



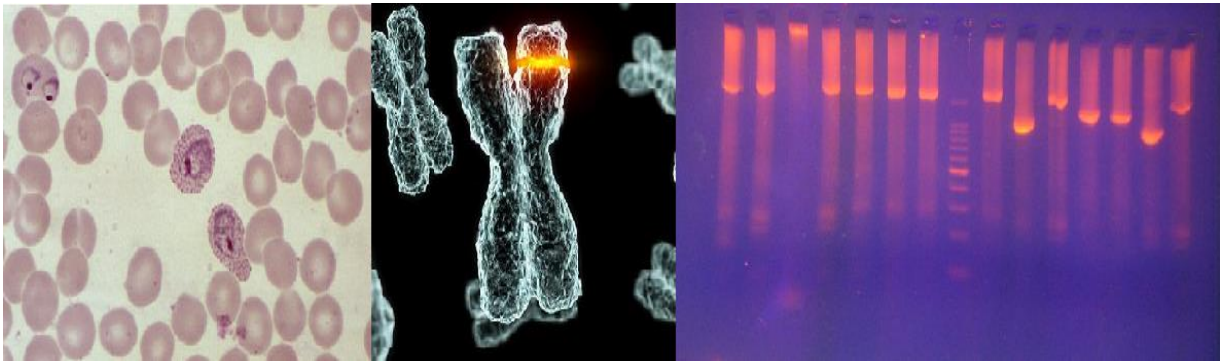
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

## Συμβολή της γονοτύπησης στη διερεύνηση περιστατικών ελονοσίας από *Plasmodium vivax*



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΟΥΡΙΚΗ ΔΑΝΑΗ

ΑΜ: 62113134

ΠΑΤΣΟΥΛΑ ΕΛΕΝΗ

Εργαστήριο Επιτήρησης

Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ)

Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας

Σχολή Δημόσιας Υγείας

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ

Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας

και Ανοσολογίας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

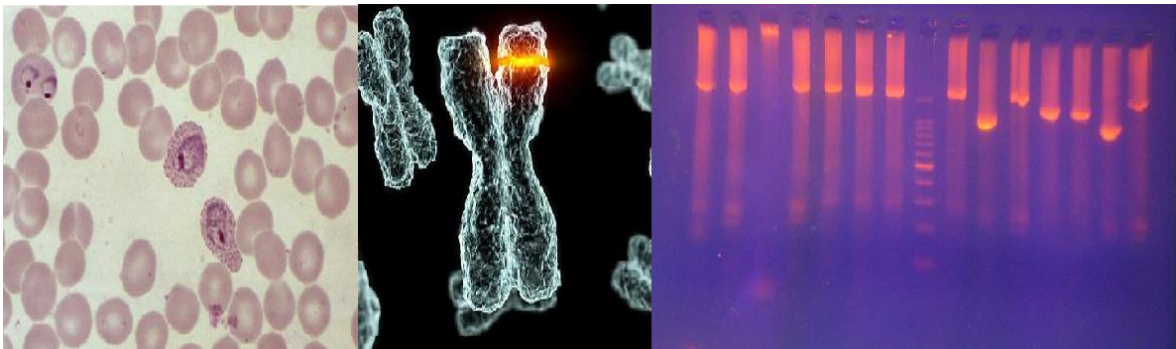
ΑΘΗΝΑ 2021



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

DIVISION MEDICAL LABORATORIES

**Contribution of genotyping analysis for  
investigation of malaria cases caused by  
*Plasmodium vivax***



**THESIS**

**MOURIKI DANAI**

Candidate Number: 62113134

**PATSOULA ELENI**

Laboratory for the Surveillance  
of Infectious Diseases (LSID)  
Department of Public Health Policy  
School of Public Health  
University of West Attica

**VOYIATZAKI CHRYSA**

Laboratory of Molecular  
Microbiology and Immunology  
Department of Biomedical Sciences  
Faculty of Health and Care Sciences  
University of West Attica

**ATHENS 2021**

## ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βογιατζάκη Χρυσάνθη

Γιαννουλάκη Ελένη

Τσουμάνη Μαρία

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Μουρίκη Δανάη του Ευάγγελου, με αριθμό μητρώου 62113134 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοιατρικών Επιστημών του Τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων, 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/Η Δηλών/ούσα

Μουρίκη Δανάη



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|               |   |
|---------------|---|
| Εισαγωγή..... | 1 |
|---------------|---|

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

|                                                           |          |
|-----------------------------------------------------------|----------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΛΟΝΟΣΙΑ – <i>Plasmodium spp.</i>.....</b> | <b>3</b> |
|-----------------------------------------------------------|----------|

|                                             |   |
|---------------------------------------------|---|
| 1.1 Εισαγωγικά στοιχεία περί ελονοσίας..... | 3 |
|---------------------------------------------|---|

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| 1.2 Επιδημιολογία της νόσου..... | 4 |
|----------------------------------|---|

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| 1.2.1 Επιδημιολογία στην Ελλάδα..... | 9 |
|--------------------------------------|---|

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 1.3 Τρόποι μετάδοσης της ελονοσίας..... | 17 |
|-----------------------------------------|----|

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την μετάδοση της νόσου..... | 20 |
|-------------------------------------------------------------|----|

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 1.4 Πλασμώδια της ελονοσίας..... | 23 |
|----------------------------------|----|

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| 1.4.1 Βιολογικός κύκλος του παρασίτου..... | 25 |
|--------------------------------------------|----|

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 1.5 Κλινική εικόνα ασθενών με ελονοσία..... | 29 |
|---------------------------------------------|----|

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 1.5.1 Χρόνοι επώασης..... | 32 |
|---------------------------|----|

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 1.6 Ελονοσία και θεραπευτική αγωγή..... | 33 |
|-----------------------------------------|----|

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1.7 Τρόποι διάγνωσης ελονοσίας..... | 36 |
|-------------------------------------|----|

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 1.7.1 Κλινική Διάγνωση..... | 36 |
|-----------------------------|----|

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 1.7.2 Εργαστηριακή διάγνωση..... | 37 |
|----------------------------------|----|

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| 1.7.2.1 Γρήγορες διαγνωστικές δοκιμασίες (RDTs)..... | 37 |
|------------------------------------------------------|----|

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 1.7.2.2 Διάγνωση βάσει μικροσκόπησης..... | 40 |
|-------------------------------------------|----|

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 1.7.2.3 Ορολογική διάγνωση..... | 45 |
|---------------------------------|----|

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 1.7.2.4 Ποσοτική μέθοδος Buffy Coat (QBC)..... | 48 |
|------------------------------------------------|----|

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 1.7.3 Μοριακή διάγνωση..... | 50 |
|-----------------------------|----|

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 1.7.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 52 |
|----------------------------------------------------|----|

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.7.3.2 Εμφωλεασμένη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Nested-PCR)..... | 56 |
|------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.7.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)..... | 58 |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.7.3.4 Πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Multiplex PCR).....          | 60 |
| 1.7.3.5 Σύγκριση των τριών δοκιμασιών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)..... | 61 |
| 1.7.3.6 Γονοτυπική ανάλυση.....                                                    | 62 |
| 1.8 Πρόληψη.....                                                                   | 71 |
| 1.8.1 Εμβόλια.....                                                                 | 73 |

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

|                                           |            |
|-------------------------------------------|------------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b> | <b>80</b>  |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>      | <b>88</b>  |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>          | <b>95</b>  |
| <b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>                  | <b>99</b>  |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>                      | <b>100</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                      | <b>102</b> |
| <b>Βιβλιογραφία.....</b>                  | <b>103</b> |

## Εισαγωγή

Η ελονοσία από τα αρχαία χρόνια αποτέλεσε ενδημική νόσο στην Ελλάδα και μεγάλο πρόβλημα δημόσιας υγείας έως τα μέσα του 20ου αιώνα. Ακριβή επιδημιολογικά στοιχεία για τη νόσο, πριν τα τέλη του 19ου αιώνα, δεν διασώζονται. Τα δεδομένα, τα οποία διασώθηκαν, αποτελούν κυρίως καταγραφές από Βρετανούς ιατρούς των Ιονίων Νήσων κατά την περίοδο της Αγγλοκρατίας (1815-1864) και ιατρο-γεωγραφικές πραγματείες των περιηγητών που ήρθαν στην Ελλάδα κατά τον 19ο αιώνα [1].

Ωστόσο, το έτος 1974, η νόσος εξαλείφθηκε στην Ελλάδα, ύστερα από ένα σημαντικό πρόγραμμα αντιμετώπισης εκρίζωσης της νόσου. Έκτοτε και μέχρι το έτος 2019, η ετήσια καταγραφή αναφέρει 20-110 εισαγόμενα κρούσματα [2-3]. Από παγκόσμιας άποψης όμως, η εκτίμηση των 229 εκατομμυρίων επιβεβαιωμένων κρουσμάτων μόνο για το έτος 2019 αναδεικνύει αυξημένα επίπεδα επιπολασμού της νόσου [4]. Ως εκ τούτου, η ελονοσία καθιστά τη σημαντικότερη παρασιτική λοίμωξη, με προσβολή χιλιάδων ατόμων ετησίως, με αποκορύφωμα την θανατική κατάληξη σε αρκετά εξ' αυτών. Ως εκ τούτου, οι επιδημιολογικές μελέτες κρίνονται ως άκρως απαραίτητες, για την κατανόηση της νόσου και την ορθολογική αντιμετώπισή της [4].

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάδειξη της συμβολής στοχευμένης μοριακής μεθόδου γονοτύπησης σε κρούσματα ελονοσίας από *P. vivax* και η ενδεχόμενη συσχέτιση σε επιδημιολογικό επίπεδο.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1.1 Εισαγωγικά στοιχεία περί ελονοσίας

Παράσιτα, όπως πρωτόζωα, σκώληκες (έλμινθες) και αρθρόποδα (έντομα και αραχνίδες) προσβάλουν εκατοντάδες εκατομμύρια ανθρώπους σε τροπικές περιοχές, προκαλώντας την εκδήλωση λοιμώξεων. Οι τελευταίες αναφέρονται ως παρασιτικές λοιμώξεις, μία εκ των οποίων είναι η ελονοσία. Η συγκεκριμένη νόσος, προσβάλλει το ανθρώπινο είδος, μέσω του συνδυασμού της πρόκλησής της από τα πρωτόζωα και της μετάδοσής της με τα αρθρόποδα. Η δεδομένη νόσος θεωρείται η σημαντικότερη δυνητικά θανατηφόρος πρωτοζωική λοίμωξη, με γεγονός την ετήσια γνωστοποίηση περισσότερων από 200 εκατομμύριων κλινικών περιστατικών και την καταγραφή 400 χιλιάδων θανάτων, από των οποίων οι περισσότεροι κατανέμονται στην ήπειρο της Αφρική, εντός της διάρκειας των ετών 2010 έως το 2018 [5-8].

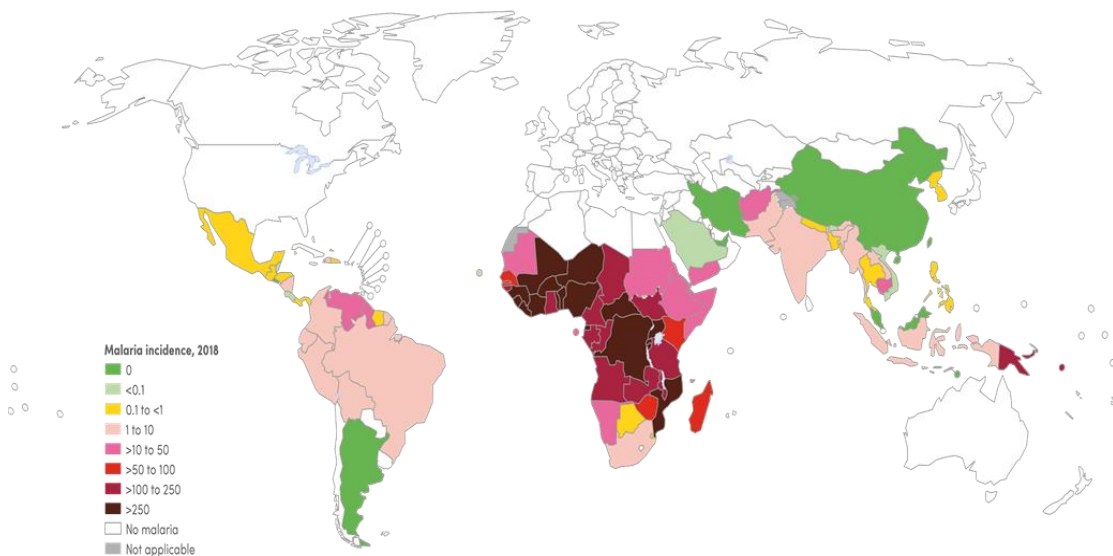
Τα παθογόνα πρωτόζωα που προκαλούν την ελονοσία ονομάζονται πλασμώδια (plasmodia) και ανήκουν στο παρασιτικό φύλο *Apicomplexa*. Περισσότερα από 200 είδη του γένους *Plasmodium* έχουν ταυτοποιηθεί, τα οποία έχουν καταγραφεί από προσβολές σε ερπετά, πουλιά και θηλαστικά. Τα στελέχη της ελονοσίας που μολύνουν τον άνθρωπο πιθανώς προέρχονται από τους Μεγάλους Πίθηκους (στην περίπτωση του *P. knowlesi*, μακάκοι). Από τη άλλη, τα αρθρόποδα που μεταδίδουν την νόσο κυρίως μέσω δήγματος (τσιμπήματος) είναι τα, μολυσμένα από το παράσιτο, θηλυκά Ανωφελές κουνούπια (*Anopheles*) [9-11].

Μία ενδιαφέρον πληροφορία για την ονομασία της νόσου είναι, πως το δέκατο όγδοο αιώνα, η νόσος έλαβε το ιταλικό όνομα malaria (malaria: mala + aria, που σημαίνει «κακός αέρας», ελονοσία: έλος + νόσος), λόγω του ότι αρχικά είχε εκτιμηθεί πως αιτία πρόκλησης της νόσου, σχετιζόταν με τον κοινό “κακό (δύσοσμο) αέρα” στις ελώδεις περιοχές. Πλέον, είναι γνωστό πως, οι εν λόγω τοποθεσίες αποτελούν τα μέρη αναπαραγωγής και ανάπτυξης των κουνουπιών [11-12]. Τέλος, η ελονοσία παραμένει μια σημαντική απειλή για τη υγεία των ανθρώπων μέχρι και σήμερα, με εμφάνιση συνεχιζόμενης μετάδοσης σε 87 χώρες μέχρι το 2019 [4].

## 1.2 Επιδημιολογία της νόσου

Μια πολύ σημαντική επίκαιρη αναφορά από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), ήταν η εκτίμηση ότι, 1,5 δισεκατομμύρια περιπτώσεις ελονοσίας κατάφεραν να αποφευχθούν, αλλά και 7,6 εκατομμύρια θάνατοι, αντίστοιχα, μέσω εντατικών προγραμμάτων αντιμετώπισης νόσου, κατά την περίοδο των τελευταίων δέκα (10) ετών (2000-2019) [4].

Τα δεδομένα αυτά, δεν αποτελούν μέτρο καθησυχασμού, αφού η ελονοσία συνεχίζει να αποτελεί υψηλό κίνδυνο για την παγκόσμια υγεία, το οποίο προβάλλεται μέσω των τελευταίων καταγραφών, που αναφέρονται στα έτη 2018 και 2019. Τουλάχιστον 81 χώρες χαρακτηρίστηκαν ως ενδημικές στην νόσο το έτος 2018, με επίκεντρο της μεγαλύτερης εστίας περιστατικών να αναφέρθηκε σε χώρες της Αφρικανικής Περιφέρειας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (213 εκατομμύρια, 93%), για μία ακόμη συνεχιζόμενη χρονιά (Εικ. 1) [8].



**Εικόνα 1** Παγκόσμιος χάρτης, αναφερόμενος στο ποσοστό επίπτωσης της ελονοσίας (περιπτώσεις ανά 1000 άτομα πληθυσμού σε κίνδυνο) σε χώρες το έτος 2018 [8].

