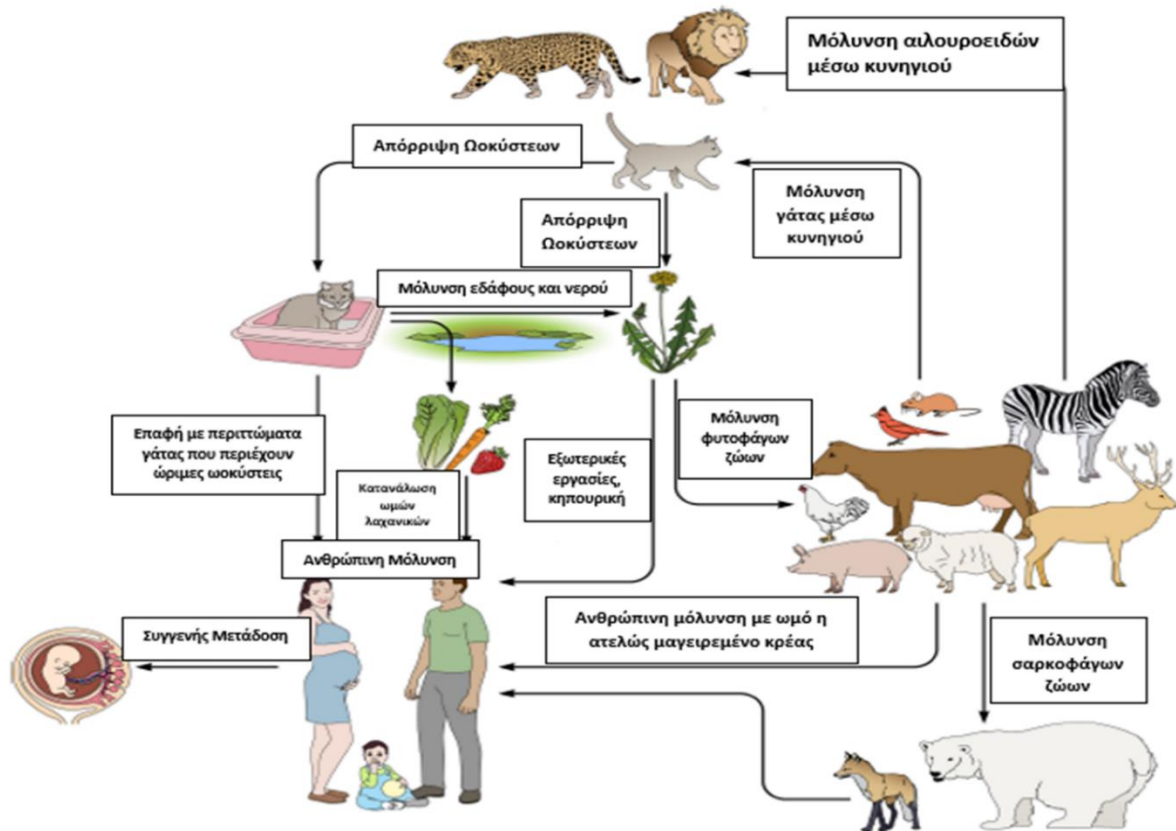
3.1.1 Κύκλος ζωής

Το πρωτόζωο *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό παράσιτο του φύλου *Apicomplexan* που μολύνει θερμόαιμα ζώα⁷. Τα παράσιτα *Apicomplexan* έχουν μια μοναδική σύνθετη δομή στην κορυφή τους (*Apical complex*), η οποία εμπλέκεται στην είσοδο του παρασίτου σε όλα τα κύτταρα του ξενιστή που φέρουν πυρήνα. Έχει τρία μολυσματικά στάδια, έναν ταχέως διαιρούμενο ταχυζωΐτη, έναν βραδέως διαιρούμενο βραδυζωΐτη και τον σποροζωΐτη που βρίσκεται εντός μιας ωοκύστης⁸. Οι οριστικοί ξενιστές είναι οργανισμοί που υποστηρίζουν το στάδιο της φυλετικής αναπαραγωγής του παρασίτου, ενώ οι οργανισμοί που φιλοξενούν το στάδιο της μη φυλετικής αναπαραγωγής ονομάζονται ενδιάμεσοι ξενιστές⁹.

Ο άνθρωπος θεωρείται τυχαίος ξενιστής. Η μετάδοση στους ανθρώπους συμβαίνει κυρίως μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου και ατελώς μαγειρεμένου κρέατος με κύστεις βραδυζωΐτων, μολυσμένου εδάφους ή νερού και ατελώς πλυμένων φρούτων και λαχανικών με ωοκύστεις (τροφιμογενής μετάδοση), από ζώο σε άνθρωπο (ζωνοδόσος) και από την μητέρα στο παιδί κατά την διάρκεια της κύησης (συγγενής μετάδοση), (Εικόνα 1). Σπανιότερα, μέσω της λήψης μοσχεύματος οργάνου και μετάγγισης αίματος⁷.

Το στάδιο της φυλετικής αναπαραγωγής του παρασίτου λαμβάνει χώρα στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα των μελών της οικογένειας *Felidae*, τους μόνους γνωστούς οριστικούς ξενιστές του παρασίτου¹⁰. Τα αιλουροειδή, αποβάλλουν τις ωοκύστεις στο περιβάλλον, το τοίχωμα των οποίων είναι εξαιρετικά ανθεκτικό, προστατεύοντας το παράσιτο από μηχανικές και χημικές βλάβες και εξασφαλίζοντας την επιβίωση του για μεγάλα χρονικά διαστήματα⁷. Οι ωοκύστεις είναι ωοειδείς δομές που περιέχουν δύο σποροκύστεις και κάθε μία από αυτές περιέχει τέσσερα σποροζωΐδια⁷.

Η επεξεργασία του νερού με χλωρίωση και όζον δεν φαίνεται να θανατώνει τις ωοκύστεις. Επίσης, το γλυκό νερό από αστικά κέντρα μπορεί να μολύνει το θαλασσινό νερό και η κατανάλωση στρειδιών και μυδιών έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου για τοξοπλάσμωση. Στην Ευρώπη, εκτιμάται πως η επαφή με μολυσμένο έδαφος ευθύνεται για το 6%-17% των μολύνσεων, ενώ η κατανάλωση μολυσμένου κρέατος για το 30%-63%⁸.



Εικόνα 1. Η μετάδοση του πρωτοζώου *T. gondii*. Απεικονίζονται μερικές από τις τροφιογενείς και περιβαλλοντικές πηγές μόλυνσης⁸.

Έπειτα από την κατάποση της ωκύστης, τα σποροζώϊδια απελευθερώνονται και διεισδύουν στο εντερικό επιθήλιο όπου μετατρέπονται σε ταχυζωΐτες¹⁰. Αυτοί αναπαράγονται ταχέως και εισβάλλουν σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού σχηματίζοντας κύστες που περιέχουν βραδυζωΐτες, οι οποίες παραμένουν ενδοκυτταρικές εφ' όρου ζωής παρά τις διακυμάνσεις στο μέγεθος τους⁷. Παρομοίως, αν ένας ενδιαμέσος ξενιστής, καταναλώσει ατελώς μαγειρεμένο κρέας μολυσμένο με κύστες, τότε οι βραδυζωΐτες θα απελευθερωθούν στην πεπτική οδό μολύνοντας το εντερικό επιθήλιο όπου θα διαφοροποιηθούν ξανά σε ταχυζωΐτες⁸.

3.1.1.1 Οξεία φάση της λοίμωξης

Οξείες εστίες επίκτητης τοξοπλάσμωσης εμφανίζονται τοπικά και σποραδικά⁹. Η οξεία φάση της μόλυνσης χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό με ενδοδουογένεση των ταχυζωΐτων, τις ταχέως αναδιπλασιαζόμενες μορφές του παρασίτου¹¹.

Η μόλυνση ξεκινάει από το λεπτό έντερο όπου τα απελευθερωμένα σποροζωΐδια ή οι βραδυζωΐτες διαφοροποιούνται σε ταχυζωΐτες μολύνοντας τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου ή διασχίζοντας το επιθηλιακό στρώμα και μολύνοντας κύτταρα όπως μακροφάγα, ουδετερόφιλα και μονοπύρνηνα¹⁰. Έπειτα, εξαπλώνονται μέσω των λεμφαγγείων και του αίματος σε σπλήνα, ήπαρ, πνεύμονες για να φτάσουν τελικά στον εγκέφαλο¹⁰.

Αφού το πρωτόζωο *T. gondii* διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, επάγει επιβλαβείς φλεγμονώδεις αποκρίσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ)¹².

3.1.1.2 Χρόνια φάση της λοίμωξης

Το παράσιτο, μόλις μια ημέρα μετά την μόλυνση διαφοροποιείται από ταχυζωΐτες στις βραδέως αναδιπλασιαζόμενες μορφές του παρασίτου, τους βραδυζωΐτες, εντός εμπύρηνων κυττάρων (κυρίως μυϊκών και νευρώνων) σχηματίζοντας κύστεις, το τοίχωμα των οποίων αποτελείται από χιτίνη και γλυκοπρωτεΐνες¹¹. Οι κύστεις κυμαίνονται μεταξύ 10μm – 100μm και παραμένουν ενδοκυτταρικές. Η ρήξη τους λόγω θανάτου του κυττάρου ξενιστή θα οδηγήσει σε απελευθέρωση των βραδυζωΐτών⁸, οι οποίοι θα ξεκινήσουν διαδοχικούς κύκλους σχηματισμού θυγατρικών κύστεων¹⁰.

Η διαφοροποίηση του παρασίτου από ταχυζωΐτη σε βραδυζωΐτη συμβαίνει ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κυτταρικό στρες, η ανοσολογική πίεση και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών¹⁰. Έτσι, παρακάμπτεται η φυλετική αναπαραγωγή του παρασίτου και μεταδίδεται μέσω ενδιάμεσων ξενιστών με την κατανάλωση μολυσμένου κρέατος¹¹.

Η εκ νέου διαφοροποίηση από βραδυζωΐτες σε ταχυζωΐτες είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της λανθάνουσας λοίμωξης σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή¹⁰.

3.1.2 Επιδημιολογία

Το πρωτόζωο *T. gondii* έχει βρεθεί σε περισσότερους από 350 ξενιστές, μεταξύ αυτών και πλήθος θαλάσσιων θηλαστικών. Ο οροθετικός επιπολασμός στα άγρια αιλουροειδή μπορεί να φτάσει το 100%⁸.

Υπολογίζεται πως το 30% του παγκόσμιου πληθυσμού έχει μολυνθεί με *T. gondii*. Η συλλοίμωξη *T. gondii* – HIV μπορεί να επηρεάσει την μετάδοση και την φυσική ιστορία της τοξοπλάσμωσης¹³. Ο εκτιμώμενος παγκόσμιος συγκεντρωτικός επιπολασμός της λοίμωξης από *T. gondii* σε ασθενείς με HIV είναι 35,8%, με την μεγαλύτερη επιβάρυνση να παρατηρείται σε χώρες χαμηλού εισοδήματος. Η υποσαχάρια Αφρική έχει το 87,1% των περιπτώσεων συλλοίμωξης παγκοσμίως, με τον αριθμό των περιπτώσεων να υπολογίζεται στο 13.138.600¹³. Σε μια άλλη μελέτη, ο διάμεσος παγκόσμιος οροθετικός επιπολασμός εκτιμήθηκε στο 44,22%¹⁴.

Ο επιπολασμός της μόλυνσης μπορεί να διαφέρει σημαντικά ακόμα και εντός μιας χώρας και καθορίζεται από το φύλο¹⁰, τις γεωγραφικές περιοχές, καιρικές συνθήκες, ηλικιακές ομάδες, κατανάλωση ωμού ή ατελώς ψημένου κρέατος ή άπλυτων ωμών λαχανικών και φρούτων, η επαφή με γάτες και η ζωή σε αγροτικές περιοχές¹³.

Λίγες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε επίπεδο χώρας για τη λοίμωξη από *T. gondii* σε θετικούς για τον ιό HIV ασθενείς αιτιολογώντας εν μέρει την μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται εντός και μεταξύ των χωρών. Συνεπώς, ο πραγματικός επιπολασμός ενδέχεται να είναι υποεκτιμημένος¹³.

Υπάρχουν πολλά στελέχη που μπορούν να προκαλέσουν τοξοπλάσμωση, αρκετά εκ των οποίων είναι άτυπα. Στην Ευρώπη, απαντώνται κυρίως τα στελέχη I, II και III τα οποία διαφέρουν ως προς την λοιμογόνο δύναμη, τον ρυθμό ανάπτυξης και την ικανότητα σχηματισμού κύστεων¹¹. Το στέλεχος I έχει την μεγαλύτερη λοιμογόνο δύναμη, ενδεχομένως λόγω της ικανότητας του να επιβιώνει έξω από τα κύτταρα-ξενιστές¹¹. Οι περισσότερες ανθρώπινες λοιμώξεις προκαλούνται από τα στελέχη τύπου II¹⁰. Αναλύσεις γενετικού πολυμορφισμού έχουν δείξει πως αυτά τα στελέχη προέκυψαν μετά από μια μοναδική γενετική διασταύρωση πριν από περίπου 10.000 χρόνια η οποία συνέπεσε με την εξημέρωση της γάτας¹¹.

Η σοβαρότητα της τοξοπλάσμωσης εξαρτάται από τον γονότυπο του στελέχους. Άτυπα στελέχη που εντοπίζονται στην Νότια Αμερική και Αφρική, είναι υπεύθυνα για σοβαρές και θανατηφόρες λοιμώξεις ακόμα και σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς⁸. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, η τοξοπλάσμωση αποτελεί μια κατάσταση απειλητική για την ζωή ανεξάρτητα από το στέλεχος⁸.

Η ανοσία έναντι ενός στελέχους μπορεί να μην είναι προστατευτική έναντι ενός άλλου⁸. Παράγοντες της λοιμογόνου δράσης είναι οι εκκριτικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τις ροπτρίες (roptrias), με δραστηριότητα κινάσης ή και ψευδοκινάσης⁸.

3.1.3 Ανοσοπαθγένεια

Το πρωτόζωο *T. gondii* δημιουργεί μια σταθερή ισορροπία μεταξύ της ανοσολογικής απόκρισης και της βιωσιμότητας του ξενιστή¹⁵, «χειραγωγώντας» εν μέρει την ανοσολογική απόκριση.

Η αντιγονοπαρουσίαση του είναι δύσκολη, καθώς εντοπίζεται μέσα σε παρασιτοφόρα κενοτόπια τα οποία δεν συντήκονται με τα λυσοσώματα και το παράσιτο δεν μπορεί να αποικοδομηθεί¹⁵.

Οι ιντερφερόνες α , β (τύπος I) και γ (τύπος II) ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση προάγοντας την έκκριση παραγόντων που στρέφονται έναντι ενδοκυτταρικών παθογόνων¹⁰. Στον άνθρωπο, για τον αποτελεσματικό έλεγχο του παρασίτου είναι υπεύθυνες οι κυτταροκίνες ιντερφερόνη- γ (Interferon gamma, IFN- γ) και ιντερλευκίνη-12 (IL-12)⁸. Το πρόβλημα της αντιμετώπισης του παρασίτου λόγω της περιορισμένης αντιγονοπαρουσίασης, μπορεί να ξεπεραστεί με την παραγωγή IL-12 κυρίως από δενδριτικά κύτταρα, η οποία με την σειρά της θα επάγει την παραγωγή της IFN- γ κυρίως από ουδετερόφιλα και κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killers Cells, NK)⁷. Συνολικά, τα ουδετερόφιλα, τα NK, τα CD4+ T και τα CD8+ T κύτταρα μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από την IFN- γ προστασία του ξενιστή έναντι του παρασίτου⁷.