Η παγκόσμια εκτίμηση κρουσμάτων του ίδιου έτους, ήταν συνολικά 228 εκατομμύρια, σε σύγκριση με τα 231 εκατομμύρια του έτους 2017 (251 εκατομμύρια περιπτώσεις το 2010) (Πίν. 1) [8]. Οι Περιφέρειες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας της Νοτιοανατολικής Ασίας με 3,4% των περιπτώσεων και της Ανατολικής Μεσογείου με 2,1%, ήταν οι ακόλουθες μετά την Αφρικανική, που εμφάνισαν τα υψηλότερα κρούσματα [8].

Αναλυτικότερα, η μεγαλύτερη παγκόσμια επιφόρτιση της νόσου, με ποσοστό σχεδόν 85%, αντικατοπτρίζεται σε μόλις δεκαεννέα (19) χώρες της υποσαχάριας Αφρικής και της Ινδίας [8]. Επιπρόσθετα, μόνο έξι (6) χώρες αντιπροσώπευαν τα περισσότερα από τα μισά κρούσματα ελονοσίας παγκοσμίως με ποσοστά στη Νιγηρία 25%, στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό 12%, στην Ουγκάντα 5% και στην Ακτή Ελεφαντοστού, την Μοζαμβίκη και τον Νίγηρα με 4% η καθεμία [8].

Το ποσοστό επίπτωσης της ελονοσίας μειώθηκε παγκοσμίως μεταξύ των ετών 2010 και 2018, από 71 σε 57 περιπτώσεις ανά 1000 κατοίκους που βρίσκονταν σε κίνδυνο [8]. Όμως, από το έτος 2014 έως το 2018, ο ρυθμός μείωσης κρουσμάτων επιβραδύνθηκε δραματικά, με τα αναφερόμενα 57 κρούσματα του έτους 2014, να καταγράφονται σε παρόμοια επίπεδα έως το 2018 [8]. Ειδικότερα, στην Περιφέρεια Νοτιοανατολικής Ασίας του ΠΟΥ παρατηρήθηκε συνεχή πτώση του ποσοστού επίπτωσής της, από 17 περιπτώσεις της νόσου ανά 1000 κατοίκους που βρίσκονταν σε κίνδυνο το έτος 2010, σε πέντε περιπτώσεις του 2018 (μείωση κατά 70%). Παρόμοια περίπτωση αναφέρθηκε και στην Αφρικανική Περιφέρεια του ΠΟΥ, με τα αναφερόμενα επίπεδα περιστατικών, τα οποία μειώθηκαν από 294 κρούσματα του έτους 2010, σε 229 του 2018 (μείωση κατά 22%). Τέλος, οι υπόλοιπες περιοχές του ΠΟΥ σημείωσαν μικρή πρόοδο στη μείωση κρουσμάτων ή ακόμα και αύξηση του ποσοστού επίπτωσης. Μία παρόμοια αναφορά που έγινε στην Περιφέρεια της Αμερικής του ΠΟΥ σημείωσε αύξηση, κυρίως λόγω της αύξησης της μετάδοσης ελονοσίας στη Βολιβιανή Δημοκρατία της Βενεζουέλας [8].

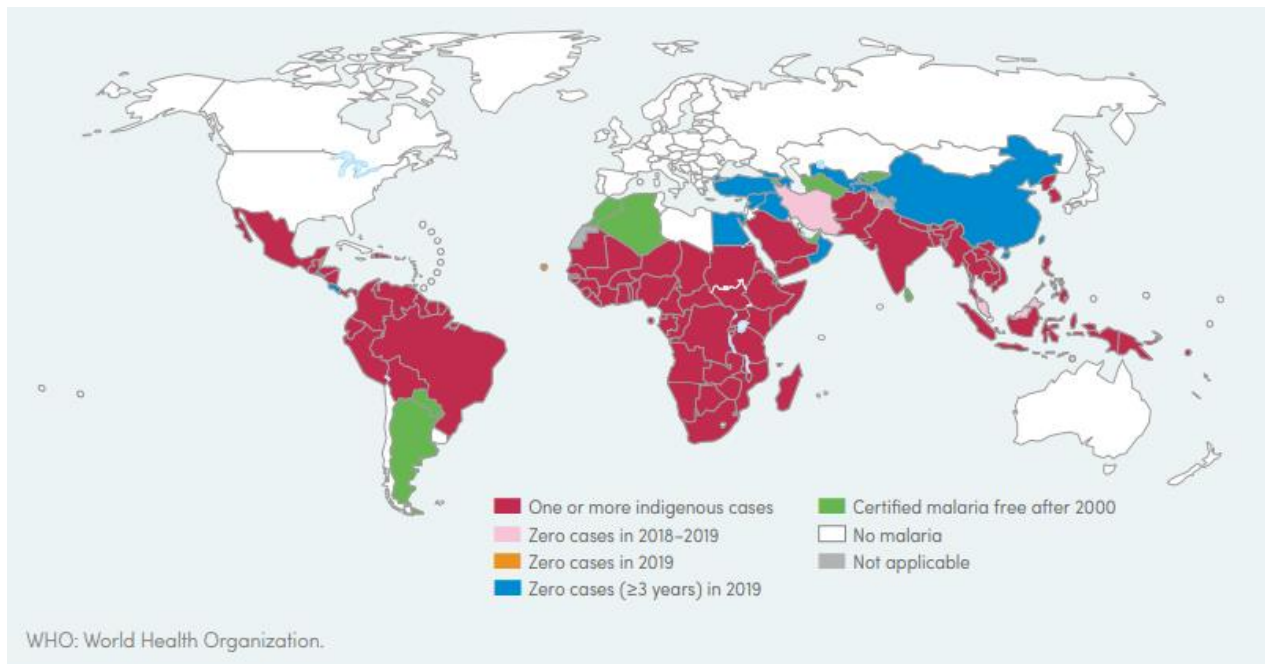
Το 2018, υπολογίστηκαν 405.000 θάνατοι από ελονοσία παγκοσμίως, σε σύγκριση με τους 416.000 εκτιμώμενους θανάτους του έτους 2017 και 585.000 θανάτους του έτους 2010. Τα παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε (5) ετών είναι η πιο ευάλωτη ομάδα που πάσχει από ελονοσία [8]. Το 2018, αντιπροσώπευαν το 67% (272.000) όλων των θανάτων από ελονοσία παγκοσμίως. Η Αφρικανική Περιφέρεια του ΠΟΥ αντιπροσώπευε το 94% όλων των θανάτων από ελονοσία το 2018, με ακόλουθες τη Νιγηρία (24%), τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (11%), την Ενωμένη Δημοκρατία της Τανζανίας (5%) και την Ανγκόλα, τη Μοζαμβίκη και τον Νίγηρα (4% το καθένα) [8]. Η Αφρικανική περιφέρεια του ΠΟΥ είχε τη μεγαλύτερη απόλυτη μείωση των θανάτων από ελονοσία, από 533.000 το 2010 σε 380.000 το 2018 [8].

**Πίνακας 1** Πληθυσμοί που βρίσκονται σε κίνδυνο μετάδοσης της νόσου και οι εκτιμώμενες περιπτώσεις και θάνατοι, τα έτη 2010-2018 [8].

| WHO region              | Year | Population at risk | Cases       |             |             | Deaths  |         |         |
|-------------------------|------|--------------------|-------------|-------------|-------------|---------|---------|---------|
|                         |      |                    | Lower       | Point       | Upper       | Lower   | Point   | Upper   |
| <b>REGIONAL SUMMARY</b> |      |                    |             |             |             |         |         |         |
| African                 | 2010 | 742 051 480        | 199 000 000 | 219 000 000 | 245 000 000 | 507 000 | 533 000 | 588 000 |
|                         | 2011 | 763 387 315        | 194 000 000 | 213 000 000 | 237 000 000 | 469 000 | 493 000 | 537 000 |
|                         | 2012 | 785 260 919        | 190 000 000 | 209 000 000 | 233 000 000 | 444 000 | 469 000 | 514 000 |
|                         | 2013 | 807 674 747        | 185 000 000 | 204 000 000 | 229 000 000 | 419 000 | 444 000 | 493 000 |
|                         | 2014 | 830 636 558        | 181 000 000 | 198 000 000 | 218 000 000 | 408 000 | 428 000 | 462 000 |
|                         | 2015 | 854 147 991        | 184 000 000 | 199 000 000 | 219 000 000 | 391 000 | 411 000 | 448 000 |
|                         | 2016 | 878 208 734        | 189 000 000 | 206 000 000 | 229 000 000 | 371 000 | 389 000 | 425 000 |
|                         | 2017 | 902 801 325        | 192 000 000 | 212 000 000 | 240 000 000 | 364 000 | 383 000 | 423 000 |
|                         | 2018 | 927 888 238        | 191 000 000 | 213 000 000 | 244 000 000 | 361 000 | 380 000 | 425 000 |
| Americas                | 2010 | 126 118 119        | 744 000     | 814 000     | 894 000     | 220     | 459     | 730     |
|                         | 2011 | 127 739 647        | 566 000     | 611 000     | 666 000     | 180     | 444     | 710     |
|                         | 2012 | 129 364 372        | 541 000     | 580 000     | 627 000     | 180     | 392     | 600     |
|                         | 2013 | 130 969 261        | 520 000     | 562 000     | 613 000     | 180     | 391     | 590     |
|                         | 2014 | 132 522 297        | 445 000     | 477 000     | 512 000     | 140     | 289     | 420     |
|                         | 2015 | 134 003 416        | 525 000     | 566 000     | 611 000     | 150     | 324     | 460     |
|                         | 2016 | 135 398 716        | 640 000     | 691 000     | 749 000     | 210     | 474     | 680     |
|                         | 2017 | 136 722 119        | 880 000     | 944 000     | 1 026 000   | 250     | 620     | 910     |
|                         | 2018 | 138 017 898        | 867 000     | 929 000     | 1 007 000   | 220     | 577     | 850     |
| Eastern Mediterranean   | 2010 | 419 019 843        | 3 300 000   | 4 300 000   | 6 300 000   | 3 000   | 8 300   | 14 400  |
|                         | 2011 | 427 979 875        | 3 400 000   | 4 500 000   | 6 500 000   | 3 000   | 7 500   | 12 300  |
|                         | 2012 | 436 754 102        | 3 200 000   | 4 200 000   | 6 000 000   | 2 900   | 7 600   | 12 400  |
|                         | 2013 | 445 450 169        | 3 000 000   | 3 900 000   | 5 300 000   | 2 500   | 6 900   | 11 100  |
|                         | 2014 | 454 228 324        | 3 100 000   | 4 000 000   | 5 500 000   | 2 400   | 6 900   | 11 300  |
|                         | 2015 | 463 210 243        | 3 000 000   | 3 800 000   | 5 200 000   | 2 300   | 7 100   | 12 200  |
|                         | 2016 | 468 761 159        | 3 800 000   | 4 800 000   | 6 400 000   | 2 900   | 8 600   | 15 300  |
|                         | 2017 | 478 058 225        | 3 800 000   | 4 900 000   | 6 800 000   | 3 000   | 9 200   | 17 300  |
|                         | 2018 | 487 568 453        | 3 700 000   | 4 900 000   | 6 800 000   | 2 600   | 9 300   | 17 700  |
| European                | 2010 | 37 906 443         | -           | 170         | -           | -       | 0       | -       |
|                         | 2011 | 38 469 606         | -           | 69          | -           | -       | 0       | -       |
|                         | 2012 | 39 086 200         | -           | 21          | -           | -       | 0       | -       |
|                         | 2013 | 39 739 267         | -           | 3           | -           | -       | 0       | -       |
|                         | 2014 | 40 405 247         | -           | 2           | -           | -       | 0       | -       |
|                         | 2015 | 41 065 655         | -           | 0           | -           | -       | 0       | -       |
|                         | 2016 | 41 714 844         | -           | 0           | -           | -       | 0       | -       |
|                         | 2017 | 42 352 758         | -           | 0           | -           | -       | 0       | -       |
|                         | 2018 | 42 973 389         | -           | 0           | -           | -       | 0       | -       |
| South-East Asia         | 2010 | 1 477 504 120      | 19 800 000  | 25 100 000  | 33 900 000  | 9 000   | 39 000  | 67 000  |
|                         | 2011 | 1 496 330 952      | 16 700 000  | 21 100 000  | 28 300 000  | 7 000   | 32 000  | 57 000  |
|                         | 2012 | 1 514 731 269      | 14 700 000  | 18 400 000  | 24 400 000  | 7 000   | 28 000  | 47 000  |
|                         | 2013 | 1 532 751 942      | 10 900 000  | 13 700 000  | 18 000 000  | 4 000   | 21 000  | 36 000  |
|                         | 2014 | 1 550 466 894      | 10 400 000  | 13 200 000  | 17 400 000  | 4 000   | 24 000  | 42 000  |
|                         | 2015 | 1 567 931 968      | 10 700 000  | 13 600 000  | 18 200 000  | 3 000   | 25 000  | 44 000  |
|                         | 2016 | 1 585 152 940      | 10 500 000  | 14 000 000  | 19 700 000  | 3 000   | 25 000  | 47 000  |
|                         | 2017 | 1 602 118 493      | 8 800 000   | 11 300 000  | 15 400 000  | 3 000   | 20 000  | 35 000  |
|                         | 2018 | 1 618 838 836      | 5 800 000   | 7 900 000   | 10 700 000  | 2 000   | 12 000  | 21 000  |
| Western Pacific         | 2010 | 721 036 851        | 1 045 000   | 1 839 000   | 2 779 000   | 800     | 3 800   | 7 500   |
|                         | 2011 | 726 302 437        | 922 000     | 1 576 000   | 2 340 000   | 600     | 3 300   | 6 600   |
|                         | 2012 | 731 623 901        | 914 000     | 1 761 000   | 3 009 000   | 700     | 3 600   | 8 000   |
|                         | 2013 | 736 961 516        | 1 305 000   | 2 027 000   | 2 925 000   | 600     | 4 600   | 9 300   |
|                         | 2014 | 742 256 202        | 1 588 000   | 2 345 000   | 3 339 000   | 700     | 4 400   | 8 500   |
|                         | 2015 | 747 456 804        | 1 115 000   | 1 445 000   | 1 852 000   | 500     | 2 800   | 5 000   |
|                         | 2016 | 752 550 363        | 1 318 000   | 1 733 000   | 2 228 000   | 500     | 3 500   | 6 400   |
|                         | 2017 | 757 527 287        | 1 392 000   | 1 854 000   | 2 420 000   | 500     | 3 600   | 6 500   |
|                         | 2018 | 762 325 610        | 1 495 000   | 1 980 000   | 2 588 000   | 500     | 3 600   | 6 500   |
| Total                   | 2010 | 3 523 638 856      | 231 000 000 | 251 000 000 | 278 000 000 | 541 000 | 585 000 | 649 000 |
|                         | 2011 | 3 580 209 832      | 222 000 000 | 241 000 000 | 266 000 000 | 499 000 | 536 000 | 588 000 |
|                         | 2012 | 3 636 820 763      | 214 000 000 | 234 000 000 | 260 000 000 | 474 000 | 508 000 | 560 000 |
|                         | 2013 | 3 693 546 902      | 205 000 000 | 224 000 000 | 250 000 000 | 446 000 | 477 000 | 531 000 |
|                         | 2014 | 3 750 515 522      | 202 000 000 | 218 000 000 | 239 000 000 | 434 000 | 463 000 | 504 000 |
|                         | 2015 | 3 807 816 077      | 203 000 000 | 219 000 000 | 240 000 000 | 416 000 | 446 000 | 491 000 |
|                         | 2016 | 3 861 786 756      | 210 000 000 | 227 000 000 | 251 000 000 | 398 000 | 427 000 | 473 000 |
|                         | 2017 | 3 919 580 207      | 211 000 000 | 231 000 000 | 259 000 000 | 390 000 | 416 000 | 462 000 |
|                         | 2018 | 3 977 632 424      | 206 000 000 | 228 000 000 | 258 000 000 | 384 000 | 405 000 | 452 000 |

Το 2019 η ελονοσία αποτελούσε ενδημική νόσο σε τουλάχιστον 87 χώρες παγκοσμίως (Εικ. 2). Συγκεκριμένα, η εκτίμηση των περιπτώσεων της νόσου που πραγματοποιήθηκε ήταν των 229 εκατομμυρίων. Το ποσοστό από αυτές, που οφειλόταν

στο *P. νίναχ* μειώθηκε σε 3% συγκριτικά με του έτους 2000 που ήταν περίπου 7%, με τις τότε 108 ενδημικές χώρες. Επιπρόσθετα, το ποσοστό επίπτωσης της ελονοσίας παρέμεινε σχεδόν στα ίδια επίπεδα με αυτό του 2018, αναφέροντας 57 περιπτώσεις της νόσου ανά 1000 κατοίκους που βρίσκονταν σε κίνδυνο κατά το έτος 2019 [4].