Η IFN- γ ενεργοποιεί τους μηχανισμούς αποικοδόμησης της τρυπτοφάνης από την ινδολεαμίνη 2,3 – διοξυγενάση (Indoleamine 2,3 – Dioxygenase, IDO)⁷, της σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide, NO) μέσω της επαγωγίσιμης συνθάσης μονοξειδίου του αζώτου (Inducible nitric oxide synthase, iNOS) μειώνοντας τα αποθέματα αργινίνης, της αύξησης των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) με άμεση θανάτωση του παρασίτου και τέλος, του κυτταρικού θανάτου¹⁰. Επίσης, το CD40 μπορεί να

επάγει την εξαρτώμενη από αυτοφαγία θανάτωση του πρωτοζώου *T. gondii* ανεξάρτητα από την IFN- γ ¹⁰.

Ωστόσο, ως απάντηση στην ενεργοποίηση της IFN- γ το παράσιτο εκκρίνει πλήθος δραστικών μορίων για να αποφύγει τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος και να εγκαταστήσει τελικά, μια χρόνια λοίμωξη¹⁰. Ειδικότερα, κατά την είσοδο του στο κύτταρο ξενιστή εκκρίνει δραστικές πρωτεΐνες από δύο κύριες κατηγορίες εκκριτικών οργανιδίων, τις πρωτεΐνες ροπτρίας (Rhoptry Proteins, ROPs) και τις πυκνές κοκκώδεις πρωτεΐνες (Granule Proteins, GRAs)¹⁰.

Οι πρωτεΐνες ροπτρίας ROP16 και ROP18, έχουν εμπλακεί στην τροποποίηση της σηματοδότησης και των ανοσολογικών αποκρίσεων του κυττάρου αναστέλλοντας την παραγωγή της IFN- γ , της IL-12, του παράγοντα νέκρωσης όγκου – α (Tumor Necrosis Factor - α , TNF- α) και τις εξαρτώμενες από IFN- γ αντιμικροβιακές αποκρίσεις¹², αλλά φαίνεται πως αυτό συμβαίνει μόνο στα στελέχη II και III⁸.

Η GRA6 βρίσκεται εντός του παρασιτοφόρου κενοτοπίου και προσελκύει μονοκύτταρα CD11b⁺¹⁰, που αποτελούν τα βασικά κύτταρα για την αιματογενή διάδοση του πρωτοζώου *T. gondii* σε όλα τα όργανα και ιδιαίτερα στο ΚΝΣ με την μέθοδο του «Δούρειου ίππου»⁸. Η ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης του GRA6 φαίνεται να έχει επίδραση στην κλινική έκβαση της νόσου¹⁵. Τα GRA24 και GRA15 επάγουν την παραγωγή των IL-12, IL-18, IL-1 β οδηγώντας σε προστατευτικές ανοσοαποκρίσεις οι οποίες θα μειώσουν την λοιμογόνο δύναμη για την προαγωγή της επιβίωσης του ξενιστή και επομένως την εξασφάλιση της μακροχρόνιας επιμονής του παρασίτου¹⁰.

Ο σχηματισμός λανθανόντων κύστεων αποτελεί μια εξελικτική συμβιβαστική λύση που μειώνει τη λοιμογόνο δύναμη αλλά αυξάνει τη μετάδοση¹¹.

Επίσης, το πρωτόζωο *T. gondii* μπορεί να αναστείλει τους αποπτωτικούς μηχανισμούς του μολυσμένου κυττάρου διασφαλίζοντας έτσι την προστασία έναντι της ταχείας κάθαρσης των παρασίτων από τα μακροφάγα⁸.

Οι συλλοιμώξεις *T. gondii* - HIV είναι ευρέως γνωστές και διαδεδομένες αλλά οι έρευνες που επικεντρώνονται στις αλληλεπιδράσεις αυτών των παθογόνων είναι περιορισμένες¹².

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με την επίδραση της επαγόμενης ανοσοκαταστολής από τον ιό HIV στην ενεργοποίηση της λανθάνουσας τοξοπλάσμωσης, ωστόσο, ο αντίκτυπος της λανθάνουσας φάσης στην εξέλιξη του ιού HIV δεν είναι σαφής¹⁶. Φαίνεται, πως στη λανθάνουσα τοξοπλάσμωση αυξάνεται η επιφανειακή έκφραση δεικτών ανοσολογικής ενεργοποίησης όπως CD38 και ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου – ισότυπου DR (Human Leukocyte Antigen – DR isotype, HLA-DR), πράγμα που σχετίζεται με την εξέλιξη του AIDS και την εξάντληση των CD4+ T κυττάρων¹⁶.

Επίσης, πειραματικά έχει παρατηρηθεί μείωση των IFN- α , TNF- α και λειτουργική αδρανοποίηση των πλασμακυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (Plasmacytoid Dendritic Cells, pDCs) λόγω της λοίμωξης από το πρωτόζωο *T. gondii*¹². Η IFN- α εμπλέκεται στον έλεγχο της αντιγραφής του ιού HIV μέσω της διέγερσης γονιδίων όπως το γονίδιο του ρυθμιστικού παράγοντα ιντερφερόνης 7 (Interferon Regulate Factor 7, IRF7), που επάγουν

την απόπτωση και την αποδόμηση του ριβονουκλεϊκού οξέως (Ribonucleic Acid) RNA, δεσμεύουν ιϊκές νουκλεοπρωτεΐνες και διεγείρουν πλήθος αντιϊκών αποκρίσεων στον ξενιστή. Τα pDCs, μπορούν να μολυνθούν τόσο από τον ιό *HIV* όσο και από το πρωτόζωο *T. gondii*. Η αναστολή των pDC πραγματοποιείται μέσω της λειτουργικής μίμησης της IL-10, μέσω ενός εξαρτώμενου μηχανισμού από την κινάση τυροσίνης ROP16 του παρασίτου. Το ROP16 ενεργοποιεί τον μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (Signal Transducer and Activator of transcription, STAT3), το οποίο φυσιολογικά ενεργοποιείται από την IL-10. Άρα, με την φωσφορυλίωση του STAT3 το πρωτόζωο *T. gondii* μιμείται την αντιφλεγμονώδη σηματοδότηση που κανονικά προκαλείται από την IL-10 και έτσι αναστέλλεται η παραγωγή IFN- α ¹². Αυτό, υποδηλώνει πιθανές αρνητικές συνέπειες της συλλοίμωσης *T. gondii* – *HIV* καθώς η αναστολή της IFN- α από το παράσιτο καθιστά τον ξενιστή ευάλωτο στον ιό *HIV*.

3.1.4 Κλινικές Εκδηλώσεις

Ιστορικά, η λανθάνουσα λοίμωξη από *T. gondii* θεωρείται ασυμπτωματική σε ανοσοεπαρκή άτομα. Ωστόσο, σε περίπτωση ανοσοκαταστολής παρατηρείται ενεργοποίηση, ιδιαίτερα σε άτομα μολυσμένα με τον ιό *HIV* καθιστώντας το παράσιτο συχνό αίτιο ευκαιριακής λοίμωξης¹¹ και εγκεφαλικής βλάβης⁷.

Επίσης, αυξανόμενος αριθμός επιδημιολογικών μελετών υποστηρίζει πως το παράσιτο επιδρά στην συμπεριφορά του ξενιστή¹⁰. Στους ανθρώπους η λοίμωξη με το πρωτόζωο *T. gondii* φαίνεται να σχετίζεται από απλές αλλαγές συμπεριφοράς έως και σχιζοφρένεια⁹.

Η λανθάνουσα λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην συμπεριφορά (επιθετική), την μνήμη (εξασθένιση), τον χρόνο αντίδρασης (μείωση) και την γνωστική λειτουργία (μείωση). Αυτό πιθανώς οφείλεται στην αθροιστική καταστροφή των νευρώνων λόγω της φλεγμονής σε κύκλους επανενεργοποίησης¹⁷.

Παρομοίως, οι ασθενείς με *HIV* και λανθάνουσα λοίμωξη από *T. gondii* μπορεί να παρουσιάσουν υποκλινική εγκεφαλική βλάβη λόγω των ανοσολογικών αντιδράσεων που αυξάνονται κατά την προκαλούμενη από την ART ανοσολογική ανασύσταση, πράγμα που υποστηρίζεται από την ανίχνευση υψηλών τίτλων αντισωμάτων IgG αλλά και υψηλού αριθμού CD4+ T κυττάρων σε ασθενείς με υποβαθμισμένη γνωστική λειτουργία¹⁷.

Εκτός από την υπερβολική φλεγμονή¹⁰ η συσχέτιση με τις νευροψυχιατρικές διαταραχές θα μπορούσε να εξηγηθεί από την επίδραση του παρασίτου στην έκφραση νευροδιαβιβαστών, όπως ο υποδοχέας ντοπαμίνης, το γ-αμινοβουτυρικό και το γλουταμικό και στην αλλοίωση της νευροβιοχημείας του ξενιστή⁹.

Σε ασθενείς με *HIV*, η εγκεφαλική τοξοπλάσμωση αποτελεί την πιο κοινή ευκαιριακή λοίμωξη του ΚΝΣ. Προκαλείται κυρίως από την ενεργοποίηση μιας λανθάνουσας λοίμωξης που αποκτήθηκε νωρίτερα στην ζωή⁴. Μελέτη σε 6.325 άτομα μολυσμένα με *HIV* στον πληθυσμό της Δανίας, αξιολόγησε την συχνότητα εμφάνισης, θνησιμότητας και τους προγνωστικούς παράγοντες της εγκεφαλικής τοξοπλάσμωσης στην εποχή της συνδυαστικής ART και στην εποχή που δεν γινόταν χρήση της συνδυαστικής ART⁴. Δεν φαίνεται να

υπάρχει αλλαγή στον κίνδυνο εμφάνισης εγκεφαλικής τοξοπλάσμωσης αλλά η επίπτωση της και η θνησιμότητα έχουν εμφανώς μειωθεί⁴. Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση, ανέφερε πως παρά την χρήση της ART η εγκεφαλική τοξοπλάσμωση αφορούσε το 6% των εισαγωγών στα νοσοκομεία μεταξύ ασθενών με HIV¹⁸. Τα κύρια συμπτώματα ασθενών με εγκεφαλική τοξοπλάσμωση είναι ο πονοκέφαλος, γνωστικό έλλειμα, πυρετός, πάρεση άκρων, διαταραχές ομιλίας, συντονισμού και επιληπτικές κρίσεις⁴.

3.1.5 Πρόγνωση

Η πρωτοπαθής λοίμωξη παραμένει σε μεγάλο αριθμό ανοσοεπαρκών ασθενών ασυμπτωματική, ωστόσο οι ασθενείς με ανοσοκαταστολή διατρέχουν υψηλό κίνδυνο ενεργοποίησης και ανάπτυξης σοβαρής νόσου με υψηλή θνησιμότητα. Συνεπώς είναι κρίσιμη η έγκαιρη διάγνωση και η προφύλαξη, ιδιαίτερα σε ασθενείς με CD4+ < 200 κύτταρα/μl¹⁴.

Τα αντισώματα IgG αποτελούν δείκτη χρόνιας μόλυνσης ενώ τα IgM είναι δείκτη πρόσφατης μόλυνσης ή ενδεχομένως επαναμόλυνσης με διαφορετικό γονότυπο¹³.

Σε ασθενείς με HIV, η IgM έχει μικρή διαγνωστική αξία ως δείκτης οξείας λοίμωξης¹⁴. Όμως, η ανίχνευση υψηλών τίτλων IgG καθώς και υψηλών τίτλων αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου MAG1 (Matrix Antigen 1, MAG1) του πρωτοζώου *T. gondii*, μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη της εγκεφαλικής τοξοπλάσμωσης^{8,18}. Σε ποντίκια με λανθάνουσα μόλυνση, τα αντι-MAG1 έχουν συσχετιστεί με τον αριθμό των εγκεφαλικών κύστεων και το φορτίο του παρασίτου¹⁸. Οι ασθενείς με αριθμό CD4+ <100 κύτταρα/μl και υψηλά επίπεδα IgG στον ορό έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης εγκεφαλικής τοξοπλάσμωσης⁴.

3.1.6 Εργαστηριακή διάγνωση

Η ταχέως προοδευτική και θανατηφόρα έκβαση της ενεργοποίησης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, καθιστά κρίσιμη την έγκαιρη και ακριβή διάγνωση¹⁸. Η εργαστηριακή διάγνωση της τοξοπλάσμωσης μπορεί να γίνει με την άμεση ανίχνευση παρασίτων, την ανίχνευση αντισωμάτων, ή δεοξυριβονουκλεοτιδικού οξέος του παρασίτου (Deoxyribonucleic Acid, DNA)⁸.

Μεγάλη ποικιλία ορολογικών εξετάσεων είναι εμπορικά διαθέσιμη για την ανίχνευση IgM και IgG αντισωμάτων έναντι του πρωτοζώου *T. gondii*. Ωστόσο, οι περισσότεροι κατασκευαστές χρησιμοποιούν διαφορετικά αντιγόνα με μεταβλητές αποδόσεις¹⁹. Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν αναφέρουν ποια αντιγόνα χρησιμοποιούνται καθιστώντας δύσκολη την συγκριτική ανάλυση των μεθόδων²⁰.

Τα αντισώματα στρέφονται αρχικά έναντι επιφανειακών αντιγόνων, άρα, οι ορολογικές μέθοδοι που βασίζονται σε μεμβρανικά αντιγόνα μπορεί να ανιχνεύσουν νωρίτερα IgG από τις μεθόδους που βασίζονται σε ολόκληρα παράσιτα⁸. Η IgG, ανιχνεύεται 1 έως 3 εβδομάδες μετά την αρχική αύξηση των IgM και φτάνει σε πλατό έπειτα από 2-3 μήνες. Στην συνέχεια μειώνεται και οι υπολειπόμενοι τίτλοι ανιχνεύονται εφ' όρου ζωής⁸.

Σε πρωτογενή λοίμωξη προσδιορίζεται η εμφάνιση της IgM, η αύξηση της IgG και η επακόλουθη σταθεροποίηση της IgG με πιθανή επιμονή της IgM. Σε ενεργοποίηση προσδιορίζεται η αύξηση των τίτλων IgG¹⁹.

Ωστόσο, η IgM δεν αποτελεί πλέον δείκτη πρόσφατης μόλυνσης καθώς ανιχνεύεται ακόμα και μετά από 2 χρόνια από την αρχική λοίμωξη. Συνεπώς, προσδιορίζεται η IgG avidity, δηλαδή η μέτρηση της δεσμευτικής ισχύς του αντισώματος, η οποία βασίζεται στην προοδευτική αύξηση της συγγένειας του για το αντιγόνο-στόχο⁸.

Η δοκιμασία χρώσης Sabin-Feldman αποτελεί το χρυσό πρότυπο στην οροδιάγνωση της τοξοπλάσμωσης και βασίζεται στη λύση των παρασίτων παρουσία συμπληρώματος⁸, αλλά χρησιμοποιεί ενεργό παράσιτο και εφαρμόζεται σε λίγα εργαστήρια²¹.

Σήμερα, τα περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιούν την ενζυμική ανοσοπροσοφθητική δοκιμασία (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Όμως, παρατηρείται μεγάλη μεταβλητότητα στις ευαισθησίες και ειδικότητες των εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών που βασίζονται στην ELISA, συνεπώς τα αποτελέσματα των τίτλων IgG δεν μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους⁸. Συχνά, οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων ανευρίσκονται κοντά στο όριο ανίχνευσης. Οι κατασκευαστές, ορίζουν μια γκριζα ζώνη η οποία αντιστοιχεί σε χαμηλούς τίτλους αντισωμάτων και άρα τα αποτελέσματα θεωρούνται αμφίβολα²². Επίσης, παρά την διαθεσιμότητα μεγάλης ποικιλίας ορολογικών δοκιμασιών και τις προσπάθειες για διεθνή τυποποίηση, παρατηρείται ασυμφωνία μεταξύ των τεχνικών, σε μεγάλο βαθμό λόγω των διαφορών στα χρησιμοποιούμενα αντιγόνα.

Έτσι, σε περιπτώσεις αμφίβολων και ασύμφωνων αποτελεσμάτων θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια δοκιμασία με πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, όπως η Western Blot, ώστε να προσδιοριστεί με σαφήνεια η ανοσολογική κατάσταση αυτών των ασθενών^{22,23}.

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ανιχνεύεται το DNA του πρωτοζώου *T. gondii*, ωστόσο από μόνη της δεν μπορεί να εξάγει σαφή συμπεράσματα για την ορολογική κατάσταση του ασθενούς συνεπώς η χρήση της θα πρέπει να συνοδεύεται με ορολογικές μεθόδους¹⁹.

3.2 *Leishmania spp.*

3.2.1 Εισαγωγικά Στοιχεία

Η λεισμανίαση είναι μια «παραμελημένη» τροπική παρασιτική ασθένεια, που προκαλείται από τουλάχιστον 20 είδη του γένους *Leishmania spp.* και μεταδίδεται με περισσότερα από 90 είδη σκνιπών-διαβιβαστών σε περίπου 70 θηλαστικά-ξενιστές συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου²⁴⁻²⁶.

Τα παθογόνα είδη έναντι του ανθρώπου μεταδίδονται με το τσίμπημα της θηλυκής σκνίπας (Εικόνα 2) *Phlebotomus spp.* στον Παλιό κόσμο (Νότια Ευρώπη, Λεκάνη της Μεσογείου, Μέση Ανατολή, Ασία και Αφρική) και *Lutzomyia spp.* στον Νέο Κόσμο (Κεντρική και Νότια Αμερική). Χαρακτηρίζονται από γενετική ποικιλομορφία η οποία συνεπάγεται ταχεία προσαρμογή στις αλλαγές του περιβάλλοντος, των διαβιβαστών και των ξενιστών²⁷.

Η επιδημιολογία της νόσου, εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του παρασίτου, το είδος της σκνίπας, τις δεξαμενές, τις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες, την κλιματική αλλαγή, τις ανθρώπινες παρεμβάσεις στο περιβάλλον, τις χαμηλές κοινωνικοοικονομικές συνθήκες, τις μετακινήσεις πληθυσμών και την ανοσολογική κατάσταση των ασθενών^{25,27}.

Οι κύριες κλινικές μορφές της νόσου, είναι η σπλαχνική λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis, VL), δερματική λεισμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis, CL) και βλεννογονοδερματική λεισμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis, MCL)²⁵.

Στη Μεσόγειο, ανευρίσκονται τα στελέχη *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major* και *L. tropica*, τα οποία μεταδίδονται από τις σκνίπες που ανήκουν γένος *Phlebotomus*²⁴. Το πρωτόζωο παράσιτο *L. infantum*, αποτελεί το συχνότερο αιτιολογικό παράγοντα της σπλαχνικής λεισμανίασης σε αυτή την περιοχή, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει και δερματική λεισμανίαση. Το πρωτόζωο *L. donovani* προκαλεί τόσο σπλαχνική όσο και δερματική λεισμανίαση ενώ τα πρωτόζωα *L. major* και *L. tropica* προκαλούν δερματική λεισμανίαση.

Τα στελέχη *Leishmania* είναι ζωνοσογόνα, με εξαίρεση τα ανθρωπονοτικά *L. donovani* και *L. tropica* τα οποία δεν απαιτούν άλλους ξενιστές εκτός του ανθρώπου για να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους²⁸, αν και έχουν αναφερθεί δεξαμενές ζώων για αυτά^{24,26}. Στην Μεσόγειο, ο σκύλος αποτελεί την κύρια δεξαμενή του πρωτοζώου *L. infantum* με διάμεση οροθετικότητα 10%^{29,30}.

Επίσης, έχει αναφερθεί η ύπαρξη ενός τεχνητού κύκλου άμεσης μετάδοσης με κοινή χρήση σύριγγας μεταξύ χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών θετικών στον ιό *HIV*²⁴.

Την περασμένη δεκαετία, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των αναφερόμενων κρουσμάτων, η οποία αποδίδεται εν μέρει στους φυσικούς κύκλους της νόσου και την ένταση της μετάδοσης. Ωστόσο, η κλιματική αλλαγή και η μετακίνηση των πληθυσμών λόγω τουρισμού, μετανάστευσης και πολεμικών συγκρούσεων έχει οδηγήσει σε αύξηση των αναφερόμενων περιστατικών²⁴.

Η συλλοίμωξη *Leishmania* - *HIV*, αποτελεί μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις για τον έλεγχο της σπλαχνικής λεισμανίασης και η αυξανόμενη γεωγραφική αλληλοεπικάλυψη αυτών των παθογόνων αποτελεί μια σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία³¹. Η γεωγραφική αλληλοεπικάλυψη οφείλεται στην εξάπλωση του ιού *HIV* από τις αστικές, στις αγροτικές περιοχές και την παράλληλη εξάπλωση της λεισμανίασης από τις αγροτικές, στις αστικές περιοχές³². Σε ενδημικές περιοχές, η μόλυνση από τον ιό *HIV* αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης σπλαχνικής λεισμανίασης κατά 100 έως 2320 φορές³¹. Ασθενείς με συλλοίμωξη παρουσιάζουν άτυπες κλινικές εκδηλώσεις, αυξημένες υποτροπές και επαναμολύνσεις, προβλήματα στη διάγνωση, χαμηλά ποσοστά ίασης και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας³³⁻³⁵. Στη Μεσόγειο, η επίπτωση της συλλοίμωξης είναι πιο εμφανής σε περιοχές όπου η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών αποτελεί κοινωνικό πρόβλημα²⁸.

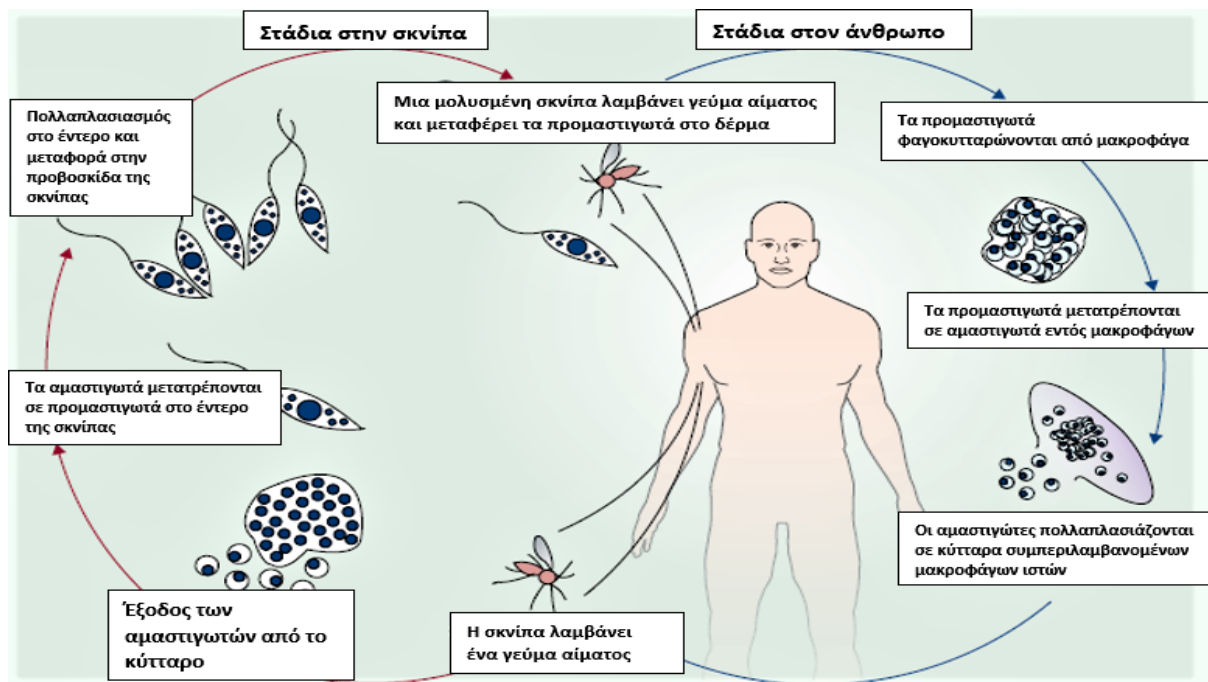
Το πρώτο κρούσμα συλλοίμωξης αναφέρθηκε το 1985 και στην συνέχεια, ο αριθμός των κρουσμάτων στην Νότια Ευρώπη αυξήθηκε ραγδαία³¹. Έως το 2021, αναφέρθηκαν

κρούσματα από 45 χώρες²⁵ και υπολογίζεται πως το 2%-12% των περιπτώσεων σπλαχνικής λεισμανίασης αφορούν ασθενείς με HIV^{31,36}.

Ο πραγματικός αντίκτυπος της λεισμανίασης στην δημόσια υγεία παγκοσμίως είναι υποεκτιμημένος, καθώς η δήλωση του νοσήματος ήταν υποχρεωτική μόνο σε 32 από τις 88 χώρες όπου 350 εκατομμύρια άνθρωποι βρίσκονται σε κίνδυνο³⁷. Επίσης, πιστεύεται πως οι ασυμπτωματικές λοιμώξεις είναι περισσότερες από τις συμπτωματικές, ενώ δεν προβλέπεται προσυμπτωματικός έλεγχος για λεισμανίαση σε ασθενείς με HIV που ζουν η επισκέπτονται ενδημικές περιοχές²⁴.

Επί του παρόντος, στην Ευρώπη υπάρχει επιτακτική ανάγκη για κλινική επαγρύπνηση και επιτήρηση καθώς η λεισμανίαση εξαπλώνεται σε βόρειες περιοχές, επανεμφανίζονται εστίες σε ενδημικές περιοχές και ο κίνδυνος εισαγωγής νέων στελεχών/ειδών λόγω της μετακίνησης πληθυσμών είναι υπαρκτός^{26,38}.

Οι διαβιβάστες της Νότιας Ευρώπης δεν φαίνεται να υποστηρίζουν την ανάπτυξη των εισαγόμενων στελεχών της Αμερικής, ωστόσο έχουν αναφερθεί υβριδικά είδη *Leishmania* στην Πορτογαλία, τα οποία μοιράζονται γενετικά χαρακτηριστικά των πρωτόζων *L. infantum* και *L. major*. Επίσης, απομονωμένα στελέχη *L. infantum* από ασθενείς με συλλοίμωση παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και φυλογενετικές αναλύσεις έχουν δείξει πως εμφανίστηκαν πρόσφατα³⁸. Συνεπώς, η προσαρμοστικότητα που χαρακτηρίζει τα είδη *Leishmania* μπορεί να οδηγήσει στην επικράτηση ανθεκτικότερων στελεχών και την διάδοση τους από μη ειδικούς για αυτά διαβιβάστες²⁶.



Εικόνα 2. Κύκλος ζωής των παρασίτων *Leishmania spp*²⁴.

3.2.2 Επιδημιολογία

3.2.2.1 Σπλαχνική λεισμανίαση

Υπολογίζονται ετησίως 50.000 έως 90.000 νέες περιπτώσεις σπλαχνικής λεισμανίασης σε παγκόσμια κλίμακα με μόνο το 25%-45% να αναφέρονται στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ)²⁵. Το 2020, περισσότερο από το 90% των νέων κρουσμάτων σπλαχνικής λεισμανίασης σημειώθηκαν σε Βραζιλία, Κίνα, Αιθιοπία, Ερυθραία, Ινδία, Κένυα, Σομαλία, Σουδάν και Υεμένη²⁵. Η Ανατολική Αφρική και η Ινδική υποήπειρος έχουν την μεγαλύτερη επιβάρυνση της συλλοίμωξης *HIV – Leishmania* με ποσοστά που φτάνουν έως και το 40% στην πόλη Humera της Αιθιοπίας^{24,39}.

Η σπλαχνική λεισμανίαση είναι ενδημική στη Μεσόγειο, αντιπροσωπεύοντας το 5%-6% της παγκόσμιας επιβάρυνσης με εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση 1200-2000 κρουσμάτων³⁸. Στην Νότια Ευρώπη, έχουν βρεθεί οροεπιπολασμοί που κυμαίνονται μεταξύ 10%-47%²⁶ και πιστεύεται, πως μεγάλο ποσοστό του γενικού πληθυσμού έχει ασυμπτωματική λοίμωξη από το πρωτόζωο *L. infantum*.

Η επίπτωση της συλλοίμωξης αυξήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 και τα κρούσματα κορυφώθηκαν το 1997. Μετά το 2001, στην βιβλιογραφία αναφέρεται μια προοδευτική μείωση των κρουσμάτων η οποία αποδίδεται στην χρήση αντιρετροϊκής θεραπείας υψηλής δραστηριότητας (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART)³⁴.

Οι περισσότερες περιπτώσεις συλλοίμωξης έχουν αναφερθεί σε Γαλλία, Ιταλία, Πορτογαλία και Ισπανία κυρίως σε παράκτιες αστικές περιοχές με υψηλή πληθυσμιακή πυκνότητα. Η Ισπανία, συγκεντρώνει τον μεγαλύτερο αριθμό περιπτώσεων πιθανών λόγω της μεγαλύτερης γεωγραφικής αλληλοεπικάλυψης των παθογόνων^{31,38}. Περίπου το 70%, εμφανίζεται μεταξύ χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών¹⁹.

Στην Πορτογαλία κατά την περίοδο 2000-2009 εντοπίστηκαν 107 περιπτώσεις συλλοίμωξης μεταξύ 173 ασθενών με σπλαχνική λεισμανίαση, παρά την χρήση HAART³⁸. Στην Ιταλία, αναδρομικά, από το 1982 έως το 2012 υπήρξαν τρία ξεσπάσματα. Το πρώτο αφορούσε παιδιά και ανοσοεπαρκείς ενήλικες, το δεύτερο ασθενείς με *HIV* και το τρίτο ανοσοεπαρκή και ανοσοκατεσταλμένα άτομα⁴⁰. Εκεί, έγινε η πρώτη παγκόσμια καταγραφή ασυμπτωματικών λοιμώξεων και στην συνέχεια αποδείχθηκε πως είναι ευρέως διαδεδομένες στην Νότια Ευρώπη⁴⁰. Επί του παρόντος στην Ευρώπη η σπλαχνική λεισμανίαση εντοπίζεται ιδιαίτερα στην Αλβανία, Γεωργία, Ιταλία και Ισπανία³⁰.