**Εικόνα 2** Παγκόσμιος χάρτης με περιπτώσεις ελονοσίας του έτους 2019 [4].

Το ίδιο έτος, ο συνολικός υπολογισμός των θανάτων από την νόσο, που συμπεριλαμβάνει και παιδιά κάτω των πέντε (5) ετών, ήταν 409.000, με ποσοστό θνησιμότητας 67% του πληθυσμού. Από τις συνολικά 87 ενδημικές χώρες του 2019 με ελονοσία, οι 29 αποτελούσαν το 95% των περιστατικών αυτής σε παγκόσμιο επίπεδο. Λεπτομερώς, περίπου το 51% των παγκοσμίων περιπτώσεων να αναφέρονται στις ακόλουθες χώρες, τη Νιγηρία με σχεδόν το 27%, με ακόλουθη τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (12%), την Ουγκάντα (5%), τη Μοζαμβίκη (4%) και το Νίγηρα (3%). Όσο αφορά το ποσοστό των θανάτων που ήταν 95%, σε μόλις 32 χώρες, με περίπου το 51% αυτού να αντιστοιχεί στη Νιγηρία (23%), τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (11%), την Ενωμένη Δημοκρατία της Τανζανίας (5%) και την Μπουρκίνα Φάσο, τη Μοζαμβίκη και το Νίγηρα (4% το καθένα) [4].

Η Αφρικανική Περιφέρεια του ΠΟΥ αποτέλεσε το 94% των παγκοσμίων περιπτώσεων και των θανάτων, με περίπου 215 εκατομμύρια κρούσματα της νόσου

και 384.000 θανάτους. Την περίοδο 2000 έως το 2019 η συχνότητα εμφάνισης ελονοσίας έδειξε μείωση σε 225 περιστατικά ανά 1000 κατοίκους που βρίσκονταν σε κίνδυνο, με σύγκριση των 363 που υπήρχαν. Αξιοσημείωτο είναι πως ενώ το 2019 υπήρξε μεγάλη αύξηση του πληθυσμού της υποσαχάριας Αφρικής σε 1,1 δισεκατομμύρια από 665 εκατομμύρια το έτος 2000, το ποσοστό θανάτων από ελονοσία μειώθηκαν κατά 44% στην Αφρικανική Περιφέρεια του ΠΟΥ. Λεπτομερώς, 384.000 άτομα πέθαναν το έτος 2019 από την νόσο στην Αφρικανική Περιφέρεια του ΠΟΥ, συγκριτικά με τα 680.000 άτομα του έτους 2000. Ακόμα, το ποσοστό θνησιμότητας της νόσου αποτέλεσε μείωση κατά 67% την περίοδο αυτή, να αντιστοιχεί με ποσοστό θνησιμότητας 40% ανά 100.000 κατοίκους που βρίσκονταν σε κίνδυνο από το ποσοστό 121% που σημειώθηκε το έτος 2000 [4].

### 1.2.1 Επιδημιολογία στην Ελλάδα

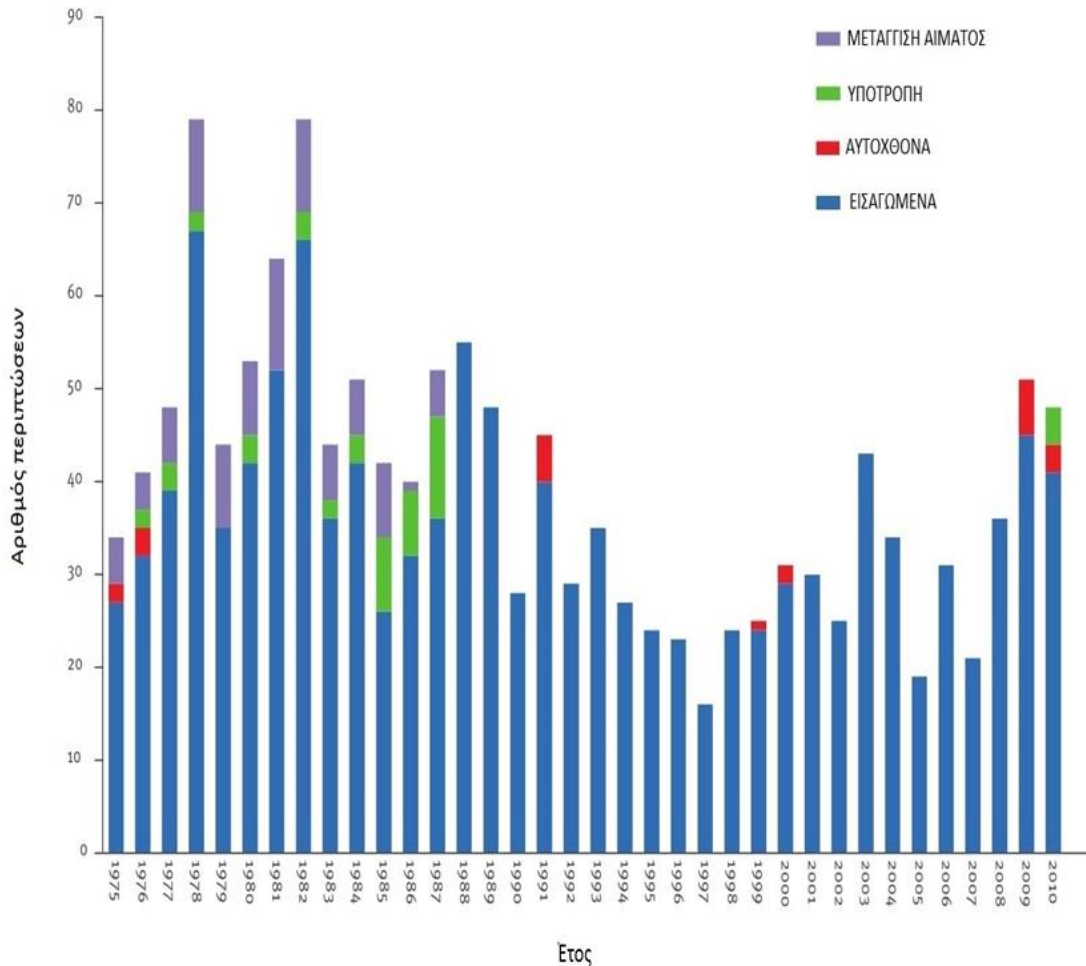
Οι ιατροί που συμμετείχαν, σε Ελληνικά Ιατρικά Συνέδρια που έλαβαν χώρα το έτος 1901 και το 1902, γνωστοποίησαν μία φιλόδοξη και οργανωμένη πρόταση για ανθελονοσιακό αγώνα. Δυστυχώς, η πρόταση δεν πραγματοποιήθηκε λόγω αδυναμίας του κράτους από πολιτικο-οικονομικές δυσκολίες και συνέπειες του Ελληνο-Τουρκικού Πολέμου του 1897. Αξίζει να αναφερθεί ότι η Αθήνα υπέφερε από 14 μεγάλες επιδημίες ελονοσίας κατά την διάρκεια των ετών 1860-1905 και η νόσος ήταν ενδημική σε πολλές περιοχές της πρωτεύουσας, με τη νοσηρότητα να αγγίζει το 95% [1].

Στις αρχές του 20ου αιώνα πραγματοποιήθηκε η ίδρυση της Ελληνικής Ένωσης κατά της Ελονοσίας, με συγκεκριμένο έτος το 1905. Το πρωταρχικό της έργο ήταν η εκτίμηση του επιπολασμού της ελονοσίας στην Ελλάδα. Μετά από λίγο καιρό από τη θεμελίωση αυτής της ένωσης, μια επιδημία ελονοσίας σοβαρού επιπέδου έπληξε τη χώρα, με κορύφωση αυτής στα τέλη του καλοκαιριού (Αυγустος-Σεπτέμβριος). Η ύπαρξη των καταγεγραμμένων δεδομένων του 1905 από τις γύρω περιοχές της Λακωνίας δείχνουν τη σοβαρότητα του γεγονότος με περίπου το 20% των ατόμων που κατοικούσαν στο σημερινό δήμο Ευρώτα είχαν την λοίμωξη, 3-5% σε μέρη μεγάλου υψόμετρου και 100% στην περιοχή όπου βρίσκεται η πεδιάδα της Έλους. Σε περιοχές που ήταν κοντά γεωγραφικά, όπως το Γύθειο, οι κάτοικοι που νόσησαν αφορούσαν το 2–10%, στο Οίτυλο το 5–15%, περιφερειακά του χωριού Ελαία το 10–50% και στα Κύθηρα ένας μικρός αριθμός, με το 40–60% σε μόνο μία από τις συνοικίες του. Ο συνολικός πληθυσμός που μελετήθηκε ήταν 2.433.806 άτομα, από τα οποία υπολογίστηκε ότι 5.916 πέθαναν και τουλάχιστον 960.048 προσβλήθηκαν από τη νόσο [13].

Το 1974, η νόσος της ελονοσίας είχε πλέον εξαλειφθεί στην Ελλάδα, ύστερα από πολύ κόπο με εντατικό πρόγραμμα καταπολέμησης (1946-1960). Από τότε μέχρι το 2019 καταγράφονταν ετησίως 20-110 εισαγόμενα κρούσματα στην Ελλάδα (Εικ. 3-4, Πίν. 2). Αυτά τα κρούσματα ήταν από άτομα που προσβλήθηκαν σε χώρα στο εξωτερικό, δηλαδή ταξιδιώτες ή μετανάστες που ήρθαν από ενδημικές χώρες. Τα περιστατικά εισαγόμενων κρουσμάτων της νόσου ήταν αναμενόμενα, αφού υπήρχε άνοδος των ταξιδιών και πληθυσμιακών μετακινήσεων σε όλο τον κόσμο, το οποίο συνέβαινε σε όλες τις αναπτυσσόμενες χώρες. Σύμφωνα με τα ετήσια επιδημιολογικά δεδομένα της νόσου, του Ευρωπαϊκού Κέντρου Ελέγχου

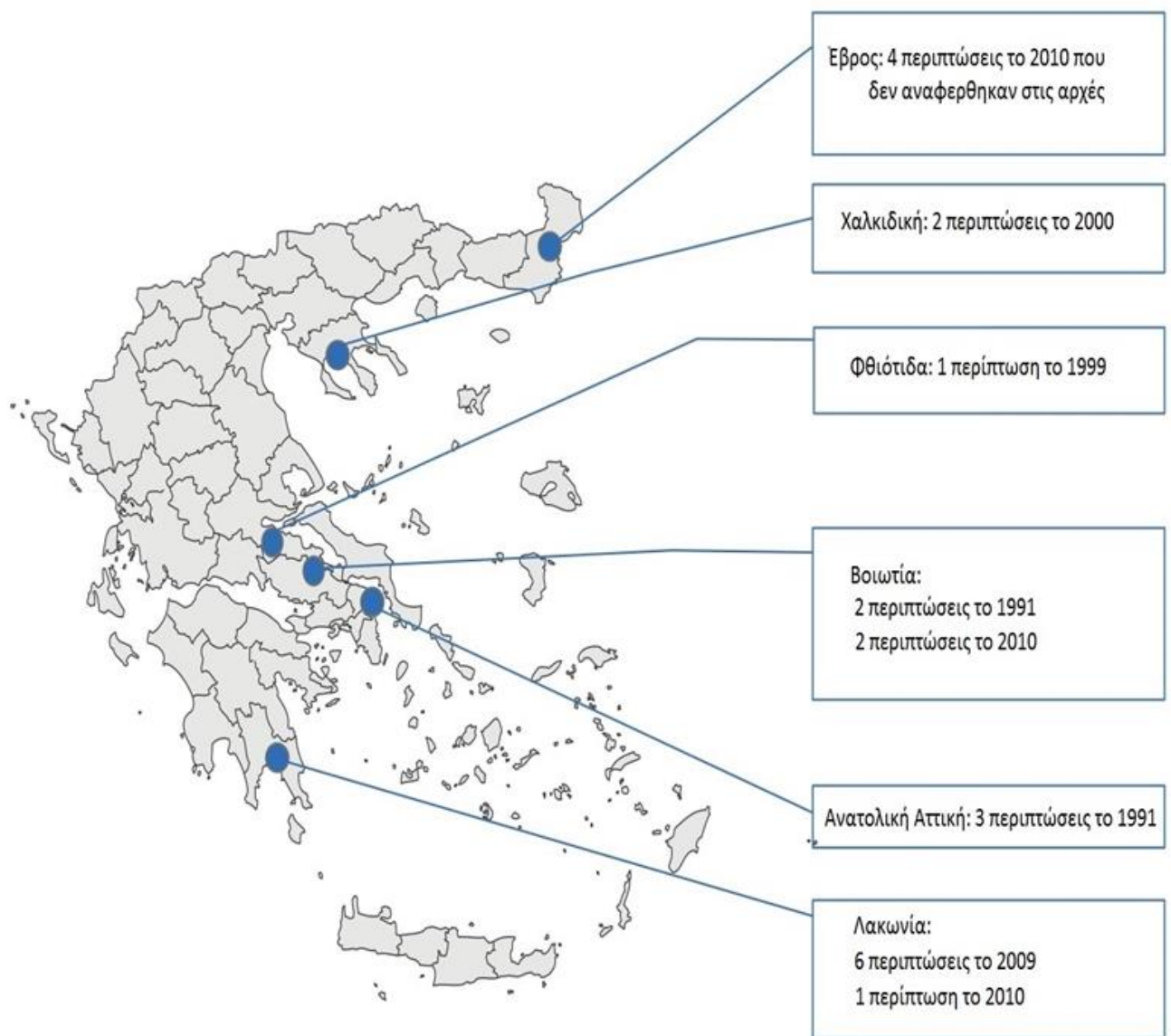


Νοσημάτων (ECDC), το έτος 2016 καταγράφηκαν πάνω από 7.000 κρούσματα της νόσου σε ευρωπαϊκές χώρες, τα οποία ήταν εισαγόμενα [2-3].



**Εικόνα 3** Αριθμός των περιπτώσεων της ελονοσίας σύμφωνα με την πηγή μόλυνσης στην Ελλάδα, στη διάρκεια των ετών 1975-2010 (n=1,419). Τρόποι μόλυνσης: εισαγόμενα κρούσματα, αυτόχθονα κρούσματα, υποτροπή (υπνοζώιτες από P. νίναχ) κα μετάγγιση αίματος [14].





**Εικόνα 4** Νομαρχιακές περιοχές με αυτόχθονα κρούσματα ελονοσίας στην Ελλάδα, έτη 1991-2010 (n=21) [14].

**Πίνακας 2** Κρούσματα ελονοσίας με επιδημιολογική κατάταξη κρούσματος (εισαγόμενα κρούσματα/κρούσματα με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης) και έτος νόσησης<sup>1</sup> (για εισαγόμενα) ή εκτιμώμενης προσβολής (για εγχώρια), Ελλάδα, έτη 2009-2018<sup>2</sup> [15].

| Έτος | Κατάταξη κρούσματος  |                                                        |
|------|----------------------|--------------------------------------------------------|
|      | Εισαγόμενα κρούσματα | Κρούσματα με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης <sup>3</sup> |
| 2009 | 44                   | 7                                                      |
| 2010 | 40                   | 4                                                      |
| 2011 | 54                   | 42                                                     |
| 2012 | 73                   | 20                                                     |
| 2013 | 22                   | 3                                                      |
| 2014 | 38                   | 0                                                      |
| 2015 | 79                   | 8                                                      |
| 2016 | 111                  | 6                                                      |
| 2017 | 100                  | 7                                                      |
| 2018 | 44                   | 11 <sup>4</sup>                                        |

1. Κρούσματα, χωρίς καταγραφή, κατατάχθηκαν σύμφωνα με το έτος δήλωσης ή νοσηλείας.
2. Δεν υπάρχουν καταγεγραμμένες υποτροπές κρουσμάτων, τρία κρούσματα ελονοσίας με άγνωστη κατάταξη (δύο το 2016 και ένα το 2018) και δύο εγχώρια κρούσματα από *P. malariae* (την περίοδο 2012).
3. Αφορά κρούσματα ελονοσίας με *P. vivax*, εκτός από ένα *P. falciparum* το έτος 2017.
4. Περιλαμβάνεται ένα κρούσμα το οποίο αποδόθηκε στην περίοδο μετάδοσης 2018, με έναρξη συμπτωμάτων όμως το 2019.

Επιπλέον, από το 2009 και μετά, αναφέρθηκαν κρούσματα ελονοσίας με το είδος *P. vivax* που δείχνουν εγχώρια μετάδοση (δηλαδή περιπτώσεις που δεν ανέφεραν ταξίδι σε ενδημικές χώρες σε προηγούμενο χρονικό διάστημα), σε διάφορα μέρη της χώρας, σχεδόν σε ετήσια βάση (Πίν. 3). Τα συγκεκριμένα περιστατικά αναφέρονται κυρίως ως σποραδικά κρούσματα αλλά και σε σειρά κρουσμάτων (κυρίως τα έτη 2011-2012). Τα περισσότερα μέρη όπου καταγράφηκαν εγχώρια κρούσματα ελονοσίας, τα τελευταία χρόνια, είναι αγροτικές περιοχές, που βρίσκονται κοντά σε υγροτόπους και φιλοξενούν μεγάλο ποσοστό ατόμων από χώρες ενδημικές στην ελονοσία (Πίν. 4-5) [2].

**Πίνακας 3** Κρούσματα ελονοσίας με *P. vivax* με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης και εκτιμώμενη Περιφέρεια και Περιφερειακή Ενότητα έκθεσης και έτος προσβολής, στην Ελλάδα, έτη 2009-2018 [15].

| Περιφέρεια                     | Περιφερειακή Ενότητα | Έτος προσβολής |          |           |           |          |          |          |          |          |           |
|--------------------------------|----------------------|----------------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|                                |                      | 2009           | 2010     | 2011      | 2012      | 2013     | 2014     | 2015     | 2016     | 2017     | 2018      |
| Πελοποννήσου                   | Λακωνίας             | 6              | 1        | 36        | 10        | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 0         |
| Αττικής                        | Ανατ. Αττικής        | 1              | 1        | 2         | 4         | 0        | 0        | 2        | 0        | 0        | 0         |
| Στερεάς Ελλάδας                | Βοιωτίας             | 0              | 2        | 1         | 2         | 0        | 0        | 1        | 0        | 1        | 0         |
|                                | Εύβοιας              | 0              | 0        | 2         | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0         |
| Θεσσαλίας                      | Καρδίτσας            | 0              | 0        | 0         | 2         | 1        | 0        | 0        | 0        | 1        | 0         |
|                                | Λάρισας              | 0              | 0        | 1         | 0         | 0        | 0        | 3        | 1        | 0        | 0         |
|                                | Τρικάλων             | 0              | 0        | 0         | 0         | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        | 1*        |
|                                | Μαγνησίας & Σποράδων | 0              | 0        | 0         | 0         | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 0         |
| Ανατολικής Μακεδονίας & Θράκης | Ξάνθης               | 0              | 0        | 0         | 2         | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0         |
|                                | Έβρου                | 0              | 0        | 0         | 0         | 2        | 0        | 0        | 0        | 0        | 2         |
| Κεντρικής Μακεδονίας           | Θεσσαλονίκης         | 0              | 0        | 0         | 0         | 0        | 0        | 0        | 2        | 0        | 8         |
| Δυτικής Ελλάδας                | Αχαΐας               | 0              | 0        | 0         | 0         | 0        | 0        | 0        | 1        | 1        | 0         |
|                                | Ηλείας               | 0              | 0        | 0         | 0         | 0        | 0        | 0        | 1        | 2        | 0         |
|                                | Αιτωλοακαρνανίας     | 0              | 0        | 0         | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 0         |
| <b>Σύνολο</b>                  |                      | <b>7</b>       | <b>4</b> | <b>42</b> | <b>20</b> | <b>3</b> | <b>0</b> | <b>8</b> | <b>6</b> | <b>6</b> | <b>11</b> |

\*Κρούσμα που αποδόθηκε την περίοδο μετάδοσης 2018, με έναρξη συμπτωμάτων όμως το 2019.

**Πίνακας 4** Επιβεβαιωμένα κρούσματα ελονοσίας εργαστηριακά, με κατάταξη ανά είδος πλασμοδίου, επιδημιολογική κατάταξη και ιδιότητα, στην Ελλάδα, με έτος διάγνωσης 2019 (n=40) [15].

| Επιδημιολογική κατάταξη και ιδιότητα                           |            | <i>P. vivax</i> | <i>P. falciparum</i> | <i>P. ovale</i> | <i>P. falciparum</i> + <i>P. ovale</i> | <i>P. non-falciparum</i> | Σύνολο |
|----------------------------------------------------------------|------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------------------------|--------------------------|--------|
| Εισαγόμενα κρούσματα                                           | Μετανάστες | 13              | 5                    | 0               | 0                                      | 1                        | 19     |
|                                                                | Ταξιδιώτες | 1               | 15                   | 2               | 1                                      | 0                        | 19     |
| Με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης 1 <sup>ης</sup> γενιάς το 2019 |            | 1               | 0                    | 0               | 0                                      | 0                        | 1      |
| Με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης 1 <sup>ης</sup> γενιάς το 2018 |            | 1               | 0                    | 0               | 0                                      | 0                        | 1      |

**Πίνακας 5** Κρούσματα ελονοσίας ανά τόπο κατοικίας/έκθεσης, επιδημιολογική κατάταξη και ιδιότητα, στην Ελλάδα, με έτος διάγνωσης 2019 (n=40) [15].

| Π.Ε. κατοικίας<br>(εισαγόμενα) ή<br>εκτιμώμενης έκθεσης | Κατάταξη κρουσμάτων ελονοσίας     |                                  |           |                                                  |                                                  |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                                         | Εισαγόμενα                        |                                  |           | Με ενδείξεις<br>εγχώριας<br>μετάδοσης<br>το 2019 | Με ενδείξεις<br>εγχώριας<br>μετάδοσης<br>το 2018 |
|                                                         | Μετανάστες από<br>ενδημικές χώρες | Ταξιδιώτες σε<br>ενδημικές χώρες | Σύνολο    |                                                  |                                                  |
| Κεντρικού Τομέα Αθηνών                                  | 6                                 | 4                                | 10        | 0                                                | 0                                                |
| Ανατολικής Αττικής                                      | 2                                 | 1                                | 3         | 0                                                | 0                                                |
| Βόρειου Τομέα Αθηνών                                    | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Δυτικής Αττικής                                         | 1                                 | 0                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Νότιου Τομέα Αθηνών                                     | 0                                 | 2                                | 2         | 0                                                | 0                                                |
| Πειραιώς                                                | 1                                 | 2                                | 3         | 0                                                | 0                                                |
| Αιτωλοακαρνανίας                                        | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Έβρου                                                   | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Ηλείας/ Κεφαλληνίας                                     | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Θεσσαλονίκης                                            | 1                                 | 0                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Ιωαννίνων                                               | 1                                 | 0                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Κω                                                      | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Κέρκυρας                                                | 1                                 | 1                                | 2         | 0                                                | 0                                                |
| Λακωνίας                                                | 2                                 | 0                                | 2         | 0                                                | 0                                                |
| Λέρου (Π.Ε. Καλύμνου)                                   | 1                                 | 0                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Λέσβου                                                  | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Κυκλίας                                                 | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Μεσσηνίας                                               | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Πιερίας                                                 | 1                                 | 0                                | 1         | 1                                                | 0                                                |
| Σάμου                                                   | 1                                 | 0                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Τρικάλων                                                | 0                                 | 0                                | 0         | 0                                                | 1                                                |
| Χίου                                                    | 1                                 | 0                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| Άγνωστη                                                 | 0                                 | 1                                | 1         | 0                                                | 0                                                |
| <b>Σύνολο</b>                                           | <b>19</b>                         | <b>19</b>                        | <b>38</b> | <b>1</b>                                         | <b>1</b>                                         |

Το έτος 2011, η Ελλάδα ανέφερε 36 κρούσματα λοίμωξης από ελονοσία. Αυτά αφορούσαν κρούσματα από *P. vivax* με την πλειονότητα των οποίων (30 κρούσματα) να συνδέεται με μία περιοχή της Λακωνίας, στην περιφέρεια Πελοποννήσου της νότιας Ελλάδας. Η συγκεκριμένη περιοχή ήταν ο Ευρώτας και οι περιπτώσεις ελονοσίας που εντοπίστηκαν ήταν κυρίως στο χωριό Σκάλα και στην πεδιάδα της Έλους (Εικ. 5). Σε αυτή την περιοχή ο κυρίαρχος φορέας ήταν το *Anopheles sacharovi*. Στο σύνολο των 30 κρουσμάτων, τα 14 ήταν σε Έλληνες πολίτες χωρίς ιστορικό ταξιδιού, σε χώρα όπου ενδημεί η νόσος και τα 16 ήταν σε μετανάστες κυρίως από το Πακιστάν, οι οποίοι εργάζονταν στην περιοχή με απροσδιόριστο καθεστώς εισαγωγής [13].



**Εικόνα 5** Χάρτης της Λακωνίας και του δήμου Ευρώτα, που δείχνει τη θέση των σημαντικότερων τοποθεσιών των αναφερόμενων κρουσμάτων ελονοσίας [13].

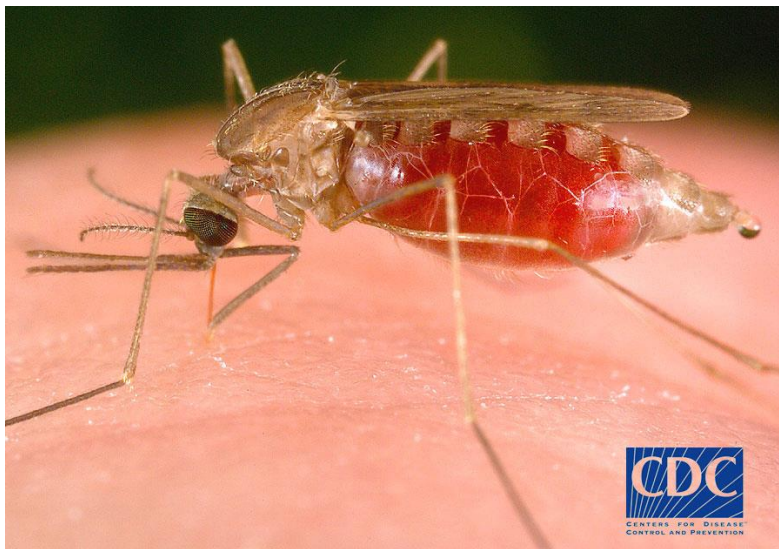
Στα τελευταία επιδημιολογικά δεδομένα της νόσου στην Ελλάδα, δηλαδή του έτους 2020, έχουν δηλωθεί είκοσι τρία (23) στο σύνολο εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα στον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (Ε.Ο.Δ.Υ) (Πίν. 6). Από αυτά, τα είκοσι ένα (21) ήταν εισαγόμενα και πιο συγκεκριμένα τα έντεκα (11) ήταν μετανάστες που ήρθαν από χώρες που ενδημεί η ελονοσία (από τις χώρες Αφρική και της Ινδία) και τα υπόλοιπα δέκα (10) κρούσματα ήταν ταξιδιώτες (που επέστρεψαν από χώρες της Αφρικής). Το ένα από τα υπόλοιπα δύο (2) κρούσματα, αφορούσε έναν ασθενή, με πιθανή τοποθεσία έκθεσης τον οικισμό του Δήμου Ορεστιάδας και εμφάνιση των συμπτωμάτων του την εβδομάδα 33/2020. Για το συγκεκριμένο, που επιβεβαιώθηκε με ελονοσία *P. vivax*, υφίστανται ενδείξεις για εγχώρια μετάδοση πρώτης γενιάς. Επιπλέον, το τελευταίο ήταν κρούσμα *P. falciparum*, που δηλώθηκε τον Δεκέμβριο του έτους 2020, στον Ε.Ο.Δ.Υ. Και στο τελευταίο υπάρχουν ενδείξεις για εγχώρια μετάδοση πρώτης γενιάς [3].

**Πίνακας 6** Κρούσματα ελονοσίας ανά είδος πλασμοδίου, επιδημιολογική κατάταξη και ιδιότητα, στην Ελλάδα, έτος 2020 [3].

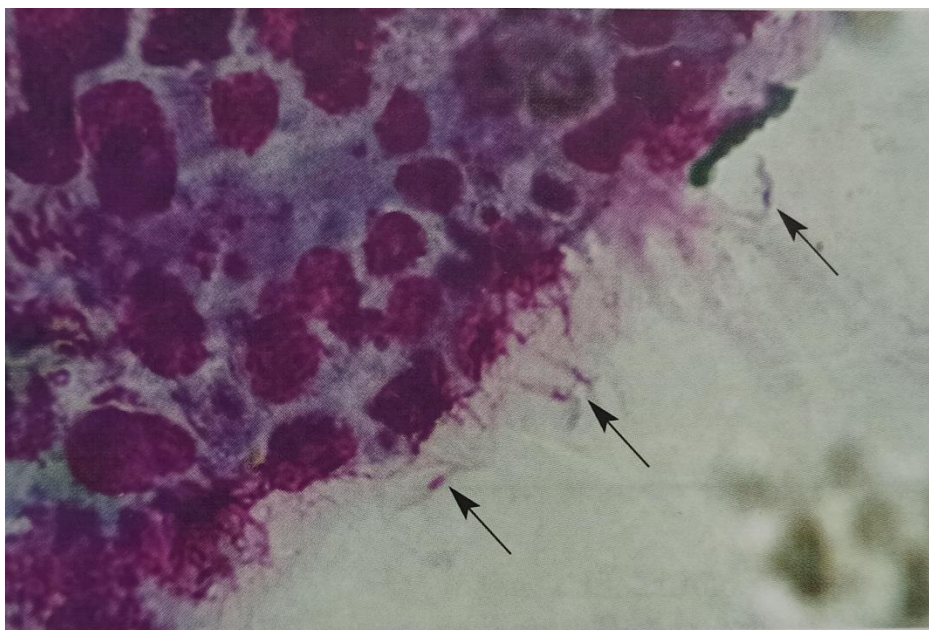
| Επιδημιολογική κατάταξη και ιδιότητα                   |            | <i>P.vivax</i> | <i>P.falciparum</i> | <i>P.ovale</i> | <i>P.vivax + P.falciparum</i> | Σύνολο |
|--------------------------------------------------------|------------|----------------|---------------------|----------------|-------------------------------|--------|
| Εισαγόμενα κρούσματα                                   | Μετανάστες | 3              | 7                   | 1              | 0                             | 11     |
|                                                        | Ταξιδιώτες | 0              | 8                   | 1              | 1                             | 10     |
| Με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης 1 <sup>ης</sup> γενιάς |            | 1              | 1                   | 0              | 0                             | 2      |

### 1.3 Τρόποι μετάδοσης της ελονοσίας

Ο βασικός τρόπος μετάδοσης της ελονοσίας στον άνθρωπο είναι μέσω του δήγματος (τσιμπήματος) από το μολυσμένο θηλυκό Ανωφελές κουνούπι (*Anopheles*) (Εικ. 6). Το μολυσμένο κουνούπι, από το παράσιτο «πλασμώδιο» της ελονοσίας, όταν τσιμπήσει άλλο άτομο θα αποβάλει από τους σιελογόνους αδένες σποροζωΐδια που υπάρχουν στο σίελό του (Εικ. 7) [7, 10].