3.2.2.2 Δερματική λεισμανίαση

Υπολογίζονται 0,6–1 εκατομμύρια νέα κρούσματα δερματικής λεισμανίασης σε παγκόσμιο επίπεδο ετησίως²⁵. Το 2020 πάνω από το 85% των νέων κρουσμάτων δερματικής λεισμανίασης εμφανίστηκαν σε Αφγανιστάν, Αλγερία, Βραζιλία, Κολομβία, Ιράκ, Λιβύη, Πακιστάν, Περού, Συρία και Τυνησία²⁵.

Επί του παρόντος βρίσκεται σε έξαρση σε περιοχές συγκρούσεων της Μέσης Ανατολής²⁴, ενώ στην Ευρώπη είναι ενδημική και καταγράφεται αυξανόμενος αριθμός εισαγόμενων κρουσμάτων από αυτές τις περιοχές^{24,25}. Στην Αμερική, η επιδημιολογία είναι πολύ

περίπλοκη καθώς πολλά διαφορετικά παράσιτα με διαφορετικά χαρακτηριστικά ανευρίσκονται στις ίδιες περιοχές²⁵.

3.2.2.3 Η επίπτωση της νόσου στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, κατά την περίοδο 2004 - 2018 η μέση επίπτωση της σπλαχνικής λεισμανίασης, υπολογίστηκε στο 0,5 ανά 100.000 κατοίκους, ενώ της δερματικής λεισμανίασης στο 0,05 ανά 100.000 κατοίκους³⁰.

Η Ελλάδα, έχει υψηλό επιπολασμό λεισμανίασης σκύλου⁵ και έχει επίσης αναφερθεί επιπολασμός σε πληθυσμούς αιλουροειδών⁴¹. Ωστόσο, είναι γενικά αποδεκτό πως ο κίνδυνος μόλυνσης δεν αυξάνεται από την συνύπαρξη ενός ανθρώπου με ένα μολυσμένο κατοικίδιο, αλλά από τον υψηλό επιπολασμό του παρασίτου σε πληθυσμούς αδέσποτων σκύλων⁴¹.

Επίσης, οι κλιματικές συνθήκες στην Ελλάδα είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των σκνιπών-διαβιβαστών. Φαίνεται πως προτιμούν πρώην αγροτικές περιοχές με ζέστη και υγρασία που αργότερα αστικοποιήθηκαν⁴². Οι συχνότερα εντοπιζόμενοι διαβιβαστές στην Ελλάδα που μπορούν να μεταδώσουν το πρωτόζωο *L. infantum* είναι οι *Phlebotomus neglectus* (*P. neglectus*), *P. tobbi* και *P. perfiliewi*³⁰.

Η λεισμανίαση είναι νόσημα υποχρεωτικής δήλωσης⁶ και τα κρούσματα καταγράφονται από το 1961 από το Υπουργείο Υγείας⁴³. Από το 1998, έχει ενταχθεί στο σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ)³⁰.

Συμπτώματα που ομοιάζουν της σπλαχνικής λεισμανίασης αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στις Σπέτσες το 1835. Έπειτα, η χρήση του DDT (p,p' - δίχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο) για τον έλεγχο των διαβιβαστών της ελονοσίας κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, μείωσε και τη συχνότητα της λεισμανίασης. Ωστόσο, τα τελευταία 40 χρόνια η νόσος επανεμφανίστηκε και είναι ενδημική στη χώρα³⁰. Κάθε χρόνο καταγράφονται κρούσματα σε όλη την Ελληνική επικράτεια, με το 50% να αναφέρεται στην περιφέρεια της Αττικής⁴³. Επίσης, η λεισμανίαση αποτελεί αναδυόμενη απειλή για τους τουρίστες καθώς έχουν εντοπιστεί περιστατικά ασθενών που ανέφεραν πρόσφατο ταξίδι στην Ελλάδα⁴¹. Πρόσφατα στην Κρήτη, παρατηρήθηκαν υποτροπές της δερματικής λεισμανίασης με αιτιολογικό παράγοντα το είδος *L. tropica*, σε ασθενείς άνω των 60 ετών που είχαν μολυνθεί κατά την παιδική τους ηλικία²⁶.

Επιπλέον, στην χώρα της Κύπρου, φαίνεται πως υπάρχουν δύο διαφορετικοί κύκλοι μετάδοσης, ένας κύκλος του πρωτοζώου *L. infantum* σε σκύλους και ένας κύκλος του πρωτοζώου *L. donovani* σε ανθρώπους που προκαλεί σπλαχνική λεισμανίαση, δερματική λεισμανίαση και Post-Kalar-Azar δερματική λεισμανίαση (Post-Kalar-Azar Dermal Leishmaniasis, PKDL). Ωστόσο, έχει αναφερθεί μικτή μόλυνση σε σκύλο που ζούσε στην ίδια περιοχή με ασθενείς με δερματική λεισμανίαση, υποδηλώνοντας πως οι κύκλοι συναντώνται²⁶.

3.2.3 Ανοσοπαθγένεια

Στα πλαίσια της συλλοίμωξης *Leishmania* - *HIV*, τα δύο αυτά παθογόνα αναπτύσσουν μια συμβιωτική σχέση με αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις, ωστόσο οι λεπτομερείς μηχανισμοί πίσω από αυτές παραμένουν ασαφείς^{39,44}.

Ο ιός *HIV*, μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση μιας λανθάνουσας λοίμωξης ή να διευκολύνει την ανάπτυξη κλινικής νόσου στην περίπτωση μιας πρωτογενούς λοίμωξης^{35,36,45}. Η σπλαχνική λεισημανίαση, μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της λανθάνουσας φάσης του ιού *HIV*³¹ προάγοντας τον πολλαπλασιασμό του και την ανάπτυξη καταστάσεων που καθορίζουν το AIDS^{23,31,44}.

Τα δύο παθογόνα εκμεταλλεύονται τα ανοσορυθμιστικά δίκτυα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή προς όφελος τους⁴⁶. Η συνύπαρξη τους στα ίδια κύτταρα, έχει αποδειχθεί πως επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση του ενός ή και των δύο³⁵. Το παράσιτο, είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό και αναπτύσσεται σε δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα^{28,46}. Αυτά τα κύτταρα, μπορούν επίσης να μολυνθούν από τον ιό *HIV* λειτουργώντας ως δεξαμενές για την επιμονή και την διάδοση του^{23,47}.

Σε ασθενείς με συλλοίμωξη παρατηρούνται μειωμένοι αριθμοί CD4+ T κυττάρων, υπερβολικές αποκρίσεις T βοηθητικών κυττάρων τύπου 2 (T helper cells type 2, Th2)³² και αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών⁴⁸.

Ο ιός *HIV*, εκμεταλλεύεται το δίκτυο κυτταροκινών που επάγεται από το παράσιτο προς όφελος του²³. *In vitro*, το παράσιτο μπορεί να πυροδοτήσει την παραγωγή TNF-α και IL-6 από λανθάνοντα μολυσμένα με τον ιό *HIV* κύτταρα, όπως CD4+ T⁴⁷, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα²³ προάγοντας την ενεργοποίηση και αναπαραγωγή του ιού^{23,49}.

Επίσης το παράσιτο, μπορεί να ενεργοποιήσει την αναπαραγωγή του ιού *HIV* σε μακροφάγα και CD4+ κύτταρα μέσω του κύριου μεμβρανικού συστατικού του, της λιποφωσφογλυκάνης (Lymphosphoglycan, LPG)⁵⁰. Σε κύτταρα μολυσμένα με το παράσιτο παρατηρείται υπερέκφραση του υποδοχέα χημειοκίνης τύπου 5 (CC Chemokine Receptor Type 5, CCR5), απαραίτητου συνυποδοχέα για την είσοδο του ιού *HIV* σε αυτά³¹.

Επιπλέον, οι ασθενείς με συλλοίμωξη έχουν υψηλά επίπεδα TNF-α στον ορό, ακόμα και κατά την λήψη θεραπείας³⁵ τα οποία έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη του ιού *HIV*⁴⁹.

Οι επιδράσεις του ιού *HIV* στο παράσιτο εξαρτώνται από την μείωση του αριθμού των CD4+ κυττάρων, τη μειωμένη παραγωγή IFN-γ³⁵, τα αυξημένα επίπεδα IL-10⁴⁸, τη δυσλειτουργία της φαγοκυττάρωσης και γενικότερα την ανοσοκαταστολή⁴⁴. Η πρωτεΐνη trans-ενεργοποιητής της μεταγραφής (Transactivator of Transcription, Tat) του ιού *HIV* μπορεί να αυξήσει την εσωτερίκευση⁴⁶ και αναπαραγωγή του παρασίτου σε κύτταρα όπου οι δύο μικροοργανισμοί αναπαράγονται ενεργά⁶². Η εξαρτώμενη από IFN-γ έκφραση του iNOS, ενδεχομένως καταστέλλεται από την επαγόμενη από την Tat παραγωγή του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β1 (Transforming Growth Factor beta 1, TGF-β1), μειώνοντας την φαγοκυττάρωση λόγω ανεπαρκούς παραγωγής NO και δημιουργώντας τελικά ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του παρασίτου⁶². Επίσης, η Tat, πιθανόν ενισχύει την πρόσληψη του παρασίτου από τα μακροφάγα μέσω της αυξημένης

επιφανειακής έκφρασης του υποδοχέα CD91 / πρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας σχετιζόμενη με υποδοχείς λιποπρωτεϊνών 1 (CD91/LRP-1), που δεσμεύει τις φωσφατιδυλοσερίνη⁴⁶.

Σε συμφωνία με *in vitro* παρατηρήσεις, υψηλό ποσοστό των ασθενών με συλλοίμωση έχει περιφερική παρασιταϊμία αντανακλώντας την ανεξέλεγκτη αναπαραγωγή του παρασίτου⁴⁷.

3.2.4 Κλινικές εκδηλώσεις

Οι κλινικές εκδηλώσεις κυμαίνονται από αυτοθεραπευόμενες δερματικές βλάβες έως απειλητική για την ζωή σπλαχνική νόσο²⁴. Κοινά χαρακτηριστικά όλων των συνδρόμων είναι ο παρασιτικός «τροπισμός», δηλαδή, η σαφής οριοθέτησή τους κάτι που παύει να ισχύει σε ασθενείς με συλλοίμωση *Leishmania - HIV*³². Στελέχη που κανονικά προσβάλλουν το δέρμα, όπως τα πρωτόζωα *L. braziliensis* και *L. mexicana*, έχουν αναγνωριστεί ως αίτια της σπλαχνικής λεισμανίασης λόγω της διαφυγής των παρασίτων από τον δερματικό ανοσολογικό φραγμό και προσβολής των εσωτερικών οργάνων. Αντίστοιχα, στελέχη που κανονικά προσβάλλουν τα σπλάχνα, όπως το πρωτόζωο *L. infantum* έχουν βρεθεί σε δερματικές βλάβες αλλά και σε φαινομενικά υγιές δέρμα^{31,32,51}. Επιπλέον, από αυτούς τους ασθενείς, έχουν απομονωθεί στελέχη που κανονικά δεν προκαλούν νόσο σε ανοσοεπαρκή άτομα συνηγορώντας υπέρ της ευκαιριακής συμπεριφοράς των παρασίτων *Leishmania spp.* και ιδιαίτερα του πρωτοζώου *L. infantum*^{31,32}.

3.2.4.1 Σπλαχνική λεισμανίαση

Η σπλαχνική λεισμανίαση είναι δυνητικά απειλητική για τη ζωή στο 95% των περιπτώσεων^{25,52} εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία. Εκδηλώνεται κυρίως με πυρετό, πανκυτταροπενία και ηπατοσπληνομεγαλία²⁸. Σε ασθενείς με συλλοίμωση μπορεί να παρατηρηθούν υψηλά επίπεδα παρασιταϊμίας, απουσία σπληνομεγαλίας και εντόπιση των παρασίτων σε άτυπες θέσεις όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας και οι πνεύμονες^{51,52}. Τα παράσιτα διαδίδονται σε όλο το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα⁵² και μολύνουν όργανα όπως ο μυελός των οστών, το ήπαρ, ο σπλήνας και οι λεμφαδένες³¹. Η ύπαρξη κριτηρίων που καθορίζουν το AIDS και η θρομβοπενία αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες θνησιμότητας²⁸.

3.2.4.2 Δερματική και βλεννογονοδερματική λεισμανίαση

Στην δερματική λεισμανίαση, παρατηρούνται βλατίδες που μεγεθύνονται σε οζίδια και εξελκώνονται³¹. Οι βλάβες που προκαλούνται από τα πρωτόζωα *L. tropica* και *L. major* αυτοθεραπεύονται σε διάστημα 3-18 μηνών. Μπορεί να παρατηρηθούν σοβαρότερες εκδηλώσεις όπως η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση, μια παραμορφωτική κατάσταση των βλεννογόνων που συνήθως προκαλείται από το πρωτόζωο *L. braziliensis*, αλλά έχει επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με *L. infantum* στην Ευρώπη³².

Σε ασθενείς με συλλοίμωση παρατηρείται αυξημένος αριθμός παρασίτων στις βλάβες, άτυπος εντοπισμός και καθυστερημένη επούλωση³¹. Η αφθονία των παρασίτων σε δερματικές βλάβες μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στην μετάδοση του παρασίτου³².

3.2.4.3 Post-Kalar-Azar Δερματική λεισμανίαση

Η PKDL εκδηλώνεται με κηλιδοβλατιδώδεις ή οζώδεις δερματικές βλάβες³¹ οι οποίες εάν δεν αντιμετωπιστούν μπορεί να παραμείνουν μολυσματικές για δεκαετίες²⁴. Εμφανίζεται μετά την επιτυχή θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης με αιτιολογικό παράγοντα το πρωτόζωο *L. donovani*, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί και σε άτομα με συλλοίμωξη *L. infantum* – HIV στην περιοχή της Μεσογείου^{24,32}.

3.2.5 HAART και Λεισμανίαση

Από το 1997, η HAART συνέβαλε στην μείωση των πρωτογενών λοιμώξεων σπλαχνικής λεισμανίασης μεταξύ των ασθενών με HIV^{35,38}. Ωστόσο, δεν φαίνεται να βελτιώνει την κλινική έκβαση της σπλαχνικής λεισμανίασης³⁵ ούτε αποτρέπει τις υποτροπές παρά την ανάκτηση των επιπέδων των CD4+ κυττάρων σε ορισμένους ασθενείς^{33,38}. Το 80% των ασθενών με συλλοίμωξη παρουσιάζει μια τουλάχιστον υποτροπή, ποσοστό υψηλότερο συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό⁴⁵. Πιστεύεται, πως παρά την κλινικά επιτυχημένη θεραπεία το παράσιτο δεν εξαλείφεται και παραμένει στον ξενιστή εφ' όρου ζωής^{32,35,52}. Η πλειοψηφία των πολλαπλών επεισοδίων σπλαχνικής λεισμανίασης οφείλεται σε υποτροπές και όχι σε επαναμολύνσεις³¹. Προγνωστικούς παράγοντες υποτροπής αποτελούν το ιστορικό υποτροπής, η μη λήψη δευτερογενούς προφύλαξης και η αποτυχία ανάκτησης φυσιολογικών επιπέδων CD4+ κυττάρων³⁷. Ο αριθμός CD4+ κυττάρων < 200/μl αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα υποτροπής και ανάπτυξης κλινικής νόσου ανεξάρτητα από την λήψη HAART ή/και δευτερογενούς προφύλαξης^{38,39}. Ωστόσο, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ασθενών που υποτροπίασαν παρά τον υψηλό αριθμό CD4+ κυττάρων⁵³.

Επίσης, ασθενείς με συλλοίμωξη, ενδέχεται να μένουν ασυμπτωματικοί λόγω της λήψης HAART^{38,44}. Έχει βρεθεί υψηλός επιπολασμός ασυμπτωματικής λοίμωξης σε σύνολο ασθενών όπου το 69,3% λάμβανε HAART⁵⁴.

3.2.6 Εργαστηριακή Διάγνωση

Οι μεγαλύτερες προκλήσεις στη διάγνωση της σπλαχνικής λεισμανίασης είναι οι ασυμπτωματικοί και οι ασθενείς με συλλοίμωξη *Leishmania* - HIV⁵⁵. Δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των εργαστηριακών τεχνικών στη διάγνωση της σπλαχνικής λεισμανίασης σε ασθενείς με συλλοίμωξη, αλλά φαίνεται πως κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων με υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα^{34,55}.

Οι διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κυρίως επί του παρόντος, είναι παρασιτολογικές, ανοσολογικές και μοριακές⁵⁶. Σε επιδημιολογικές μελέτες, συχνά χρησιμοποιείται η ξενοδιάγνωση²⁸.

Η ανίχνευση αμαστιγωτών μορφών σε βιοψία μυελού των οστών ή σπληνός με μικροσκόπηση, αποτελεί το χρυσό πρότυπο για την διάγνωση της λεισμανίασης⁵⁶. Σε ασθενείς με συλλοίμωξη, η μικροσκοπική εξέταση έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα λόγω της υψηλής παρασιταϊμίας που παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς³⁴. Ωστόσο, οι

βιοψίες είναι απειλητικές για την ζωή και σε περιπτώσεις υποτροπών προτιμάται η αξιολόγηση λιγότερο επεμβατικών δειγμάτων³¹.

Η PCR, έχει πολύ υψηλή ευαισθησία σε δείγματα μυελού των οστών αλλά μικρότερη στο περιφερικό αίμα⁵⁷. Βασίζεται σε περιοχές του πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος, όπως το DNA κινητοπλάστη (kinetoplast DNA, kDNA). Η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time – PCR, RT-PCR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θεραπευτική παρακολούθηση των ασθενών. Η ισοθερμική ενίσχυση με την μεσολάβηση βρόχου (Loop – Mediated Isothermal Amplification, LAMP), βασίζεται στην σύντομη ενίσχυση του DNA χωρίς την ανάγκη θερμοκυκλοποιητή με κύριους στόχους το 18S ριβοσωμικού RNA και τους μικροκύκλους. Έχει επικυρωθεί ως εναλλακτική μέθοδος διάγνωσης⁵⁶.

Η έμμεση ξενοδιάγνωση με την χρήση του διαβιβαστή *Phlebotomus perniciosus*, είναι μια πολύ αποτελεσματική τεχνική για την ανίχνευση παρασίτων σε ασθενείς με συλλοίμωξη. Χρησιμοποιείται δείγμα αίματος του ασθενή αποφεύγοντας τις αντιδράσεις υπερευαισθησίας που παρατηρούνται στην άμεση ξενοδιάγνωση²⁸.

3.2.6.1 Ανοσολογικές Μέθοδοι

Η ευαισθησία και ειδικότητα των ορολογικών διαγνωστικών τεχνικών διαφέρει ανάλογα με την μέθοδο, το χρησιμοποιούμενο αντιγόνο (τύπος, πηγή, καθαρότητα), τα όρια (για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα θετικό), την γεωγραφική θέση της μελέτης (λόγω της ποικιλομορφίας των παρασίτων) και την διατροφική και ανοσολογική κατάσταση των ασθενών (ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων)^{52,56,57}.

Σε ασθενείς με συλλοίμωξη, παρατηρούνται ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα λόγω της εξασθένησης της χυμικής απόκρισης και συνεπώς της χαμηλής παραγωγής αντισωμάτων^{34,56}. Έχει εκτιμηθεί πως τα επίπεδα των ειδικών αντι-*Leishmania* αντισωμάτων σε ασθενείς με *HIV* είναι έως και 50 φορές χαμηλότερα και περίπου το 40% των ασθενών δεν έχει ανιχνεύσιμα αντισώματα^{28,31}.

Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι ολόκληροι ή διαλυτοποιημένοι προμαστιγώτες, επιχρίσματα οργάνων με αμαστιγωτές μορφές και ανασυνδυασμένα αντιγόνα. Η αντιγονική ποικιλομορφία των παρασίτων μπορεί να προκαλέσει διαφορετικές ανοσοαποκρίσεις στον ξενιστή οι οποίες δεν στρέφονται έναντι των αντιγόνων που μπορεί να χρησιμοποιεί μια μέθοδος⁶³. Αξίζει να σημειωθεί, πως η απόδοση των περισσότερων εμπορικά διαθέσιμων kit, δεν είναι καλά καθορισμένη ιδιαίτερα μεταξύ ασθενών με *HIV*⁵⁸.

Οι ανοσολογικές ορολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι DAT, ELISA, ανοσοφθορισμός και Western Blot. Επίσης, οι μέθοδοι απελευθέρωσης κυτταροκινών είναι χρήσιμες για την διάγνωση ασυμπτωματικών ασθενών.

Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση εκτίμησε τις συνολικές ευαισθησίες και ειδικότητες αυτών των μεθόδων, σε ασθενείς με συλλοίμωξη *Leishmania – HIV*. Αυτές, υπολογίστηκαν αντίστοιχα στο 81% και 90% για την DAT, 66% και 90% για την ELISA, 51% και 93% για τον ανοσοφθορισμό και 84% και 82% για την Western Blot⁵⁷.

Η δοκιμασία άμεσης συγκόλλησης (Direct Antiglobulin Test, DAT), βασίζεται στην συγκόλληση μεταξύ του αντιγόνου και του αντισώματος και είναι χρήσιμη για την ανίχνευση ασυμπτωματικών ασθενών με συλλοίμωξη⁵⁶.

Η ELISA, είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική αλλά με μεταβλητή ειδικότητα λόγω των χρησιμοποιούμενων αντιγόνων⁵⁵. Πιστεύεται πως τα ανασυνδυασμένα αντιγόνα προσφέρουν υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα στην μέθοδο από τα διαλυτά⁵⁶. Το καλύτερα χαρακτηρισμένο, είναι το rK39 (ανασυνδυασμένο αντιγόνο 39 αμινοξέων κινεσίνης) που εκφράζεται σε αμαστιγωτές μορφές του πρωτοζώου *L. infantum*⁵². Παρατηρείται μεγάλος αριθμός ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων⁵⁵, ενώ οι μέθοδοι που βασίζονται σε ακατέργαστα αντιγόνα έχουν δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενης⁵⁶ αντιδραστικότητας με μυκοβακτηρίδια⁵⁹.

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έχει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, ιδιαίτερα στην αραίωση 1/80⁵⁹. Οι επίμονοι και υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων, μπορεί να αποτελέσουν προγνωστικούς παράγοντες υποτροπής. Τα χρησιμοποιούμενα αντιγόνα μπορεί να είναι καλλιέργειες προμαστιγωτών ή επιχρίσματα οργάνων με αμαστιγωτές μορφές⁵⁹.

Η ανοσοαποτύπωση, αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση ενός θετικού αποτελέσματος, που λήφθηκε από μια άλλη ορολογική εξέταση⁵⁹. Ο συνδυασμός της με άλλες ορολογικές μεθόδους είναι πολύτιμος για την διάγνωση της σπλαχνικής λεισμανίασης σε ασθενείς με συλλοίμωξη⁵¹, αν και συχνά παρατηρείται ασθενές σήμα ζωνών²⁸. Το αντιγονικό συστατικό των 16kDa έχει θεωρηθεί ως η πιο ευαίσθητη και ειδική διαγνωστική ζώνη, ακόμα και μεταξύ ασθενών με συλλοίμωξη⁵⁷. Σε μελέτη στην Νίκαια της Γαλλίας, βρέθηκαν αντισώματα τα οποία αντιδρούσαν με τα αντιγόνα 14kDa ή/και 18kDa του πρωτοζώου *L. infantum* σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με συλλοίμωξη. Μέρος αυτών των ασθενών ανέπτυξε συμπτωματική σπλαχνική λεισμανίαση κατά την διάρκεια της παρακολούθησης, συνεπώς, με την ανοσοαποτύπωση, μπορεί επίσης να προβλεφθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης συμπτωματικής νόσου⁵⁹.

Επιπλέον, για τον καθορισμό του προφίλ κυτταροκινών σε ασθενείς με σπλαχνική λεισμανίαση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δοκιμασίες απελευθέρωσης κυτταροκινών με *ex vivo* διέγερση κυττάρων περιφερικού αίματος. Από το 2017, οι δοκιμασίες κυτταροκινών/χημειοκινών περιλαμβάνονται στις κατευθυντήριες οδηγίες του ΠΟΥ για την διαχείριση ανοσοεπαρκών ασθενών με λεισμανίαση. Φαίνεται, πως αυτές οι δοκιμασίες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό ειδικών βιοδεικτών για την λεισμανίαση όπως IFN-γ και IL-2 σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με συλλοίμωξη *Leishmania* – HIV⁴⁴.

3.3 Human Immunodeficiency Virus

3.3.1 Γενικά στοιχεία

Το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1981 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Σε μια ομάδα ασθενών, παρατηρήθηκαν ασυνήθιστες ευκαιριακές λοιμώξεις ενώ κοινό χαρακτηριστικό τους ήταν η κατακόρυφη μείωση του αριθμού των CD4+ Τ κυττάρων⁶⁰. Στην συνέχεια, βρέθηκε, πως ο αιτιολογικός παράγοντας του AIDS είναι ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (*Human Immunodeficiency Virus, HIV*). Ο ιός *HIV* ανήκει στην οικογένεια των *Ρετροϊών (Retroviridae)* και στο γένος των *Φακοϊών (Lentiviridae)*. Μεταδίδεται με την σεξουαλική επαφή, το μολυσμένο αίμα και από την μητέρα στο νεογνό ενδεχομένως μέσω μολυσμένων κυττάρων όπως μακροφάγα, δενδριτικά και λεμφοκύτταρα⁶⁰. Ο ιός *HIV-2* είναι λιγότερο παθογόνος στον άνθρωπο από τον ιό *HIV-1*⁶⁰.

Ο ιός *HIV* έχει σχήμα σφαιρικό και αποτελείται από περίβλημα (ϊικός φάκελος) ενώ έχει διάμετρο 80-120 nm⁶¹. Ο ιικός φάκελος του ιού, αποκτάται από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή κατά την εκβλάστηση. Σε αυτόν, ανευρίσκονται μεταξύ άλλων οι γλυκοπρωτεϊνικές (glycoproteins, gp) προεκβολές του ιού, gp120, gp41. Με την σύνδεση της gp120 στην gp41 δημιουργείται ένας υποδοχέας για την πρόσδεση στα CD4 των κυττάρων ξενιστών⁶⁰. Το γονιδίωμά του, αποτελείται από δύο αντίγραφα ενός μονόκλωνου RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας⁶¹ τα οποία είναι συνδεδεμένα με δύο μόρια αντίστροφης μεταγραφάσης (εξαρτώμενη από RNA, DNA πολυμεράση). Εντοπίζονται επίσης μια πρωτεάση, μια ιντεργκράση και δύο αντίγραφα μεταφορικού RNA^{60,61}.

Μετά την είσοδο του ιού *HIV* στο κύτταρο ξενιστή, το ιικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα σε dsDNA από την αντίστροφη μεταγραφάση⁶⁰. Το ιικό DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή δημιουργώντας τον προϊό ο οποίος εκφράζεται για τον σχηματισμό και την απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων. Εναλλακτικά, παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση⁶⁰.

Η προτίμηση για τα CD4+ κύτταρα βασίζεται στην υψηλή συγγένεια της πρωτεΐνης ενν (envelope) του περιβλήματος του ιού *HIV-1* και του CD4. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση από μόνη της δεν αρκεί για την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή και απαιτείται ένας συν-υποδοχέας⁶⁰. Ο κύριος καθοριστικός παράγοντας της παθογένειας του ιού *HIV*, είναι ο τροπισμός του για CD4+ κύτταρα ο οποίος καθορίζεται από τον συν-υποδοχέα που χρησιμοποιεί για την είσοδο του σε αυτά⁶¹. Κάποια στελέχη *HIV-1* μολύνουν επιλεκτικά Τ κύτταρα (T – τροπικά στελέχη) μέσω του συν-υποδοχέα CXCR4 ενώ άλλα προτιμούν τα μακροφάγα (M – τροπικά στελέχη) μέσω του συν-υποδοχέα CCR5⁶⁰.

Η οξεία φάση της λοίμωξης, ξεκινάει με την σύνδεση του ιού με τροπισμό M, στα CD4+ κύτταρα με υποδοχείς χημειοκινών CCR5 όπως τα κύτταρα της γραμμής μονοκυττάρων-μακροφάγων, μέσω γλυκοπρωτεϊνικών ακάνθων, που αποτελούν τριμερή μορίων gp120 και gp41. Επίσης, αυτά τα κύτταρα μπορούν να λειτουργήσουν ως δεξαμενές για τη διάδοση του ιού *HIV* με την μέθοδο του «Δούρειου ίππου»⁶¹. Ο ιός *HIV*, μπορεί να συνδεθεί στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων και να διασπαρθεί στα λεμφικά όργανα μολύνοντας τα CD4+ Τ κύτταρα⁶⁰. Τα συμπτώματα της οξείας φάσης, εμφανίζονται 2 με 4 εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση και μπορεί να ομοιάζουν με αυτά της γρίπης και της λοιμώδους

μονοπυρήνωσης. Παρατηρείται πυρετός, λεμφαδενοπάθεια, άσηπτη μηνιγγίτιδα και εξάνθημα⁶¹. Επίσης, ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα ιαιμίας, ενισχυμένη παραγωγή μη ειδικών IgG και IgA και μειωμένη σύνθεση IgM⁶⁰.