**Εικόνα 6** Το κουνούπι του γένους Ανωφελές [16].

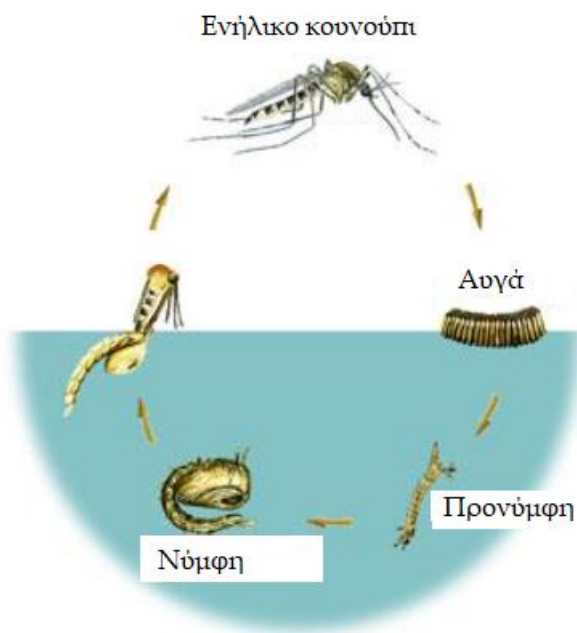


**Εικόνα 7** Σποροζωΐδια πλασμωδίων, με χρώση Giemsa, που υπάρχουν στους σιελογόνους αδένες του μολυσμένου Ανωφελούς [6].



Τα είδη των κουνουπιών που υπάρχουν αριθμούνται περίπου στα 3.500 και ομαδοποιούνται σε 41 γένη. Το γένος *Anopheles* έχει περίπου 430 είδη από τα οποία, μόνο τα 30-40 μπορούν να μεταδώσουν τη νόσο (δηλαδή, είναι «φορείς») [16]. Τα είδη των Ανωφελών κουνουπιών που έχουν βρεθεί στην Ελλάδα και μπορούν να μεταδώσουν το πλασμίδιο της ελονοσίας είναι το *Anopheles sacharovi*, το *Anopheles superpictus* και το *Anopheles maculipennis* [14, 17-18].

Στον κύκλο ζωής όλων των κουνουπιών, υφίστανται τέσσερα στάδια ανάπτυξης (Εικ 8). Αυτά είναι το αυγό, η προνύμφη, η νύμφη και το ενήλικο στάδιο, τα οποία ισχύουν και για τα *Anopheles*, αντίστοιχα. Η μορφολογία του λεπτού σώματος των ενήλικων αποτελείται από τρία τμήματα τα οποία είναι το κεφάλι, ο θώρακας και η κοιλιά. Το τμήμα της κεφαλής έχει μια επιμήκη προβοσκίδα προβολής, την οποία χρησιμοποιεί το κουνούπι για τη σίτιση. Το *Anopheles* κουνούπι που μπορεί να μεταδώσει τη νόσο μέσω δήγματος είναι μόνο το θηλυκό. Το αρσενικό δεν αποτελεί κίνδυνο για μετάδοση της ελονοσίας ή άλλων ασθενειών [16].



**Εικόνα 8** Στάδια ανάπτυξης κουνουπιού [19].



Τα θηλυκά λαμβάνουν γεύματα αίματος που χρησιμεύουν ως πηγή πρωτεΐνης για την παραγωγή αυγών. Αυτά τα γεύματα αίματος αποτελούν τον συνδετικό κρίκο, μεταξύ των ανθρώπων και των ξενιστών κουνουπιών, ώστε να ολοκληρωθεί ο κύκλος ζωής των παρασίτων.

Ο αριθμός των αυγών που γεννούν τα ενήλικα θηλυκά είναι 50-200 ανά ωοτοκία. Τα αυγά τοποθετούνται μεμονωμένα απευθείας στο νερό. Η διάρκεια από το αυγό έως το ενήλικο στάδιο ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ειδών και επηρεάζεται έντονα από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Τα κουνούπια μπορούν να αναπτυχθούν από αυγό σε ενήλικα σε μόλις επτά ημέρες, αλλά συνήθως διαρκούν 10-14 ημέρες σε συνθήκες τροπικών χωρών [16].

Εναλλακτικοί τρόποι μετάδοσης της νόσου αποτελούν η μετάγγιση, μολυσμένου από το παράσιτο, αίματος και η νύξη από αιχμηρό αντικείμενο (π.χ. σύριγγα), αντίστοιχα. Αυξημένο κίνδυνο διατρέχουν ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση, τυχόν μολυσμένων από το παράσιτο, οργάνων ενώ, έχει καταγραφεί και η περιγενετική μετάδοση της νόσου (από την μολυσμένη μητέρα στο έμβρυο, πριν ή κατά τη διάρκεια του τοκετού («συγγενής» ελονοσία). Τέλος, η νόσος δεν μεταδίδεται με άμεσο τρόπο από άτομο σε άτομο, όπως η γρίπη και δεν υφίσταται η ύπαρξη σεξουαλικής μετάδοσης. Επιπρόσθετα, η περιστασιακή επαφή με μολυσμένα άτομα από ελονοσία δεν αποτελεί τρόπο μετάδοσης της νόσου (π.χ. άγγιγμα, φιλί) [10, 20].

### 1.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την μετάδοση της νόσου

Ένας σημαντικός παράγοντας στη μετάδοση της ελονοσίας είναι η προτιμώμενη πηγή σίτισης των κουνουπιών. Ένα είδος *Anopheles* το οποίο προτιμά να λαμβάνει γεύματα αίματος από ανθρώπους (ανθρωποφιλία) και όχι από ζώα όπως βοοειδή (ζωοφιλία) καθιστά πιο πιθανή την επίτευξη της μετάδοσης των παρασίτων της ελονοσίας από το ένα άτομο στο άλλο [16].

Η μετάδοση της ελονοσίας απαιτεί την αλληλεπίδραση μεταξύ του ξενιστή, του φορέα και του παρασίτου. Οι ασθένειες που μεταδίδονται από τον φορέα, όπως η ελονοσία επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από κλιματολογικούς παράγοντες, οι οποίοι αυξάνουν τον ρυθμό μετάδοσης και επεκτείνουν τη γεωγραφική τους παρουσία. Η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις και η υγρασία αποτελούν σημαντικό ρόλο. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία επηρεάζει τα κουνούπια σε κάθε στάδιο του κύκλου ζωής τους [21]. Η βλάστηση διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στον προσδιορισμό της κατανομής των βροχοπτώσεων, με αποτέλεσμα επιρροής στη διαθεσιμότητα νερού σε προσωρινές μικρές λίμνες, δημιουργώντας ένα περιβάλλον αναπαραγωγής για τα κουνούπια [21]. Επιπλέον, σε μεγάλα υψόμετρα τα κουνούπια δεν επιβιώνουν, ώστε να μεταδώσουν τη νόσο [22]. Ορεινές περιοχές με υψόμετρο πάνω από 2.500 μέτρα, αποτελούν μέρη ελεύθερα ελονοσίας. Περιοχές ορεινών περιοχών μεταξύ 1.500-2.500 μέτρων επηρεάζονται από συχνές επιδημίες. Πεδινές περιοχές κάτω των 1.500 μέτρων αποτελούν εποχιακό μοτίβο μετάδοσης [23].

Οι πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την επίτευξη της ανάπτυξης του παρασίτου της ελονοσίας, στο ανωφελές κουνούπι (από το στάδιο του «γαμετοκύτταρου» έως το στάδιο του «σποροζωίτη») είναι η θερμοκρασία [16]. Έχουν καταγραφεί συγκεκριμένα εύρη θερμοκρασίας για την ανάπτυξη του παρασίτου στο κουνούπι, με το βέλτιστο να είναι μεταξύ 25°C και 30°C. Η ελάχιστη θερμοκρασία που παρατηρείται για την επιβίωση του *P. falciparum* είναι 18°C και η μέγιστη έχει αναφερθεί στους 40°C [21]. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες συμβάλλουν στην επιτάχυνση της ανάπτυξης του παρασίτου στο ανωφελές. Ακόμα ένας παράγοντας αποτελεί η επιβίωση του κουνουπιού. Αν το κουνούπι ξενιστής επιβιώσει αρκετά, το παράσιτο θα πραγματοποιήσει την ολοκλήρωση του βιολογικού του κύκλου σε αυτό. Η απαιτούμενη διάρκεια για τον «σπορογονικό» ή «εξωγενή» κύκλο είναι 9 έως 18 ημέρες [16].

Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες προερχόμενοι από τη συμπεριφορά και τα πολιτιστικά χαρακτηριστικά του εκτεθειμένου πληθυσμού (τοποθεσία των σπιτιών, διαθεσιμότητα και η χρήση σιτών-εντομοαπωθητικών, πρόσβαση στην υγεία και το σύστημα φροντίδας). Επιπρόσθετα, τα διεθνή ταξίδια η μετανάστευση, η αστικοποίηση, η υποβάθμιση των υποδομών υγείας, οι πόλεμοι και οι φυσικές καταστροφές μπορούν να συμβάλλουν στον τρόπο μετάδοσης της ελονοσίας. Πιο συγκεκριμένα, μετακίνηση μολυσμένων ατόμων από υψηλά ενδημικές χώρες σε περιοχές όπου η μετάδοση είναι χαμηλότερη ή απουσιάζει, την καθιστά ως παράγοντα αύξησης της μετάδοσης της νόσου [21-22].

Τα διάφορα γενετικά βιολογικά χαρακτηριστικά δύνανται να αποτελέσουν προστατευτικούς παράγοντες έναντι ορισμένων πλασμωνδίων ελονοσίας. Οι εν λόγω γενετικοί παράγοντες σχετίζονται με τα ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια και έχουν αποδειχθεί επιδημιολογικά σημαντικοί. Τα άτομα που φέρουν το δρεπανοκυτταρικό χαρακτηριστικό (ετεροζυγώτες για το ανώμαλο γονίδιο αιμοσφαιρίνης HbS) προστατεύονται σχετικά από το *P. falciparum* και έτσι απολαμβάνουν ένα βιολογικό πλεονέκτημα [24]. Επειδή το πλασμώδιο *P. falciparum* η κύρια αιτία θανάτου στην Αφρική, το χαρακτηριστικό των δρεπανοκυττάρων παρουσιάζεται πλέον συχνότερα στην Αφρική και σε άτομα αφρικανικής καταγωγής από ό,τι σε άλλες ομάδες πληθυσμιακές ομάδες. Γενικά, ο επιπολασμός διαταραχών που σχετίζονται με αιμοσφαιρίνη και λοιπές κυτταρικές ομάδες του αίματος, όπως η αιμοσφαιρίνη C, η ανεπάρκεια θαλασσαιμιών και G6PD, είναι πιο διαδεδομένες σε ενδημικές περιοχές της ελονοσίας και πιστεύεται ότι παρέχουν προστασία από την ελονοσία.

Άτομα, τα οποία είναι αρνητικά για την ομάδα αίματος Duffy, έχουν ερυθρά αιμοσφαίρια που είναι ανθεκτικά σε μολύνσεις από το *P. vivax*. Δεδομένου ότι η πλειοψηφία των Αφρικανών είναι Duffy αρνητικοί, το *P. vivax* είναι σπάνιο στην υποσαχάρια Αφρική, ειδικά στη Δυτική Αφρική. Σε αυτήν την περιοχή, η θέση του *P. vivax* έχει αντικατασταθεί από το *P. ovale*, ένα πολύ παρόμοιο παράσιτο που μολύνει Duffy-αρνητικά άτομα [24]. Επιπρόσθετα, η επίκτητη ανοσία επηρεάζει σημαντικά τον τρόπο με τον οποίο η ελονοσία επηρεάζει ένα άτομο και μια κοινότητα. Έπειτα από πολλαπλές προσβολές από ένα ή περισσότερα είδη πλασμωνδίων, ένα άτομο μπορεί να αναπτύξει μερικώς προστατευτική ανοσία. Τέτοια «ημι-ανοσοποιημένα» άτομα συχνά μπορούν ακόμη να μολυνθούν από

παράσιτα της ελονοσίας, αλλά μπορεί να μην αναπτύξουν σοβαρή ασθένεια και συχνά δεν έχουν τυπικά συμπτώματα ελονοσίας [24].

Εκτός από τους ανθρώπους, τα κουνούπια και το παράσιτο ανέπτυξαν ιδιαίτερους μηχανισμούς προκειμένου να επιβιώσουν στις κρύες χώρες, στη διάρκεια της περιόδου του χειμώνα και της ξηρασίας [21]. Έπειτα από παρατεταμένη έκθεση για αρκετές γενιές, σε ένα εντομοκτόνο (π.χ. ψεκασμός εσωτερικών χώρων με εντομοκτόνα, ITN), μπορεί να αναπτύξουν ανθεκτικότητα. Συνεπώς, αποκτούν την ικανότητα να επιβιώσουν σε επαφή με ένα εντομοκτόνο, το οποίο είναι ο κύριος τρόπος για τη θανάτωση κουνουπιών. Δεδομένου ότι τα κουνούπια μπορούν να έχουν πολλές γενιές ανά έτος, υψηλά επίπεδα αντοχής μπορούν να προκύψουν πολύ γρήγορα [24].

## 1.4 Πλασμώδια της ελονοσίας

Τα τέσσερα είδη πλασμοδίων που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν την νόσο στον άνθρωπο είναι το *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* και *P. malariae*. Ένα πέμπτο είδος (*P. knowlesi*) έχει πρόσφατα τεκμηριωθεί ότι προκαλεί λοιμώξεις σε ανθρώπους σε χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας. Πολύ σπάνιες περιπτώσεις ελονοσίας έχουν αναφερθεί λόγω λοιπών ειδών, όπως *P. brasilianum*, *P. cynomolgi*, *P. cynomolgi bastianellii*, *P. inui*, *P. rhodiani*, *P. schwetzi*, *P. semiovale*, *P. simium* και *P. eylesi* [9-11].

Αρχικά, είναι το *P. falciparum*, το οποίο μολύνει άτομα σε παγκόσμιο επίπεδο, με πιο έντονη την παρουσία του στην Αφρική. Το συγκεκριμένο πλασμώδιο προκαλεί σοβαρή ελονοσία, διότι έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται γρήγορα στο αίμα και να προκαλεί σοβαρή απώλεια αίματος (αναιμία). Ακόμα, τα παράσιτα του συγκεκριμένου είδους μπορούν να φράξουν μικρά αιμοφόρα αγγεία. Το χαρακτηριστικό αυτό, όταν συμβεί στον εγκέφαλο, το αποτέλεσμα είναι η εγκεφαλική ελονοσία, το οποίο είναι αρκετά πιθανό να οδηγήσει στο θάνατο.

Το είδος *P. vivax*, είναι αρκετά διαδεδομένο είδος πλασμοδίου, το οποίο εντοπίζεται κυρίως στην Ασία, τη Λατινική Αμερική και σε ορισμένα μέρη της Αφρικής. Το *P. vivax* (καθώς και το *P. ovale*) εμφανίζουν λανθάνουσα μορφή στο ήπαρ, γνωστή ως "υπνοζωίτες". Οι υπνοζωίτες ενεργοποιούνται και εισβάλλουν στο αίμα αρκετούς μήνες ή ακόμα και χρόνια, μετά την μόλυνση που προκλήθηκε από το κουνούπι, γνωστή ως υποτροπή της νόσου.