Στην συνέχεια, τα επίπεδα του ιού στο πλάσμα σταθεροποιούνται και ακολουθεί η χρόνια (λανθάνουσα) φάση της λοίμωξης, όπου ο ασθενής δεν έχει συμπτώματα αλλά ο ιός εξακολουθεί να αναπαράγεται στους λεμφαδένες⁶⁰. Σε αυτή την φάση της λοίμωξης, παρατηρείται μετάλλαξη στο γονίδιο *env* για την *gp120*. Έτσι ο M-τροπισμός, αλλάζει σε T-τροπισμό με επακόλουθη την σύνδεση της *gp120* του T-τροπικού ιού σε CD4+ κύτταρα διαμέσου του υποδοχέα χημειοκίνης CXCR4⁶¹. Αυτή η μετάλλαξη, αλλάζει την αντιγονικότητα του ιού με επακόλουθη την αποφυγή της κάθαρσης από αντισώματα. Αν και τα επίπεδα του ιού στο αίμα σταδιακά μειώνονται, ο πολλαπλασιασμός του συνεχίζει να λαμβάνει χώρα στους λεμφαδένες και ο αριθμός των CD4+ κυττάρων μειώνεται προοδευτικά έως την αδυναμία υποστήριξης της αντίκτικης δράσης των CD8+ T κυττάρων⁶¹. Ακολουθεί ανεξέλεγκτη αύξηση των επιπέδων του T-τροπικού ιού στο αίμα, κατακόρυφη μείωση των CD4+ T κυττάρων, καταστροφή της δομής των λεμφαδένων και τελικά περιορισμός της ικανότητας ενεργοποίησης και ελέγχου της ανοσολογικής απόκρισης⁶¹. Τα CD4+ κύτταρα, θανατώνονται με άμεση κυτταρόλυση από τον ιό *HIV* και με κυτταροτοξική κυτταρόλυση από T κύτταρα. Επίσης σε αρκετά κύτταρα παρατηρείται πυρόπτωση, ένας τύπος φλεγμονώδους κυτταρικού θανάτου⁶¹. Ο χρόνος ημιζωής ενός ενεργά μολυσμένου CD4+ T κυττάρου είναι μικρότερος από 1,5 μέρες⁶⁰.

Η έναρξη των συμπτωμάτων συνήθως παρατηρείται 8 χρόνια μετά την αρχική μόλυνση⁶⁰ και αφού ο αριθμός των CD4+ T κυττάρων πέσει κάτω από 500/μl και αυξηθούν τα επίπεδα του ιού και της πρωτεΐνης p24 στο αίμα⁶¹. Το AIDS, καθορίζεται από πτώση του αριθμού των CD4+ T κυττάρων κάτω από 200/μl και ιικό φορτίο μεγαλύτερο από 75000 αντίγραφα/ml. Χαρακτηρίζεται από λεμφαδενοπάθεια, εξασθένηση των αντιδράσεων υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου⁶⁰, ευκαιριακές λοιμώξεις, κακοήθειες, απισχναντικό σύνδρομο (απώλεια βάρους και διάρροια) και επιδράσεις στο ΚΝΣ, όπως άνοια⁶¹. Επίσης, παρατηρείται αδυναμία πολλαπλασιασμού B κυττάρων ειδικών για τον ιό *HIV* ενώ μπορεί να μην υπάρχουν ανιχνεύσιμα αντισώματα έναντι αυτού⁶⁰.

Όσον αφορά την εργαστηριακή διάγνωση, οι ορολογικές εξετάσεις δεν μπορούν να ανιχνεύσουν πρόσφατη λοίμωξη. Αυτή διαγιγνώσκεται με μοριακές τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση υψηλών επιπέδων του ιικού RNA στο αίμα, του αντιγόνου p24 και του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης⁶¹. Αντισώματα έναντι του ιού *HIV*, παράγονται μετά από 4 – 8 εβδομάδες αλλά μπορεί να χρειαστούν έως και 6 μήνες. Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού *HIV*, γίνεται με ELISA και ανοσοαποτύπωση. Η ανοσοαποτύπωση αποτελεί επιβεβαιωτική μέθοδο και ανιχνεύει αντισώματα έναντι ιικών αντιγόνων (p24 ή p31) και των γλυκοπρωτεϊνών *gp41*, *gp120/160*⁶¹.

Σήμερα, η θεραπεία έναντι του ιού *HIV* χορηγείται με τον συνδυασμό διάφορων αντι-ιικών φαρμάκων (πχ Efavirenz, tenofovir, emtricitabine) με τον όρο υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκή θεραπεία HAART⁶¹.

4. Πειραματικό Μέρος

4.1 Σκοπός

Σκοπός της ερευνητικής διπλωματικής εργασίας είναι η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι πρωτόζωων παρασίτων, σε ορούς θετικών στον ιό *HIV* ασθενών. Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν επαρκή διαθέσιμα δεδομένα για τον επιπολασμό πρωτόζωων παρασίτων σε ασθενείς με *HIV*.

4.2 Υλικά – Μέθοδοι

4.2.1 Δείγματα ορών

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες αυτής της ερευνητικής εργασίας, αποτελούν ευγενική παραχώρηση του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος κατά το χρονικό διάστημα 2019-2020. Όλα τα δείγματα ανήκουν σε άτομα διαγνωσμένα για πρώτη φορά με *HIV*, τα οποία δεν είχαν λάβει θεραπεία. Διερευνήθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων έναντι πρωτόζωων παρασίτων με ανοσολογικές μεθόδους. Η αποθήκευση τους έγινε στους -20 °C σε κουτιά φύλαξης ορών σε όρθια θέση, αποφεύγοντας την επαναλαμβανόμενη απόψυξη και ψύξη.

4.2.2 Σχεδιασμός μελέτης

Το πειραματικό μέρος της ερευνητικής διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Συνολικά, 81 δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτόζωου *T. gondii* και 66 δείγματα για την παρουσία αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτόζωου *L. infantum* εφαρμόζοντας τις δοκιμασίες του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ανοσοαποτύπωσης. Παράλληλα, τηρήθηκαν αυστηρά οι κανόνες βιοασφάλειας και εφαρμόστηκαν ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την προστασία του χειριστή, της κοινότητας, του περιβάλλοντος και την διασφάλιση της ποιότητας του εργαστηριακού αποτελέσματος. Η απόρριψη των μολυσματικών αποβλήτων έγινε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) και συγκεκριμένα το έντυπο «Αρχές και μεθοδολογία για την εργαστηριακή διάγνωση της *HIV* λοίμωξης – 2020» (σελίδες 6 έως 8).

4.2.3 Αρχές Ανοσολογικών Μεθόδων

4.2.3.1 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Τα κοιλώματα μιας αντικειμενοφόρου πλάκας ανοσοφθορισμού, έχουν επιστρωθεί με κύτταρα ή ιστούς και επωάζονται με το εξεταζόμενο βιολογικό υγρό-δείγμα. Τα ειδικά αντισώματα, τα οποία θα βρίσκονται στο κλινικό δείγμα του ασθενούς προσδένονται στους αντιγονικούς επιτόπους μέσω των μεταβλητών περιοχών τους και σχηματίζεται το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα χρωστική, είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) η οποία εκπέμπει φθορισμό λαμπρού πράσινου χρώματος. Ο ανοσοφθορισμός, οπτικοποιείται με μικροσκόπιο εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας στο οποίο η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στο φάσμα του υπεριώδους μετατρέπεται σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στο φάσμα του ορατού. Η υπεριώδης ακτινοβολία, αποτελεί τη διεγείρουσα ακτινοβολία που θα προσπέσει στο παρασκεύασμα της αντικειμενοφόρου πλάκας ανοσοφθορισμού. Έτσι, η FITC θα εκπέμψει ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος από τη διεγείρουσα υπεριώδη ακτινοβολία. Ο αντικειμενικός φακός, θα συγκεντρώσει το εκπεμπόμενο φως, και το αποτέλεσμα τελικά θα οπτικοποιηθεί μέσω των προσοφθάλμιων φακών. Στην μικροσκοπική αξιολόγηση ενός παρασκευάσματος, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί ο παρατηρούμενος τύπος φθορισμού. Ο τύπος φθορισμού μπορεί να είναι μεταξύ άλλων περιφερικός, ομοιόμορφος ή στικτός. Η μέθοδος είναι ποιοτική, αλλά μπορεί να γίνει και ημιποσοτική με τον προσδιορισμό του τίτλου τελικού σημείου που θα ληφθεί με διαδοχικές αραιώσεις του ορού. Η μεγαλύτερη αραιώση στην οποία παρατηρείται θετικό αποτέλεσμα, αποτελεί τον τίτλο τελικού σημείου.

4.2.3.2 Western Blot

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, εφαρμόζεται ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS-PAGE). Μετά τον ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολουθεί επώαση με πολυκλωνικά αντισώματα και στη συνέχεια, επώαση με αντι-ισοτυπικά αντισώματα συζευγμένα με ένζυμο (π.χ. αλκαλική φωσφατάση). Προστίθεται ένα χρωμογόνο υπόστρωμα και ανιχνεύεται η ενζυμική δράση. Η μέθοδος είναι ποιοτική και ένα θετικό αποτέλεσμα καθορίζεται από το σχηματισμό ειδικών και διακριτών πρωτεϊνικών ζωνών πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

4.2.4 Εργαστηριακές τεχνικές

4.2.4.1 Ανίχνευση IgG έναντι του πρωτοζώου *T. gondii*

Έμμεσος Ανοσοφθορισμός (Indirect Immunofluorescence, IIF). Για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* με τη μέθοδο του IIF, χρησιμοποιήθηκαν αντικειμενοφόρες πλάκες ανοσοφθορισμού επιστρωμένες με ταχυζώϊτες. Όλα τα αντιδραστήρια (οι αντικειμενοφόρες πλάκες των 5 θέσεων, ο θετικός μάρτυρας, ο αρνητικός μάρτυρας, το σύζευγμα, η χρωστική Evans blue) και οι προς εξέταση οροί αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους. Παρασκευάζεται 1L ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Κάθε θέση της αντικειμενοφόρου πλάκας αντιστοιχεί σε έναν υπό εξέταση ορό (αραίωση 1/64). Οι οροί, αφού έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου επαναιωρούνται με περιδίνηση. Προστίθενται 20μl από κάθε αραιωμένο ορό και 20μl από κάθε μάρτυρα σε ξεχωριστές θέσεις. Ακολουθεί επώαση σε θάλαμο υγρασίας για 30 λεπτά της ώρας. Ακολουθεί η απομάκρυνση των μη ειδικών και της περίσσειας των ειδικών μη προσδεδεμένων αντισωμάτων με 3 εκπλύσεις με PBS για 15 λεπτά (5 λεπτά της ώρας/έκπλυση). Τα πλακάκια μεταφέρονται σε θάλαμο υγρασίας και σε κάθε θέση προστίθενται 20μl συζεύγματος σημασμένου με FITC. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά της ώρας. Για την απομάκρυνση της περίσσειας, πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις για 15 λεπτά (5 λεπτά της ώρας/έκπλυση) με PBS. Προστίθεται στερεωτικό και τοποθετείται καλυπτρίδα. Πραγματοποιείται μικροσκοπική αξιολόγηση του παρασκευάσματος σε μικροσκόπιο φθορισμού (X400). Ένα θετικό αποτέλεσμα, καθορίζεται από την παρουσία φθορισμού της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος του ταχυζώϊτη.

Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting). Για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκαν λωρίδες νιτροκυτταρίνης με ακινητοποιημένα αντιγόνα του πρωτοζώου *T. gondii*. Όλα τα αντιδραστήρια (οι λωρίδες, το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ορού, το σύζευγμα, το υπόστρωμα ο θετικός μάρτυρας) και οι προς εξέταση οροί αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους. Το ρυθμιστικό διάλυμα εκπλύσης παρασκευάζεται σε αραίωση 1/10 με απεσταγμένο νερό. Αρχικά, οι λωρίδες επώάζονται για 2 λεπτά της ώρας σε 1,2ml ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης ορού. Προστίθενται 10μl ορού στην αντίστοιχη λωρίδα. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση για 90 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις (3 λεπτά της ώρας/έκπλυση) με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκπλύσης σε αραίωση 1/10 ανά λωρίδα. Προστίθενται 1,2 ml/ανά λωρίδα διαλύματος αντι-IgG αντισωμάτων συζευγμένων με αλκαλική φωσφατάση. Πραγματοποιείται επώαση (60 λεπτά της ώρας, θερμοκρασία δωματίου). Ακολουθούν 3 εκπλύσεις (3 λεπτά της ώρας/έκπλυση) με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκπλύσης σε αραίωση 1/10 ανά λωρίδα. Προστίθενται 1,2 ml υποστρώματος ανά λωρίδα. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 2ml απεσταγμένου νερού. Οι λωρίδες αφήνονται να στεγνώσουν και αξιολογείται το αποτέλεσμα. Ένα θετικό αποτέλεσμα, ορίζεται εάν αναγνωριστούν τρεις τουλάχιστον από τις ακινητοποιημένες στις λωρίδες της νιτροκυτταρίνης πρωτεΐνες του παρασίτου (30kDa, 31kDa, 33kDa, 40kDa, 45kDa συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης 30kDa).

4.2.4.2 Ανίχνευση IgG έναντι του πρωτοζώου *L. Infantum*

Έμμεσος Ανοσοφθορισμός (Indirect Immunofluorescence, IIF). Για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG με την μέθοδο του IIF χρησιμοποιήθηκαν αντικειμενοφόρες πλάκες ανοσοφθορισμού των 10 θέσεων επιστρωμένες με προμαστιγώτες *L. infantum*. Όλα τα αντιδραστήρια και οι προς εξέταση οροί αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους. Οι οροί, αφού έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου επανααιωρούνται με περιδίνηση. Πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις 1/40 και 1/80 σε PBS. Προστίθενται 20μl από κάθε αραιώση και 20μl από κάθε μάρτυρα σε ξεχωριστές θέσεις. Ακολουθεί επώαση σε θάλαμο υγρασίας για 30 λεπτά της ώρας στους 37°C. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις (5 λεπτά της ώρας/έκπλυση) με PBS. Προστίθενται 20 μl διαλύματος αντι-IgG αντισωμάτων σημασμένων με FITC και χρωστικής Evans Blue. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά της ώρας σε θάλαμο υγρασίας στους 37°C. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις (5 λεπτά της ώρας/έκπλυση) με PBS. Προστίθεται στερεωτικό και τοποθετείται καλυπτρίδα. Ακολουθεί εξέταση των πλακών σε μικροσκόπιο φθορισμού (X400). Ένα θετικό αποτέλεσμα, ορίζεται από την παρουσία περιφερειακού και κυτταροπλασματικού φθορισμού, στον προμαστιγώτη.

Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting). Για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτοζώου *L. infantum* χρησιμοποιήθηκαν λωρίδες νιτροκυτταρίνης με ακινητοποιημένα αντιγόνα *L. infantum*. Όλα τα αντιδραστήρια και οι προς εξέταση οροί αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την χρήση τους. Το ρυθμιστικό διάλυμα εκπλύσης παρασκευάζεται σε αραιώση 1/10 με απεσταγμένο νερό. Αρχικά, οι λωρίδες επωάζονται για 2 λεπτά της ώρας σε 1,2ml ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης ορού. Προστίθενται 10μl ορού στην αντίστοιχη λωρίδα. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση για 90 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις (3 λεπτά της ώρας/έκπλυση) με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκπλύσης σε αραιώση 1/10 ανά λωρίδα. Προστίθενται 1,2 ml/ανά λωρίδα διαλύματος αντι-IgG αντισωμάτων συζευγμένων με αλκαλική φωσφατάση. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση για 60 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις (3 λεπτά της ώρας/έκπλυση) με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε αραιώση 1/10 ανά λωρίδα. Προστίθενται 1,2 ml υποστρώματος ανά λωρίδα. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 2ml απεσταγμένου νερού. Οι λωρίδες αφήνονται να στεγνώσουν και αξιολογείται το αποτέλεσμα. Ένα θετικό αποτέλεσμα, ορίζεται εάν αναγνωριστούν οι ακινητοποιημένες στις λωρίδες της νιτροκυτταρίνης πρωτεΐνες του παρασίτου 14kDa ή/και 16kDa.