Ακόμα ένα είδος αποτελεί το *P. ovale*. Η παρουσία του είναι κυρίως αισθητή, στη Δυτική Αφρική και στα νησιά του δυτικού Ειρηνικού. Το εν λόγω πλασμώδιο είναι βιολογικά και μορφολογικά παρόμοιο με το *P. vivax*. Η διαφορά του είναι ότι μπορεί να μολύνει τα άτομα που είναι αρνητικά για την ομάδα αίματος Duffy, εύρημα που απαντάται συχνά σε κατοίκους της υποσαχάριας Αφρικής. Αυτή είναι η βασική αιτία για την κυρίαρχη θέση του στις μολύνσεις στην χώρα αυτή.

Το *P. malariae* είναι αυτό, που παρουσιάζει κρούσματα σε όλο τον κόσμο. Ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα είδη, χάρη στο χαρακτηριστικό του τεταρταίου κύκλου που παρουσιάζει (κύκλος τριών ημερών). Το *P. malariae* προκαλεί χρόνια λοίμωξη ακόμη και εφ' όρου ζωής, αν δεν θεραπευτεί εγκαίρως. Στην περίπτωση της χρόνιας

λοίμωξης μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές, όπως το νεφρωσικό σύνδρομο.

Τέλος, το *P. knowlesi* βρίσκεται σε όλη τη Νοτιοανατολική Ασία ως φυσικό παθογόνο του πιθήκου, του είδους Μακάκα. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι αποτελεί σημαντική αιτία της ζωνοτικής ελονοσίας στην περιοχή και ειδικότερα στη Μαλαισία. Το *P. Knowlesi* έχει κύκλο αναπαραγωγής που διαρκεί μία ημέρα και έτσι μπορεί να προκαλέσει γρήγορα τη μετατροπή μίας περίπτωσης απλής λοίμωξης, σε μία σοβαρή λοίμωξη, πιθανόν με θανατηφόρα κατάληξη [25].

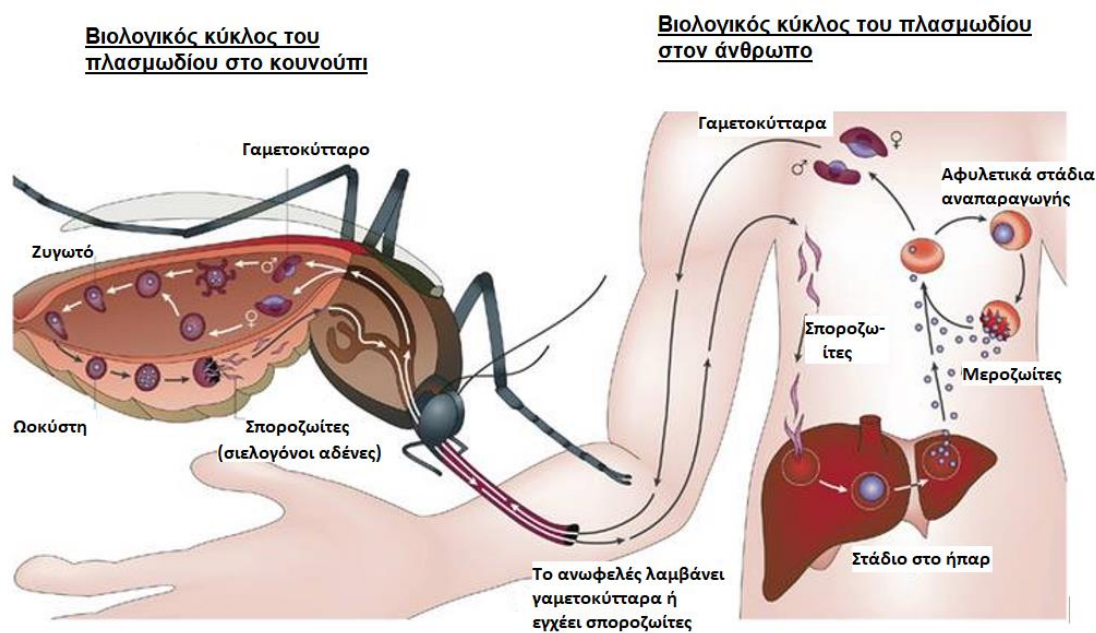
### 1.4.1 Βιολογικός κύκλος του παρασίτου

#### Ο βιολογικός κύκλος του πλασμοδίου στον άνθρωπο

Τα παράσιτα της ελονοσίας (*Plasmodium*) έχουν τη δυνατότητα να προσβάλλουν το αίμα αλλά και τους ιστούς. Τα πλασμώδια έχουν έλλειψη κινητικότητας και χαρακτηρίζονται από τις εναλλαγές αναπαραγωγής έμφυλου και άφυλου τρόπου, με την απαραίτητη χρήση δύο ξενιστών για την πραγματοποίηση αυτών των αναπαραγωγών. Συγκεκριμένα, τα φυλετικά στάδια αναπαραγωγής πραγματοποιούνται σε διάφορα αρθρόποδα, με σπορογονία, ενώ τα αφυλετικά στάδια αναπαραγωγής εκτελούνται σε διάφορα σπονδυλωτά με σχιζογονία, σε δύο φάσεις. Το ανωφελές κουνούπι αποτελεί τον κύριο ξενιστή, διότι σε αυτό γίνεται η έμφυλη αναπαραγωγή και ο άνθρωπος αποτελεί τον διάμεσο ξενιστή (Εικ. 9).

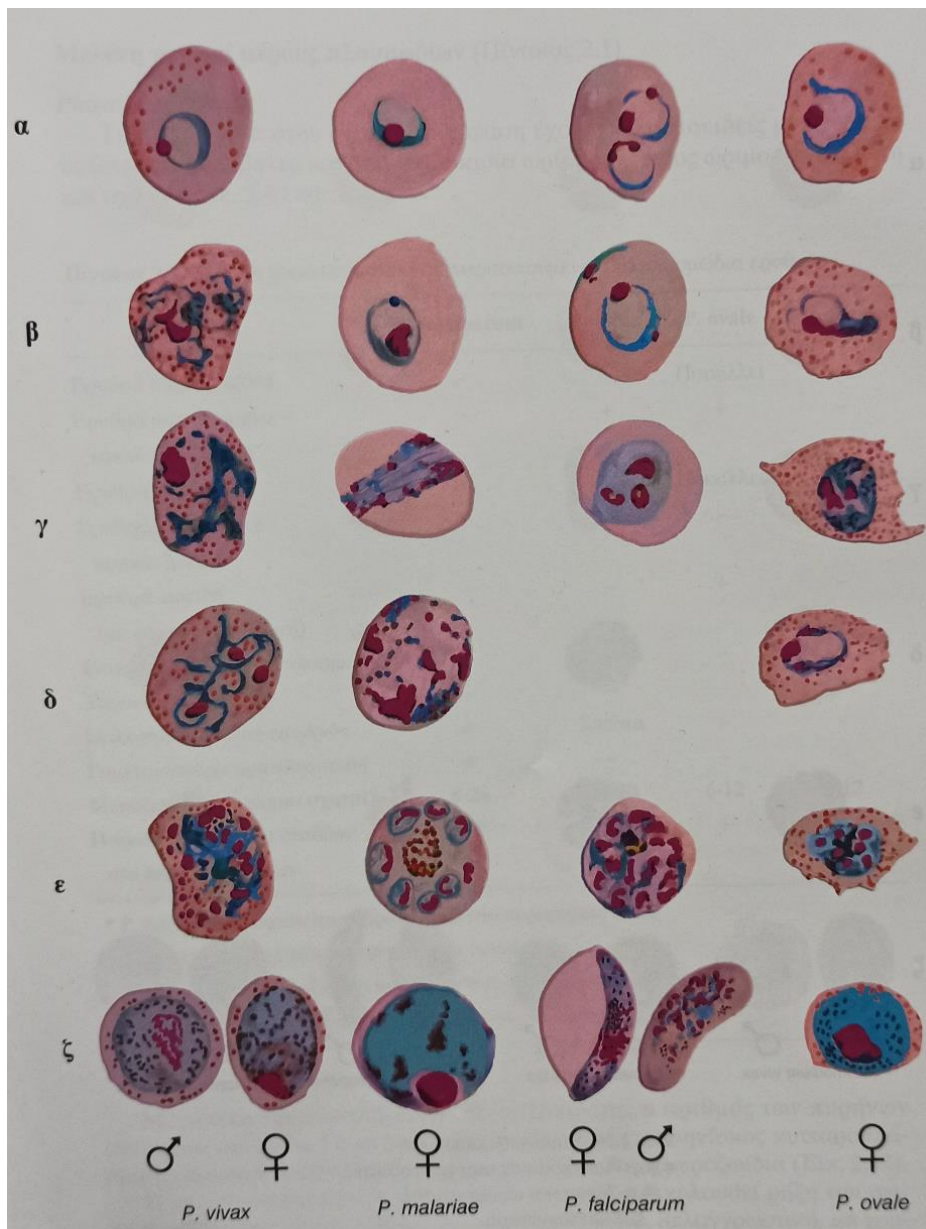
Το θηλυκό ανωφελές που έχει τραφεί από άτομο με ελονοσία, φέρει το παράσιτο στους σιελογόνους αδένες του, με την μορφή σποροζωιτών. Όταν το ανωφελές τσιμπήσει τον επόμενο άνθρωπο, μέσω του σίελου, θα μολύνει το κυκλοφορικό του σύστημα με τους λοιμογόνους σποροζωίτες του πλασμοδίου. Οι σποροζωίτες οδεύουν στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος, όπου γίνεται η διαδικασία της μονογονικής αναπαραγωγής (σχιζογονία) του παρασίτου. Σε αυτήν τη φάση ανάπτυξης, γνωστή και ως ενδοηπατική ή προερυθροκυτταρική σχιζογονία ή εξωερυθροκυτταρικός κύκλος, από ένα σποροζωίδιο προκύπτουν 10.000 έως και άνω από 30.000 θυγατρικά μεροζωίδια, εντός του κάθε ηπατοκυττάρου. Ο πολλαπλασιασμός αυτός διαρκεί οκτώ έως 25 ημέρες, αναλόγως του είδους του πλασμοδίου. Τα σποροζωίδια ορισμένων ειδών (π.χ., *P. vivax*, *P. ovale*) μπορούν να παραμείνουν σε λανθάνουσα κατάσταση (υπνοζωίτες) και δεν αναπαράγονται στο ήπαρ. Οι υπνοζωίτες ύστερα από παρέλευση μηνών ή ετών, από την αρχική κλινική νόσο, μπορούν να προκαλέσουν υποτροπή της λοίμωξης (υπόστροφη ελονοσία). Ακολούθως, τα διογκωμένα ηπατοκύτταρα υφίστανται ρήξη, απελευθερώνοντας στην κυκλοφορία τα παραχθέντα μεροζωίδια, τα οποία με τη σειρά τους οδεύουν προς τα ερυθροκύτταρα, προσκολλώνται στους ειδικούς υποδοχείς των επιφανειών τους, εισέρχονται σε αυτά και έτσι σηματοδοτείται η έναρξη του ερυθροκυτταρικού κύκλου (Εικ. 10). Μέσα στο ερυθρό τρέφονται με την αιμοσφαιρίνη (χρησιμοποιώντας το πρωτεϊνικό κλάσμα) και εξελίσσονται σε τροφοζωίτες. Στην αρχή της ενδοερυθροκυτταρικής τους φάσης σχηματίζονται οι

δακτυλιοειδείς μορφές, που είναι ίδιες μικροσκοπικά στα τέσσερα διαφορετικά είδη πλασμωδίων. Στη συνέχεια της ανάπτυξής τους, εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά του κάθε είδους και το παράσιτο παίρνει τη μορφή ακανόνιστου σχήματος μέσα στο ερυθρό κύτταρο. Ο ενδοερυθροκυτταρικός βιολογικός κύκλος ολοκληρώνεται έπειτα από 48 ώρες (72 ώρες για το *P. malariae*) και το παράσιτο καταφέρνει την κατάληψη του μεγαλύτερου μέρους του ερυθροκυττάρου, το οποίο ονομάζεται σχιστό. Με την ωρίμανση του σχιστού, το ερυθροκύτταρο διαρρηγνύεται και απελευθερώνονται έξι ως 30 θυγατρικά μεροζωΐδια. Το κάθε θυγατρικό μπορεί να εισβάλλει σε άλλο ερυθρό αιμοσφαίριο και να επαναλάβει έναν νέο κύκλο αναπαραγωγής. Μερικά μεροζωΐδια εξελίσσονται σε αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα εντός του ερυθρού. Τέλος, όταν το θηλυκό ανωφελές λάβει αίμα, μέσω δείγματος και προσλάβει ώριμα αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα, ο φυλετικός αναπαραγωγικός κύκλος της νόσου ξεκινά, παράγοντας σε τελικό στάδιο μολυσματικούς σποροζωΐτες για τον άνθρωπο. Το εν λόγω φυλετικό στάδιο αποτελεί αναγκαίο μέσο στη διατήρηση της νόσου σε ένα δεδομένο σύνολο πληθυσμού [6-7, 26].



**Εικόνα 9** Ο βιολογικός κύκλος ζωής του πλασμωδίου στον άνθρωπο και στο κουνούπι [27].





**Εικόνα 10** Η ανάπτυξη και τα διάφορα στάδια των πλασμωδίων ελονοσίας που υφίστανται στα ερυθρά, ανάλογα με το είδος (α,β,γ: άωροι και ώριμοι τροφοζώιτες, δ,ε: άωρα και ώριμα σχιστά, ζ: γαμετοκύτταρα) [6].

### Ο βιολογικός κύκλος του πλασμωδίου στο κουνούπι

Τα θηλυκά ανωφελή κουνούπια όταν τσιμπήσουν ένα μολυσμένο άτομο με ελονοσία, θα λάβουν το γεύμα αίματος, το οποίο έχει γαμετοκύτταρα, με αποτέλεσμα να μολυνθούν και αυτά. Στο μεσεντέριο των κουνουπιών, τα παράσιτα είναι σε θέση να διαφοροποιηθούν στις σεξουαλικές τους μορφές, τους θηλυκούς μακρογαμέτες και τους αρσενικούς μικρογαμέτες και στη συνέχεια να υποστούν

σεξουαλική αναπαραγωγή προκειμένου να συνδυαστούν νέα χρωμοσωμικά σύνολα.

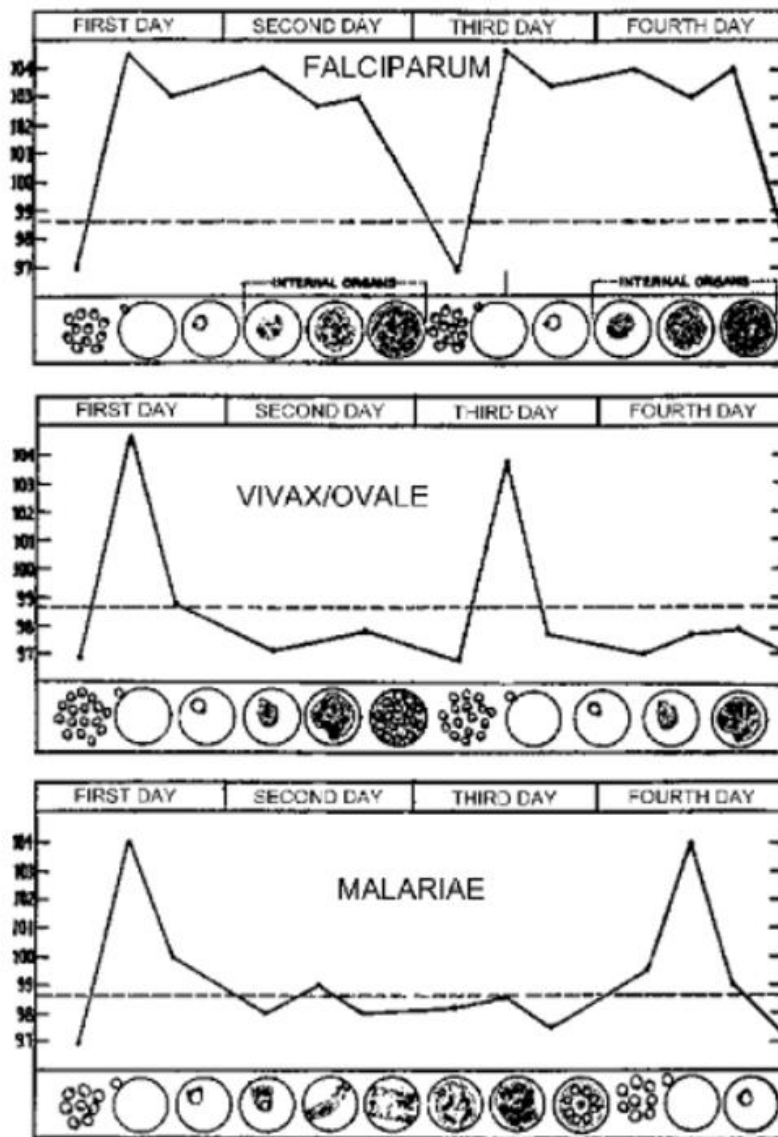
Η φάση αυτή διαρκεί περίπου 20 ώρες και περιλαμβάνει δύο φάσεις μετατροπής σταδίου. Στη πρώτη φάση, τα αρσενικά γαμετοκύτταρα διαφοροποιούν το πυρηνικό υλικό και το κυτταρόπλασμά τους και παράγουν αρκετούς γαμέτες, οι οποίοι φέρουν μαστίγιο (μαστιγοφόρο αρσενικό γαμετοκύτταρο). Στη δεύτερη φάση, αφού αποκολληθούν οι γαμέτες διεισδύουν στα θηλυκά γαμετοκύτταρα και σχηματίζουν επιμήκη ζυγωτά, τους ωοκινέτες, που φέρουν κινητικότητα. Οι ωοκινέτες, αμέσως αφού σχηματιστούν εξέρχονται από τον αυλό του εντέρου, διαπερνώντας τη στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντερίου του κουνουπιού. Στη συνέχεια, εγκαθίστανται στο βασικό ιστό του επιθηλίου του εντέρου, δηλαδή στην εξωτερική επιφάνεια του εντέρου και μετατρέπονται σε άμισχες ωοκύστες, στις οποίες πραγματοποιείται η σπορογονία (σεξουαλική αναπαραγωγή). Αυτή η φάση αναπαραγωγής διαρκεί περίπου δύο εβδομάδες και οδηγεί στον σχηματισμό πολυάριθμων μολυσματικών σποροζωϊτών, μέσα στις ωοκύστες. Οι ωοκύστες υφίστανται ρήξη με την ωρίμανση των σποροζωϊτών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή τους στη σωματική κοιλότητα του κουνουπιού, από όπου μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες. Από εκεί με την επόμενη σίτιση αίματος, μέσω δήγματος, του κουνουπιού, θα απελευθερωθούν στο ανθρώπινο χόριο, ολοκληρώνοντας έτσι τον κύκλο ζωής του πλασμοδίου [5, 28].

## 1.5 Κλινική εικόνα ασθενών με ελονοσία

Η μόλυνση με πλασμώδια της ελονοσίας μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλα συμπτώματα, από πολύ ήπια ή απουσία αυτών, έως και εκδήλωση σοβαρής ασθένειας, ακόμη και θάνατο. Το σύνολο των κλινικών συμπτωμάτων επισυμβαίνει κατά την διάρκεια εκδήλωσης των αφυλετικών ερυθροκυτταρικών σταδίων των διαφόρων πλασμωδίων της ελονοσίας. Με την ανάπτυξη του παρασίτου στο ερυθροκύτταρο, πολλές ουσίες, όπως η χρωστική αιμοζωίνης και λοιποί τοξικοί παράγοντες (π.χ. γλυκόζη φωσφορικής ισομεράσης), συσσωρεύονται μέσα στα μολυσμένα ερυθρά. Όταν τα μολυσμένα ερυθροκύτταρα λύνονται, οι ουσίες αυτές απελευθερώνονται μαζί με διηθητικούς μεροζωίτες στην κυκλοφορία του αίματος. Η αιμοζωίνη και οι τοξικοί παράγοντες διεγείρουν τα μακροφάγα και άλλα κύτταρα παράγοντας κυτοκίνες και λοιπούς διαλυτούς παράγοντες, οι οποίοι δρουν προκαλώντας πυρετό και ρίγη και πιθανώς, επηρεάζουν άλλες σοβαρές παθοφυσιολογίες σχετιζόμενες με την ελονοσία [29].

Τα παράσιτα με την είσοδό τους στα ερυθρά κύτταρα, τον πολλαπλασιασμό τους μέσα σε αυτά και την ρήξη της μεμβράνης αυτών προκαλείται αιμόλυση, η οποία μπορεί να είναι μέτρια ή πολύ σοβαρή, κυρίως ενδοαγγειακή. Η αιμόλυση μπορεί να είναι χρόνια (χρόνια ελονοσία) ή να παρουσιάζει οξεία αιμολυτικά επεισόδια, συνοδευόμενα από πυρετό, ρίγος, οσφυαλγία και άλλα. Τα *P. vivax*, *P. ovale* και το *P. malariae* προτιμούν τα ερυθρά κύτταρα, που είναι πιο γηρασμένα και όχι τόσο τα δικτυερρυθροκύτταρα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση μέτριας παρασιταιμίας. Από την άλλη πλευρά, το *P. falciparum* δεν κάνει διακρίσεις στα ερυθρά και προκαλεί υψηλή παρασιταιμία και πολύ πιο σοβαρές εργαστηριακές κλινικές εκδηλώσεις [30].

Η κλασική επίθεση ελονοσίας, η οποία παρατηρείται σπάνια, διαρκεί 6-10 ώρες και αποτελείται από το κρύο στάδιο (αίσθηση κρύου και τρέμουλο), το ζεστό στάδιο (πυρετός, πονοκέφαλοι, έμετοι, επιληπτικές κρίσεις σε μικρά παιδιά) και το στάδιο εφίδρωσης (εφίδρωση, επιστροφή στην κανονική θερμοκρασία και κόπωση). Οι επιθέσεις με τα «τριτοειδή» παράσιτα (*P. falciparum*, *P. vivax* και *P. ovale*) επισυμβαίνουν κάθε δεύτερη μέρα και με το τεταρταίο παράσιτο (*P. malariae*) κάθε τρίτη ημέρα, αντίστοιχα (Εικ. 11) [29].



**Εικόνα 11** Πυρετικό κύμα ελονοσίας ανάλογα το είδος πλασμωδίου [Στο πυρετικό κύμα πραγματοποιείται συγχρονισμένη απελευθέρωση μεροζωιδίων στο αίμα. Στο *P. falciparum*: ο πυρετός είναι συνεχής με 24ωρη περιοδικότητα. Στο *P. vivax* υπάρχει πυρετικό κύμα κάθε 48 ώρες (τριταίος πυρετός) και *P. malariae* για το κάθε 72 ώρες (τεταρταίος πυρετός)] [31].

Στις πιο συχνές περιπτώσεις, ο ασθενής παρουσιάζει έναν συνδυασμό των ακόλουθων συμπτωμάτων όπως η γενική αδιαθεσία, ο πυρετός, η κρυάδα, ο ιδρώτας, οι πονοκέφαλοι, η ναυτία με έμετο και πόνοι του σώματος. Σε χώρες όπου τα περιστατικά ελονοσίας είναι λιγοστά, αυτά τα συμπτώματα μπορεί να αποδοθούν σε γρίπη, κρυολόγημα ή άλλες συχνές λοιμώξεις. Αντίθετα, σε χώρες όπου η ελονοσία ενδημεί, οι άνθρωποι συχνά αναγνωρίζουν τα συμπτώματα ως ελονοσία και την αντιμετωπίζουν χωρίς διαγνωστική επιβεβαίωση («υποθετική θεραπεία»). Τα φυσικά ευρήματα μπορεί να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα: αδυναμία, αυξημένες

θερμοκρασίες, ιδρώτας, διόγκωση του σπλήνα, διόγκωση του ήπατος, ήπιος ίκτερος, αυξημένος ρυθμός αναπνοής.

Η σοβαρή ελονοσία παρατηρείται όταν οι λοιμώξεις περιπλέκονται από σοβαρές βλάβες οργάνων ή ανωμαλίες στο αίμα του ασθενούς ή στο μεταβολισμό. Οι εκδηλώσεις της περιλαμβάνουν εγκεφαλική ελονοσία με ανώμαλη συμπεριφορά, επιληπτικές κρίσεις, κώμα, εξασθένηση της συνείδησης ή άλλες νευρολογικές ανωμαλίες, σοβαρή αναιμία λόγω αιμόλυσης και οξεία νεφρική ανεπάρκεια. Ένα ακόμα σύμπτωμα είναι η αιμοσφαιρινουρία λόγω αιμόλυσης, όπως και το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), μια φλεγμονώδη αντίδραση στους πνεύμονες που αναστέλλει την ανταλλαγή οξυγόνου, η οποία μπορεί να συμβεί ακόμη και μετά τη μείωση των αριθμών των παρασίτων λόγω θεραπείας. Επίσης, εκδηλώνονται ανωμαλίες στην πήξη του αίματος, καθώς και υπερπαρασαιμία, όπου περισσότερο από το 5% των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μολύνονται από παράσιτα της ελονοσίας. Η χαμηλή αρτηριακή πίεση που προκαλείται από καρδιαγγειακή κατάρρευση είναι ένα ακόμη σύμπτωμα, όπως και η μεταβολική οξέωση, συχνά σε συνδυασμό με υπογλυκαιμία. Τέλος, η υπογλυκαιμία είναι ένα ακόμη σύμπτωμα, η οποία μπορεί να εμφανιστεί σε έγκυες γυναίκες με απλή ελονοσία ή έπειτα από θεραπεία με κινίνη [29]. Εν κατακλείδι, η σοβαρή ελονοσία αποτελεί ιατρική κατάσταση έκτακτης ανάγκης και χρήζει άμεσης ιατρικής αντιμετώπισης.

Οι ασθενείς που έχουν αναρρώσει από τα επεισόδια, στις λοιμώξεις *P. vivax* και *P. ovale*, μπορεί να υποστούν αρκετές επιθέσεις («υποτροπές») μετά από μήνες ή ακόμα και χρόνια χωρίς να έχουν συμπτώματα. Οι υποτροπές συμβαίνουν επειδή τα συγκεκριμένα είδη πλασμοδίων έχουν αδρανή παράσιτα στο στάδιο του ήπατος (υπνοζωίτες) που μπορεί να επανενεργοποιηθούν. Για τη μείωση της πιθανότητας υποτροπών υπάρχουν στην παρούσα φάση διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές [29].

### 1.5.1 Χρόνοι επώασης

Η περίοδος επώασης είναι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων, ύστερα από το δήγμα από το μολυσμένο ανωφελές. Η χρονική περίοδος αυτή κυμαίνεται από επτά έως 30 ημέρες τις περισσότερες φορές. Στην περίπτωση του *P. falciparum* παρατηρούνται συχνότερα οι μικρότερες περίοδοι, ενώ στο *P. malariae* οι μεγαλύτερες, αντίστοιχα. Οι χρόνοι επώασης στο *P. vivax* είναι 13-14 ημέρες, με ακραία όρια 8-28 ημέρες. Στο *P. falciparum* είναι 12-13 ημέρες, με ακραία όρια 7-29 ημέρες και στο *P. malariae* 30 ημέρες, με ακραία όρια 17-60 ημέρες, αντίστοιχα [6].

## 1.6 Ελονοσία και θεραπευτική αγωγή

Ιδανικά, η θεραπεία της ελονοσίας δεν πρέπει να ξεκινά αν δεν τεκμηριωθεί η διάγνωση από το εργαστήριο. Η «πιθανή θεραπεία», άνευ προηγούμενης εργαστηριακής επιβεβαίωσης, καλείται να δεσμευτεί για ακραίες περιστάσεις, όπως ισχυρή κλινική υποψία σοβαρής νόσου σε περιβάλλον όπου η απαιτούμενη εργαστηριακή διάγνωση δεν είναι διαθέσιμη. Μόλις γίνει η διάγνωση της ελονοσίας, πρέπει να ξεκινήσει αμέσως η κατάλληλη θεραπεία κατά της ελονοσίας.

Η προτεινόμενη πρέπει να καθοδηγείται από τέσσερις (4) βασικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι αρχικά το είδος του μολυσματικού πλασμοδίου, η κλινική κατάσταση του ασθενούς, η αναμενόμενη ευαισθησία φαρμάκου στο μολυσματικό παράσιτο που καθορίζεται από τη γεωγραφική περιοχή όπου αποκτήθηκε η μόλυνση, καθώς επίσης και η προηγούμενη χρήση ανθελονοσιακών (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που ελήφθησαν για χημειοπροφύλαξη ελονοσίας) [32].

Τα ανθελονοσιακά προς χρήση φάρμακα είναι συνήθως σχιστοκτόνα που δρουν στο περιφερικό αίμα και ειδικότερα στην ερυθροκυτταρική φάση του τροφοζώιτη και του ερυθροκυτταρικού σχιστού (κινίνη, χλωροκίνη, μεφλοκίνη, αλοφαντρίνη). Υπάρχουν επίσης σχιστοκτόνα (ή κρυπτοσχιστοκτόνα) που δρουν κυρίως στους ιστούς (υπνοζωίτες) και γαμετοκυτταροκτόνα (πριμακίνη). Επίσης υπάρχουν τα σχιστοκτόνα που δρουν στο αίμα και γαμετοκυτταροκτόνα (παράγωγα αρτεμισινίνης) και τα σχιστοκτόνα που δρουν βασικά στο αίμα και λιγότερο στους ιστούς (ατοβακόνη) και αντιμεταβολίτες (πυριμεθαμίνη / σουλφαδοξίνη) [6].

Ένας κρίσιμος παράγοντας επιτυχίας λήψης νέων ανθελονοσιακών είναι η δραστηριότητα έναντι των προϋπάρχοντων ανθεκτικών στελεχών [33]. Περιπτώσεις λοιμώξεων από *P. falciparum* που αποκτήθηκαν σε περιοχές με αντοχή στη χλωροκίνη, αντιμετωπίζονται με τέσσερις διαφορετικές θεραπευτικές επιλογές. Αυτές περιλαμβάνουν την αρτεμισίνη ως θεραπεία επιλογής, εάν είναι άμεσα διαθέσιμη και η ατοβακόνη-προγουανίλη. Εναλλακτικά, μπορούν να χορηγηθούν θειική κινίνη (Quinine sulfate) συν η δοξυκυκλίνη, η τετρακυκλίνη ή η κλινδαμυκίνη είναι επίσης μια επιλογή θεραπείας. Για τις επιλογές συνδυασμού θειικής κινίνης, θειική κινίνη συν είτε δοξυκυκλίνη είτε τετρακυκλίνη προτιμάται γενικά από τη θειική κινίνη συν την κλινδαμυκίνη επειδή υπάρχουν περισσότερα δεδομένα σχετικά με την αποτελεσματικότητα της θειικής κινίνης συν της δοξυκυκλίνης ή της

τετρακυκλίνης [32]. Επιπλέον, η μεφλοκίνη δεν συνιστάται για λοιμώξεις που αποκτώνται σε ορισμένα μέρη της Νοτιοανατολικής Ασίας λόγω αντοχής στα φάρμακα [32]. Μόλις ξεκινήσει μια θεραπευτική αγωγή είναι σημαντικό να μην αλλάξει. Ακόμη και αν είναι διαθέσιμο ένα προτιμώμενο σχήμα, δεν χρειάζεται αλλαγή θεραπευτικών σχημάτων, εκτός και αν δεν είναι ανεκτά από τον οργανισμό του κάθε ατόμου.

Περιπτώσεις λοιμώξεων από *P. falciparum* σε περιοχές χωρίς ανθεκτικά στελέχη σε χλωροκίνη, συμπεριλαμβανομένης της Κεντρικής Αμερικής δυτικά του καναλιού του Παναμά, της Αϊτής και της Δομινικανής Δημοκρατίας, οι ασθενείς μπορούν να υποβληθούν σε θεραπεία από το στόμα με χλωροκίνη ή εναλλακτικά, με υδροξυχλωροκίνη σε συνιστώμενες δόσεις [32]. Η άμεση έναρξη μιας διαθέσιμης αποτελεσματικής αγωγής είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία του ατόμου που πάσχει.