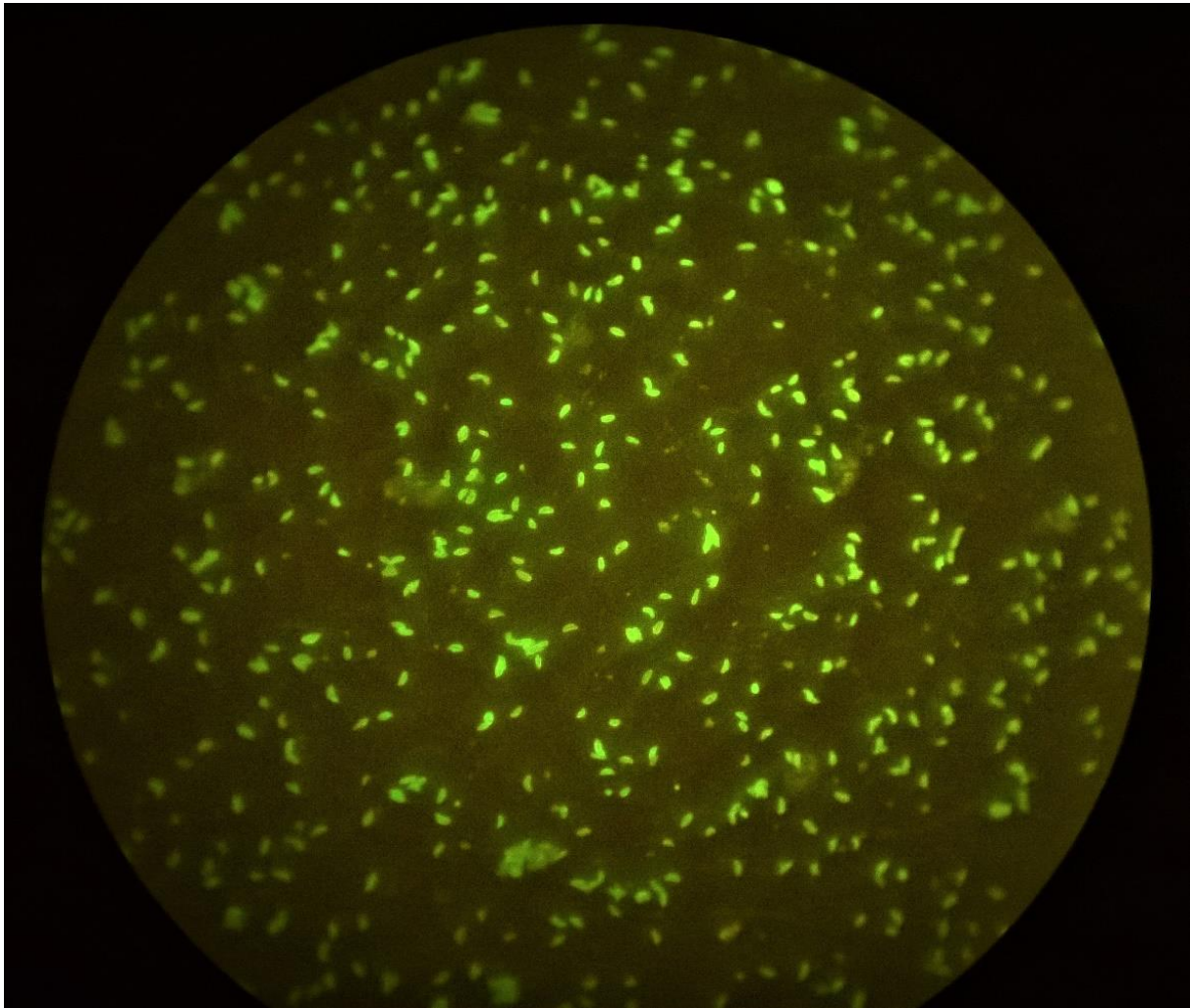
4.3 Δήλωση Ηθικής

Η έρευνα έχει λάβει έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής με αριθμό πρωτοκόλλου 1032208/18-12-2020, σύμφωνα με την οποία παρελήφθησαν οι υπό εξέταση οροί.

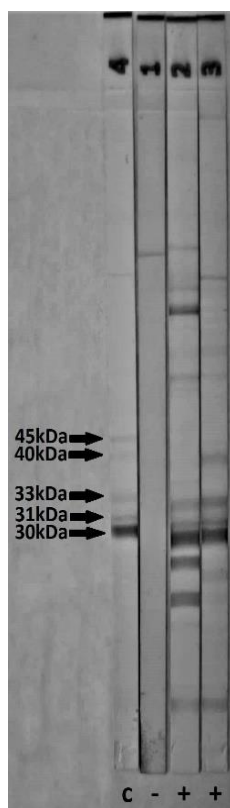
4.4 Αποτελέσματα

4.4.1 Συλλοίμωξη *T. gondii* – HIV

Εξετάστηκαν 81 οροί ασθενών θετικών στον ιό *HIV* για την παρουσία ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτοζώου *T. gondii*. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 40,16 έτη. Το 67,9% επί των εξετασθέντων ασθενών ήταν άνδρες και το 32,1% ήταν γυναίκες. Το 51,9% είχε Ελληνική εθνικότητα και το 48,1% είχε ξένη εθνικότητα. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν με τις μεθόδους του IIF και της ανοσοαποτύπωσης. Με τη μέθοδο του IIF, βρέθηκαν θετικά για την παρουσία αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* τα 53 δείγματα (εικόνα 3) από τα 81 δείγματα (θετικότητα 65,4%). Με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, βρέθηκαν θετικά τα 45 δείγματα (εικόνα 4) από τα 81 (θετικότητα 55,6%). Το 55,6% επί των εξετασθέντων ορών ήταν θετικό για αντισώματα IgG έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* και με τις δύο μεθόδους.



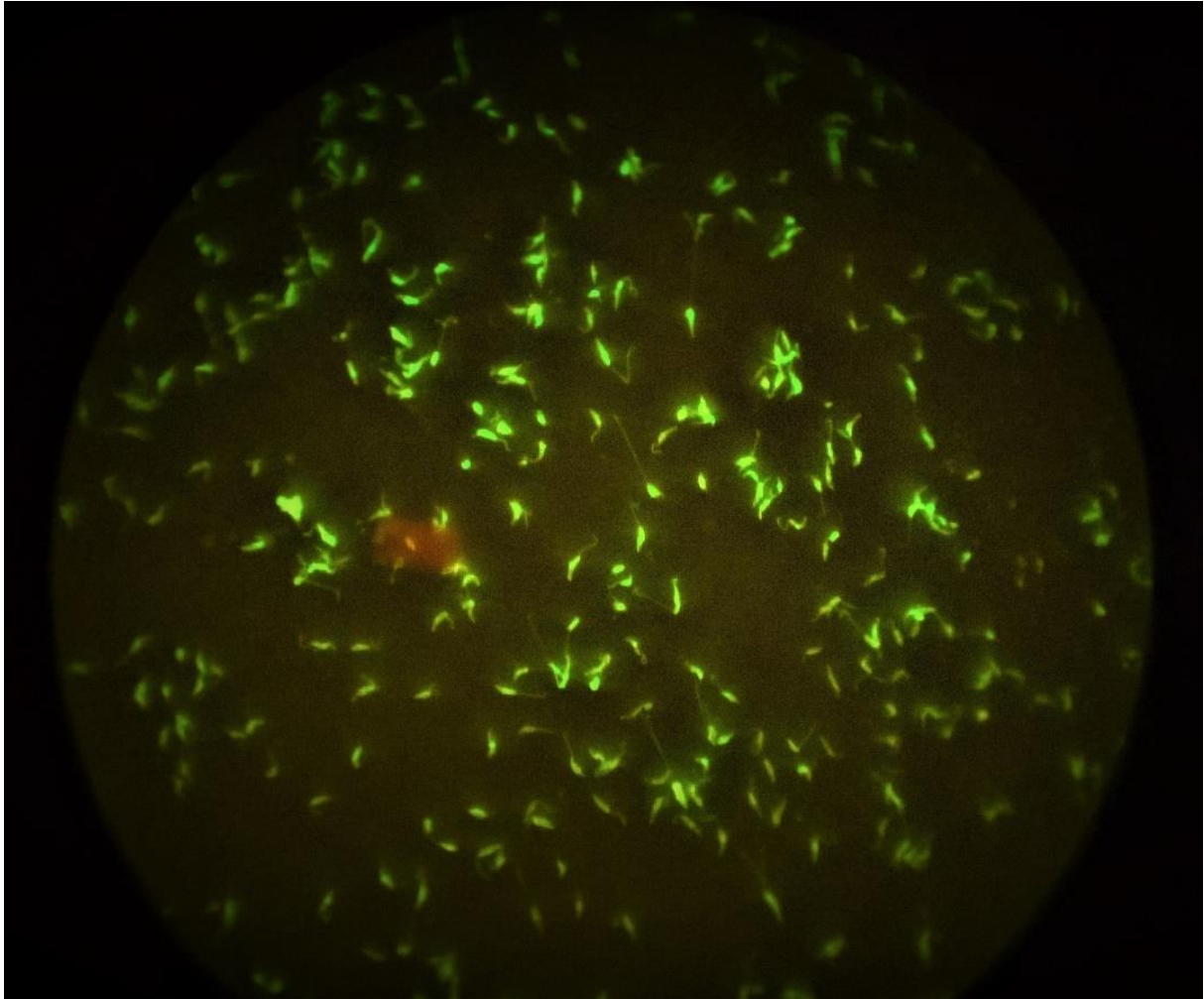
Εικόνα 3. Εφαρμογή της δοκιμασίας IIF σε ταχυζώϊτες *T. gondii*. Παρατήρηση της φθορίζουσας ουσίας πάνω στο στρώμα των συνδεδεμένων ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων του ορού ασθενούς *HIV+*. Παρατηρείται σύνδεση σε ομόλογους επιτόπους της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος. X400



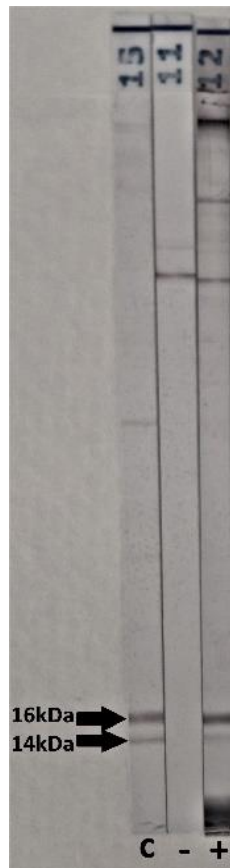
Εικόνα 4. Έλεγχος της σύνδεσης αντισωμάτων έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* σε αποτυπώσεις μεμβράνης *T. gondii* σε λωρίδες νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Από αριστερά προς τα δεξιά : Θετικός Μάρτυρας (λωρίδα 4) όπου παρατηρείται σύνδεση των αντισωμάτων έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* με τις ζώνες πρωτεϊνών μοριακού βάρους 30kDa, 31kDa, 33kDa, 40kDa και 45kDa, Δείγμα 1 (λωρίδα 1) Αρνητικό αποτέλεσμα, Δείγμα 2 (λωρίδα 2) Θετικό Αποτέλεσμα σύνδεσης των αντισωμάτων έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* με τις ζώνες πρωτεϊνών μοριακού βάρους 30kDa, 31kDa και 33kDa, Δείγμα 3 (λωρίδα 3) Θετικό Αποτέλεσμα σύνδεσης των αντισωμάτων έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* με τις ζώνες πρωτεϊνών μοριακού βάρους 30kDa, 31kDa, 33kDa και 40kDa.

4.4.2 Συλλοίμωξη *L. infantum* – HIV

Εξετάστηκαν 66 οροί ασθενών θετικών στον ιό HIV για την παρουσία ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτοζώου *L. infantum*. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 40 έτη. Το 71,2% επί των εξετασθέντων ασθενών ήταν άνδρες και το 28,8% ήταν γυναίκες. Το 57,8% είχε ξένη εθνικότητα και το 42,4% Ελληνική εθνικότητα. Όλα τα δείγματα, εξετάστηκαν με τις μεθόδους του IIF και της ανοσοαποτύπωσης. Με τη μέθοδο του IIF, βρέθηκαν θετικά για την παρουσία αντισωμάτων IgG έναντι του πρωτοζώου *L. infantum* τα 16 (εικόνα 5) από τα 66 δείγματα (θετικότητα 24,2%). Με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, βρέθηκαν θετικά τα 10 (εικόνα 6) από τα 66 δείγματα (θετικότητα 15,2%). Το 15,2% επί των εξετασθέντων ορών ήταν θετικό για αντισώματα IgG έναντι του πρωτοζώου *L. infantum* και με τις δύο μεθόδους.



Εικόνα 5. Εφαρμογή της δοκιμασίας IIF σε προμαστιγωτές μορφές παρασίτων *L. infantum*. Παρατήρηση της φθορίζουσας ουσίας πάνω στο στρώμα των συνδεδεμένων ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων του ορού ασθενούς *HIV+*. Παρατηρείται σύνδεση σε ομόλογους επίτοπους της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος. Χ400



Εικόνα 6. Έλεγχος της σύνδεσης αντισωμάτων έναντι του πρωτοζώου *L. infantum* σε αποτυπώσεις μεμβράνης *L. infantum* σε λωρίδες νιτροκυτταρίνης με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Από αριστερά προς τα δεξιά : Θετικός Μάρτυρας όπου παρατηρείται σύνδεση των αντισωμάτων έναντι του πρωτοζώου *L. infantum* με τις ζώνες πρωτεϊνών μοριακού βάρους 14kDa και 16kDa, Δείγμα 11 (λωρίδα 11) Αρνητικό Αποτέλεσμα, Δείγμα 12 (λωρίδα 12) Θετικό Αποτέλεσμα σύνδεσης των αντισωμάτων έναντι του πρωτοζώου *T. gondii* με τις ζώνες πρωτεϊνών μοριακού βάρους 14kDa και 16kDa.

4.4.3 *L. infantum* – *T. gondii* – HIV

Σε 9 δείγματα ορού ασθενών HIV+, βρέθηκαν ειδικά αντι-*L. infantum* και αντι-*T. gondii* IgG αντισώματα.

5. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Θα πρέπει να σημειωθεί, πως ο προσδιορισμός των αντισωμάτων έγινε σε ορούς ασθενών θετικών στον ιό HIV. Σε αυτούς τους ασθενείς, παρατηρείται εξασθένηση της ανοσολογικής απόκρισης, η οποία συνεπάγεται με ποσοτικές και ποιοτικές επιδράσεις στην παραγωγή των αντισωμάτων. Στην ανοσοαποτύπωση, η ασθενής ανοσολογική απόκριση έγινε εμφανής με την εμφάνιση ζωνών ασθενούς έντασης σε κάποιες περιπτώσεις όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες²⁸.

Όσον αφορά τη συλλοίμωση *T. gondii* – *HIV*, ανιχνεύτηκε σημαντικός αριθμός περιπτώσεων υπογραμμίζοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ενεργής εγκεφαλικής τοξοπλάσμωσης και ανάπτυξης σοβαρής κλινικής νόσου που εκδηλώνεται σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Γενικά, λίγες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την παρουσία του πρωτοζώου *T. gondii* σε θετικούς στον ιό *HIV* ασθενείς παγκοσμίως. Παρατηρείται εξαιρετικά μεγάλη διακύμανση μεταξύ των χωρών και ο πραγματικός επιπολασμός ενδέχεται να είναι υποεκτιμημένος¹³.

Στην Ελλάδα, πιστεύεται πως η επίπτωση της συλλοίμωσης του πρωτοζώου *L. infantum* με τον ιό *HIV* είναι σπάνια καθώς έχει καταγραφεί μικρός αριθμός περιπτώσεων^{5,6}. Στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής διπλωματικής εργασίας ανιχνεύτηκε σημαντικός αριθμός ασθενών με συλλοίμωση *L. infantum* – *HIV*, συγκριτικά με τα τρέχοντα δημοσιευμένα δεδομένα αντίστοιχων μελετών⁵.

Σε μελέτη στη Γαλλία, η ανίχνευση αμαστιγωτών μορφών σε δείγματα προερχόμενα από παρακέντηση μυελού των οστών έγινε σε 47 περιπτώσεις συλλοίμωσης *Leishmania* – *HIV*. Με έμμεσο ανοσοφθορισμό και ELISA ανιχνεύτηκαν αντισώματα στο 55% των ασθενών (26/47) ενώ ο συνδυασμός τους με Western blot απέδωσε 95% θετικότητα. Οι 31 εκ των ασθενών, ήταν χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών⁵¹. Το 2010, στη Μαδρίτη παρατηρήθηκε κατακόρυφη αύξηση των κρουσμάτων σπλαχνικής λεισμανίασης σε ανθρώπους. Με ξενοδιάγνωση, αποδείχθηκε πως ο διαβιβαστής *P. perniciosus* μπορεί να λάβει το πρωτόζωο *L. infantum* από φαινομενικά υγιείς λαγούς, που είχαν εγκατασταθεί σε ένα νέο περιαστικό πάρκο²⁹. Ωστόσο, παρά τα δραστικά μέτρα που λήφθηκαν, η επιδημία δεν περιορίστηκε άμεσα. Βρέθηκε επίπτωση 22,2 περιστατικών ανά 100.000 κατοίκους και το 10% των κρουσμάτων με σπλαχνική λεισμανίαση ήταν μεταξύ ασθενών με συλλοίμωση *Leishmania* – *HIV*³⁸. Σε μελέτες, έχει τεκμηριωθεί πως πάνω από το 50% των ασθενών με συλλοίμωση, έχουν αμαστιγωτές μορφές στο περιφερικό αίμα, υποστηρίζοντας την ύπαρξη ενός εναλλακτικού τεχνητού κύκλου όπου η μετάδοση του παρασίτου μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα με την κοινή χρήση μολυσμένων συριγγών μεταξύ χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών²⁸. Στην συνέχεια, σε μελέτες ξενοδιάγνωσης παρατηρήθηκε πως αυτοί οι ασθενείς μπορούν να μεταδώσουν αποτελεσματικά το πρωτόζωο *L. infantum* στον διαβιβαστή *P. perniciosus*³⁸, για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα ακόμα και υπό την λήψη HAART και δευτερογενούς προφύλαξης για την λεισμανίαση²⁹. Άρα, οι ασθενείς με συλλοίμωση *Leishmania* – *HIV* μπορεί να λειτουργήσουν ως ανθρώπινες δεξαμενές για το πρωτόζωο *L. infantum*³⁸ και ιδιαίτερα οι ασυμπτωματικοί, θα μπορούσαν να αποτελέσουν «super spreaders» του παρασίτου, σε συνθήκες υψηλής μεταδοτικότητας, όπου το δέρμα και το φλεβικό αίμα τους θα αποτελέσουν σημαντικές πηγές παρασίτων για τις σκνίπες²⁹.

Σύμφωνα με τα Δελτία υποχρεωτικής δήλωσης λεισμανίασης της Διεύθυνσης Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης για Λοιμώδη Νοσήματα του ΕΟΔΥ, μεταξύ του 2004 και 2018, καταγράφηκαν 881 κρούσματα σπλαχνικής λεισμανίασης (862 εγχώρια, 19 εισαγόμενα) και 58 κρούσματα δερματικής λεισμανίασης (24 εγχώρια, 34 εισαγόμενα)³⁰. Η πλειονότητα τους ανέφερε παρουσία σκνιπών και αδέσποτων σκύλων κοντά στην κατοικία τους. Το 90% των εγχώριων κρουσμάτων σπλαχνικής λεισμανίασης ήταν ελληνικής

ιθαγένειας και το 65% ήταν άνδρες με διάμεση ηλικία 42 έτη και 32 έτη για τις γυναίκες. Τα περισσότερα εισαγόμενα κρούσματα ήταν Αλβανικής καταγωγής με διάμεση ηλικία 24 έτη. Η πλειοψηφία των εισαγόμενων κρουσμάτων δερματικής λεισμανίασης ήταν άνδρες με διάμεση ηλικία 24,5 έτη, και αφορούσε κυρίως πρόσφυγες και μετανάστες από τη Συρία, το Αφγανιστάν και το Πακιστάν³⁰.

Σε μελέτη στην Βόρεια Ελλάδα κατά την περίοδο 2001–2006, χρησιμοποιώντας IIF και ELISA βρέθηκαν αντισώματα έναντι της λεισμανίασης στο 2,8% υγιών ατόμων (43/1525) και στο 0,6% ασθενών με HIV (1/167)⁵.

Συνολικά, αυτοί οι ασθενείς διατρέχουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής και ανάπτυξης θανατηφόρας νόσου. Επίσης, μπορεί να λειτουργήσουν ως ανθρώπινες δεξαμενές για το πρωτόζωο *L. infantum*, αποτελώντας κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Οι μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, οι μετακινήσεις των πληθυσμών, η αυξανόμενη γεωγραφική αλληλοεπικάλυψη των παθογόνων και τα προβλήματα στην διάγνωση, ενδέχεται να συμβάλλουν στην αύξηση της επίπτωσης της νόσου σε ενδημικές περιοχές και την εμφάνιση της νόσου σε μη ενδημικές περιοχές, στο εγγύς μέλλον.

Συμπερασματικά, στην Ελλάδα υπάρχει σημαντικός αριθμός ασθενών με συλλοίμωξη HIV – πρωτόζωων παρασίτων. Επισημαίνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης σοβαρής κλινικής νόσου που διατρέχουν αυτοί οι ασθενείς.

6. Βιβλιογραφία

1. *Global HIV & AIDS statistics-Fact sheet*. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
2. *Επιδημιολογική Επιτήρηση του HIV/AIDS στην Ελλάδα Διαγνώσεις έως 31/12/2020 HIV/AIDS Surveillance in Greece Diagnoses through 31/12/2020 ΕΤΗΣΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ (ΕΟΔΥ) ANNUAL EDITION OF THE NATIONAL PUBLIC HEALTH ORGANIZATION (NPHO)*. <https://eody.gov.gr>.
3. *Επιδημιολογική Επιτήρηση του HIV/AIDS στην Ελλάδα Διαγνώσεις έως 31/12/2021 HIV/AIDS Surveillance in Greece Diagnoses through 31/12/2021 ΕΤΗΣΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ (ΕΟΔΥ) ANNUAL EDITION OF THE NATIONAL PUBLIC HEALTH ORGANIZATION (NPHO)*. <https://eody.gov.gr>.
4. Martin-Iguacel, R. *et al.* Incidence, presentation and outcome of toxoplasmosis in HIV infected in the combination antiretroviral therapy era. *Journal of Infection* **75**, 263–273 (2017).
5. Diza, E. *et al.* Leishmaniasis in Northern Greece: Seroprevalence of the infection and incidence of the disease during the period 2001-2006. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **27**, 997–1003 (2008).
6. Georgiadou, S. P. *et al.* Current clinical, laboratory, and treatment outcome characteristics of visceral leishmaniasis: Results from a seven-year retrospective study in Greece. *International Journal of Infectious Diseases* **34**, 46–50 (2015).

7. Yarovinsky, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature Reviews Immunology* vol. 14 109–121 (2014).
8. Robert-Gangneux, F. & Dardé, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 25 264–296 (2012).
9. Milne, G., Webster, J. P. & Walker, M. *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat? *Trends in Parasitology* vol. 36 959–969 (2020).
10. Matta, S. K., Rinkenberger, N., Dunay, I. R. & Sibley, L. D. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nature Reviews Microbiology* vol. 19 467–480 (2021).
11. Sullivan, W. J. & Jeffers, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 36 717–733 (2012).
12. Pierog, P. L. *et al.* *Toxoplasma gondii* Inactivates Human Plasmacytoid Dendritic Cells by Functional Mimicry of IL-10 . *The Journal of Immunology* **200**, 186–195 (2018).
13. Wang, Z. D. *et al.* Prevalence and burden of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet HIV* **4**, e177–e188 (2017).
14. Safarpour, H. *et al.* Global status of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in people living with HIV. *AIDS* **34**, 469–474 (2020).
15. Tsitsiklis, A., Bangs, D. J. & Robey, E. A. CD8+ T Cell Responses to *Toxoplasma gondii*: Lessons from a Successful Parasite. *Trends in Parasitology* vol. 35 887–898 (2019).
16. Beran, O. *et al.* The Effect of Latent *Toxoplasma gondii* Infection on the Immune Response in HIV-Infected Patients. *BioMed Research International* **2015**, (2015).
17. Bharti, A. R. *et al.* Latent *Toxoplasma* Infection and Higher *Toxoplasma gondii* Immunoglobulin G Levels Are Associated with Worse Neurocognitive Functioning in HIV-Infected Adults. *Clinical Infectious Diseases* **63**, 1655–1660 (2016).
18. Xiao, J. *et al.* Serological Responses to *Toxoplasma gondii* and Matrix Antigen 1 Predict the Risk of Subsequent Toxoplasmic Encephalitis in People Living With Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Clin Infect Dis* **73**, e2270–e2277 (2021).
19. Dupont, D. *et al.* Serology for *Toxoplasma* in Immunocompromised Patients: Still Useful? *Trends in Parasitology* vol. 37 205–213 (2021).
20. Simon, L. *et al.* Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii*: Analysis of false-positive IgG results and implications. *Parasite* **27**, (2020).
21. Maudry, A. *et al.* Bicentric evaluation of six anti-toxoplasma immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot. *Clinical and Vaccine Immunology* **16**, 1322–1326 (2009).

22. Franck, J., Garin, Y. J. F. & Dumon, H. LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-Toxoplasma antibody detection. *Journal of Clinical Microbiology* **46**, 2334–2338 (2008).
23. Garg, R., Barat, C., Ouellet, M., Lodge, R. & Tremblay, M. J. Leishmania infantum amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. *PLoS Negl Trop Dis* **3**, (2009).
24. Burza, S., Croft, S. L. & Boelaert, M. Leishmaniasis. *The Lancet* vol. 392 951–970 (2018).
25. WHO European Region. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
26. Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V. & Volf, P. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the mediterranean region. *Eurosurveillance* **18**, (2013).
27. Giancchetti, E. & Montomoli, E. The enemy at home: leishmaniasis in the Mediterranean basin, Italy on the focus. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* vol. 18 563–577 (2020).
28. Alvar, J. *et al.* *Leishmania and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years*. vol. 10 <https://journals.asm.org/journal/cmr> (1997).
29. Molina, R. *et al.* Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a mediterranean context. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **14**, 1–16 (2020).
30. Tzani, M. *et al.* Surveillance data for human leishmaniasis indicate the need for a sustainable action plan for its management and control, Greece, 2004 to 2018. 1 doi:10.2807/1560.
31. Alvar, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 21 334–359 (2008).
32. Zijlstra, E. E. PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, (2014).
33. Casado, J. L. *et al.* Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Medicine* **16**, 240–248 (2015).
34. Lindoso, J. A. L., Moreira, C. H. V., Cunha, M. A. & Queiroz, I. T. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care* vol. 10 193–201 (2018).
35. Okwor, I. & Uzonna, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. *Immunologic Research* **56**, 163–171 (2013).
36. Andreani, G., Lodge, R., Richard, D. & Tremblay, M. J. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS* vol. 7 276–282 (2012).
37. Cota, G. F., de Sousa, M. R. & Rabello, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in hiv-infected patients: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**, (2011).

38. Monge-Maillo, B., Norman, F. F., Cruz, I., Alvar, J. & López-Vélez, R. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, (2014).
39. Akuffo, H. *et al.* New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 12 (2018).
40. Gramiccia, M. *et al.* The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. *Eurosurveillance* 1–14 (2013).
41. Morelli, S. *et al.* Leishmania infantum Seroprevalence in Cats From Touristic Areas of Italy and Greece. *Frontiers in Veterinary Science* **7**, (2020).
42. Boutsini, S. *et al.* Phlebotomine sandflies and factors associated with their abundance in the leishmaniasis endemic area of Attiki, Greece. *Parasitology Research* **117**, 107–113 (2018).
43. Iliopoulou, P. *et al.* Risk mapping of visceral leishmaniasis: A spatial regression model for Attica region, Greece. *Tropical Medicine and Infectious Disease* **3**, (2018).
44. Botana, L. *et al.* Asymptomatic immune responders to Leishmania among HIV positive patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **13**, (2019).
45. Pintado, V., Martin-Rabadan, P., Rivera, M. L., Moreno, S. & Bouza, E. Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Patients. *Medicine* **80**, 54–73 (2001).
46. Lodge, R. *et al.* HIV-1 promotes intake of leishmania parasites by enhancing phosphatidylserine-mediated, CD91/LRP-1-dependent phagocytosis in human macrophages. *PLoS ONE* **7**, (2012).
47. Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H. & Britton, S. Leishmania - HIV Interaction: Immunopathogenic Mechanisms. *Parasitology Today* **15**, 182–187 (1999).
48. Costa, D. L. *et al.* Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathogens and Global Health* **107**, 78–87 (2013).
49. Medrano, F. J. *et al.* Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection.
50. Bernier, R., Tremblay, M. J., Olivier, M. & Barbeau, B. The Lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* Up-Regulates HIV-1 Transcription in T Cells Through the Nuclear Factor - κ B Elements. <http://www.jimmunol.org/content/160/6/2881> (1998).
51. Rosenthal, E. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE (~~~~)* vol. 89. (1995)
52. Aronson, N. *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical Infectious Diseases* **63**, E202–E264 (2016).

53. Pasquau, F. *et al.* Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: Determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* vol. 24 411–418 (2005).
54. Orsini, M. *et al.* High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **106**, 283–288 (2012).
55. de Brito, R. C. F. *et al.* Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 104 8105–8116 (2020).
56. Reimão, J. Q., Coser, E. M., Lee, M. R. & Coelho, A. C. Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: Current and future methods. *Microorganisms* vol. 8 1–30 (2020).
57. Cota, G. F., de Sousa, M. R., Demarqui, F. N. & Rabello, A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 6 (2012).
58. Freire, M. L. *et al.* Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **13**, (2019).
59. Deniau, M., Cañavate, C., Faraut-Gambarelli, F. & Marty, P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* vol. 97 (2003).
60. Kindt, T. J., Goldsby, R. A. & Osborne, B. A. *Kuby Immunology*. (W.H. Freeman and Company, 2007).
61. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Medical Microbiology* . (Elsevier/Saunders, 2016).
62. Barreto-de-Souza, V. *et al.* Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *Journal of Infectious Diseases*. 194(6): 846-854
63. Abass, E. *et al.* Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. *PLoS One*. 10(3), (2015)