Περιπτώσεις λοιμώξεων από τα πλασμώδια *P. malariae* και *P. knowlesi* δεν υπήρξε ευρεία ένδειξη αντοχής στη χλωροκίνη. Επομένως, η χλωροκίνη (ή υδροξυχλωροκίνη) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τις δύο αυτές μολύνσεις. Επιπλέον, οποιοδήποτε από τα σχήματα που αναφέρονται παραπάνω για τη θεραπεία ανθεκτικών σε χλωροκίνη *P. falciparum* μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη θεραπεία μολύνσεων από *P. malariae* και *P. knowlesi*, αντίστοιχα [32].

Περιπτώσεις λοιμώξεων από *P. vivax* και *P. ovale*, η χλωροκίνη (ή υδροξυχλωροκίνη), παραμένει μια αποτελεσματική επιλογή, εκτός από λοιμώξεις που αποκτήθηκαν στην Παπούα Νέα Γουινέα ή την Ινδονησία, χώρες με υψηλό επιπολασμό *P. vivax*, ανθεκτικό σε χλωροκίνη [32]. Σπάνιες περιπτώσεις ανθεκτικών στη χλωροκίνη *P. vivax* έχουν επίσης τεκμηριωθεί στη Βιρμανία (Μιανμάρ), στην Ινδία και στην Κεντρική και Νότια Αμερική.

Εκτός από την ανάγκη θεραπείας για τα παράσιτα του σταδίου του αίματος, δηλαδή την οξεία φάση της ελονοσίας, οι λοιμώξεις του *P. vivax* και του *P. ovale* μπορούν να υποτροπιάσουν λόγω των υπνοζωϊτών, που είναι αδρανείς μορφές που παραμένουν στο ήπαρ. Για την εξάλειψη των υπνοζωϊτών, οι ασθενείς θα πρέπει να λαμβάνουν θεραπεία είτε με φωσφορική πριμακίνη είτε με ταφενοκίνη. Επειδή τόσο η ταφενοκίνη, όσο και η πριμακίνη μπορούν να προκαλέσουν αιμολυτική αναιμία σε άτομα με ανεπάρκεια γλυκόζης-6-φωσφορικής-αφυδρογονάσης (G6PD), πρέπει να πραγματοποιηθεί ποσοτική δοκιμή G6PD πριν



από την έναρξη της θεραπείας με αυτά τα φάρμακα και μόνο οι ασθενείς με φυσιολογική δραστηριότητα πρέπει να τα λαμβάνουν [32].

Η ενέσιμη μορφή της αρτεσουνάτης εγκρίθηκε από το FDA (Food and Drug Administration) στις 26 Μαΐου του έτους 2020 για τη θεραπεία της σοβαρής ελονοσίας [34]. Προηγουμένως, το μόνο ενδοφλέβιο (IV) ανθελονοσιακό που ήταν διαθέσιμο για τη θεραπεία της σοβαρής ελονοσίας στις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν το ερευνητικό IV αρσενικού που ήταν διαθέσιμο μόνο από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) μέσω ενός πρωτοκόλλου διερευνητικής νέας φαρμακευτικής ουσίας (IND) [34].

## 1.7 Τρόποι διάγνωσης ελονοσίας

### 1.7.1 Κλινική Διάγνωση

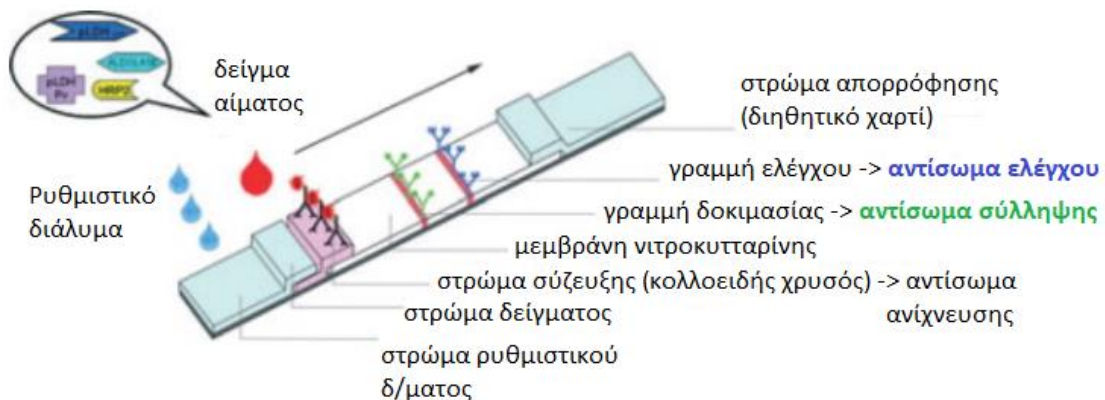
Η ελονοσία είναι η πιο κοινή αιτία πυρετού σε ενδημικά περιβάλλοντα. Επομένως, είναι κατανοητό ότι η διάγνωση αυτής θεωρείται ως προεπιλεγμένη επιλογή, εφόσον ένα άτομο παρουσιάσει πυρετό αγνώστου προελεύσεως. Αναπόφευκτα, αυτή η νοοτροπία οδηγεί σε υπερδιάγνωση του *P. falciparum*. Ωστόσο, καθώς η ελονοσία μοιράζεται κλινικά σημεία και συμπτώματα που είναι κοινά χαρακτηριστικά για μια σειρά άλλων εμπύρετων ασθενειών, το τεκμήριο της λοίμωξης από ελονοσία δεν είναι ασφαλές και επιτυχές. Υπάρχει συχνά μια εξάρτηση από αυτήν την παραδοσιακή, διαγνωστική προσέγγιση παρατηρούμενη σε μέρη περιορισμένης χρήσης πόρων. Ο βαθμός ακρίβειας, εξαρτάται από την ένταση μετάδοσης της ελονοσίας, το επικρατές είδος του πλασμοδίου και άλλες επικρατούσες αιτίες πυρετού σε οποιαδήποτε δεδομένη περιοχή. Αυτοί οι παράγοντες ποικίλλουν από τη μια τοποθεσία στην άλλη ή μπορεί να είναι ασταθείς και επομένως δεν είναι απολύτως αξιόπιστοι.

Μπορεί εύλογα να υποθεθεί ότι, σε περιβάλλον πρωτοβάθμιας υγειονομικής περίθαλψης, τόσο τα ανθελονοσιακά όσο και τα αντιβιοτικά χορηγούνται σε ασθενείς, χωρίς την επιβεβαίωση εργαστηριακής διάγνωσης. Αυτή η διαγνωστική λογική είναι διαδεδομένη στην υποσαχάρια Αφρική και σε άλλες περιοχές. Είναι πιθανό ότι αυτή η πρακτική συμβάλλει σημαντικά στο συνεχιζόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας, στην κατάχρηση αντιβιοτικών και ως εκ τούτου αυξάνει τον κίνδυνο εξάπλωσης γονιδίων ανтимικροβιακής αντοχής μεταξύ παθογόνων βακτηρίων. Επομένως, για να επιτευχθεί μια κατάλληλη ιατρική ανταπόκριση, συνιστάται ιδιαίτερα μια προγνωστική κλινική ή αυτοδιάγνωση αυτού του είδους, συνδυαστικά όμως με επιβεβαιωτικές διαγνωστικές εξετάσεις [35].

## 1.7.2 Εργαστηριακή διάγνωση

### 1.7.2.1 Γρήγορες διαγνωστικές δοκιμασίες (RDTs)

Η δοκιμασία γρήγορης διάγνωσης (RDT) βασίζεται σε ανοσοχρωματογραφική τεχνική και σχετίζεται με την ανίχνευση ειδικών αντιγόνων του πλασμοδίου σε δείγματα αίματος, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα εμποτισμένα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Εικ. 12). Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1990 και έγινε γρήγορα, η περισσότερο εφαρμοζόμενη μέθοδος για τη δοκιμασία διάγνωσης της ελονοσίας σε ασθενείς με υποψία ελονοσίας. Σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία, εκτιμάται ότι το 75% των δοκιμασιών ελονοσίας πραγματοποιήθηκαν με χρήση αυτών των δοκιμασιών το 2017, έναντι 40% το 2010 [35]. Επιπλέον, τα δύο τρίτα των 276 εκατομμυρίων δοκιμασιών που παρασχέθηκαν σε εθνικά προγράμματα ελονοσίας παγκοσμίως το 2017 εντόπισαν μόνο το *P. falciparum* [35]. Υπάρχουν περισσότερα από 200 διαφορετικά φορητά κιτ γρήγορων διαγνωστικών δοκιμασιών (RDT), που διατίθενται επί του παρόντος στο εμπόριο [35].



**Εικόνα 12** Σχηματική απεικόνιση ταχείας διαγνωστικής δοκιμής ελονοσίας. Ακολουθία συμβάντων κατά την εκτέλεση ενός MRDT. (Το δείγμα αίματος και το ρυθμιστικό διάλυμα, εφαρμόζονται αντίστοιχα στα στρώματα) [36].

Οι αναφερόμενες ευαισθησίες ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών προϊόντων RDT, αλλά γενικά είναι καλές για το *P. falciparum*, με τα RDT που ανιχνεύουν το *P. falciparum* αντιγόνο πλούσιο σε πρωτεΐνη-2 ιστιδίνη (PfHRP2) να υπερτερούν

ελαφρώς έναντι, των RDTs που ανιχνεύουν *P. falciparum* lactate dehydrogenase (Pf-pLDH), αντίστοιχα. Η ευαισθησία είναι χαμηλότερη για το *P. vivax* (66,0-88,0%) και χαμηλή για το *P. ovale* (5,5-86,7%) και το *P. malariae* (21,4-45,2%), αντίστοιχα [36].

Συγκεκριμένα, μπορούν να ανιχνευθούν τα αντιγόνα *P. vivax*-pLDH (Pv-pLDH, ειδικό για *P. vivax*) και pan-pLDH και αλδολάση (κοινά σε όλα τα ανθρώπινα είδη πλασμοδίων). Τα RDTs της ελονοσίας κατηγοριοποιούνται ως προϊόντα δύο, τριών ή τεσσάρων ζωνών, ανάλογα με τον αριθμό των γραμμών («ζώνες») που μπορεί να γίνουν ορατές στη λωρίδα, με τη γραμμή ελέγχου να αντιπροσωπεύει μια ζώνη. Τα RDTs δύο ζωνών ανιχνεύουν ένα μόνο αντιγόνο (κυρίως PfHRP2), ενώ των τριών ζωνών ανιχνεύουν *P. falciparum* (PfHRP2 ή Pf-pLDH) και επιπλέον κυρίως ένα αντιγόνο pan-pLDH ή αλδολάση. Τα RDTs τεσσάρων ζωνών ανιχνεύουν ένα ειδικό αντιγόνο *P. falciparum*, ένα αντιγόνο panmalaria και ένα ειδικό αντιγόνο *P. vivax*, αντίστοιχα (Εικ. 13).



**Εικόνα 13** Δύο, τριών και τεσσάρων ζωνών RDT ελονοσίας (πάνω, μεσαία και κάτω, αντίστοιχα με *P. falciparum* (αριστερά) και *P. vivax* (δεξιά)) [36].

Οι ταχείες διαγνωστικές εξετάσεις έχουν αρκετούς άλλους περιορισμούς, όπως η επιμονή του αντιγόνου PfHRP2, οι διασταυρούμενες αντιδράσεις του *P. falciparum* με τη μη-*falciparum* γραμμή δοκιμασίας και το αντίστροφο και (σπάνιες) ψευδώς θετικές αντιδράσεις λόγω άλλων μολυσματικών παραγόντων ή ανοσολογικών παραγόντων. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα εμφανίζονται στην περίπτωση χαμηλής πυκνότητας παρασίτων, φαινομένου προζώνης ή εξάλειψης γονιδίων *pfhrp2*. Επιπλέον, παρουσιάζονται σφάλματα ερμηνείας, εν μέρει λόγω ανεπαρκειών στις οδηγίες χρήσης. Τέλος, τα RDTs δεν παρέχουν πληροφορίες

σχετικά με την πυκνότητα των παρασίτων. Στο διαγνωστικό εργαστήριο, τα RDTs αποτελούν πολύτιμο συμπλήρωμα της τεχνικής της μικροσκόπησης για διάγνωση της ελονοσίας [36].

Από όλες τις προσεγγίσεις για την ανίχνευση παρασίτων, οι γρήγορες διαγνωστικές δοκιμές, οι λεγόμενες γρήγορες διαγνωστικές δοκιμασίες (RDTs), είναι οι ευκολότερες στη χρήση και περισσότερο οικονομικές. Ωστόσο, ορισμένοι από τους περιορισμούς που είναι εγγενείς στην εν λόγω μεθοδολογία, δύναται να εμποδίσουν την αποτελεσματική θεραπεία του ασθενούς [35].

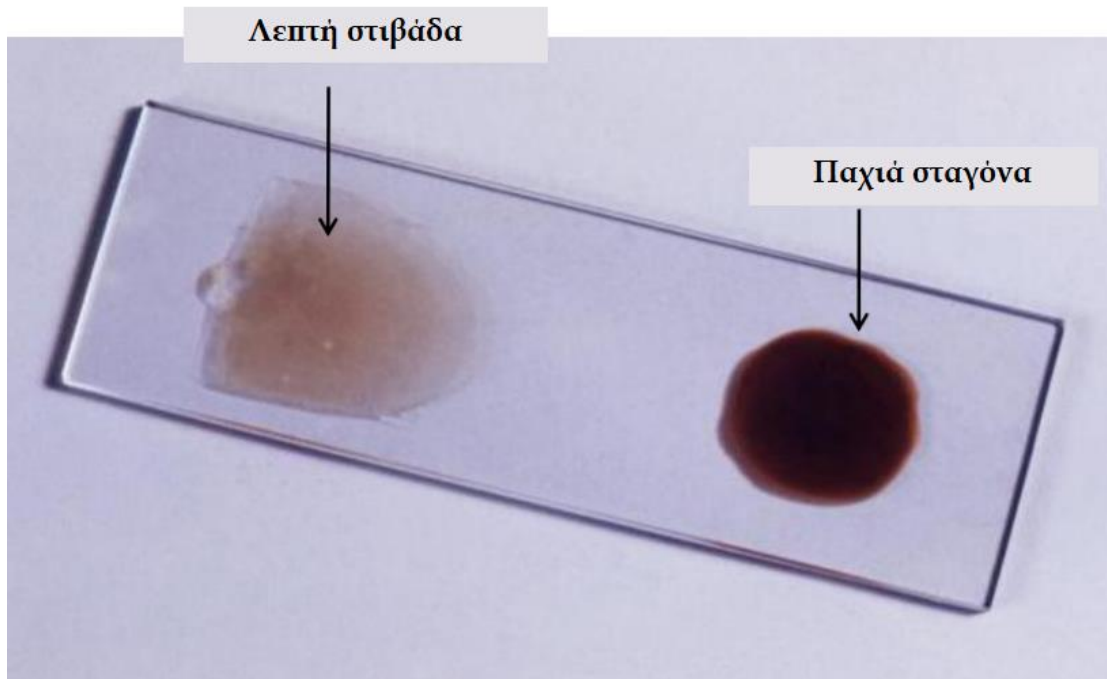
### 1.7.2.2 Διάγνωση βάσει μικροσκόπησης

Αυτή είναι η πιο μακροχρόνια διαγνωστική τεχνική ελονοσίας που βασίζεται στο εργαστήριο και περιλαμβάνει άμεση απεικόνιση των ασεξουαλικών ενδοερυθροκυτταρικών σταδίων του παρασίτου *Plasmodium*. Η συμβατική διαδικασία περιλαμβάνει την προετοιμασία επιχρίσματος (φιλμ) περιφερικού αίματος σε γυάλινο πλακίδιο μικροσκοπίου, ακολουθούμενο από στερέωση με απόλυτη μεθανόλη, χρώση σε διάλυμα Giemsa και οπτικοποίηση με μικροσκόπηση (Εικ. 14).

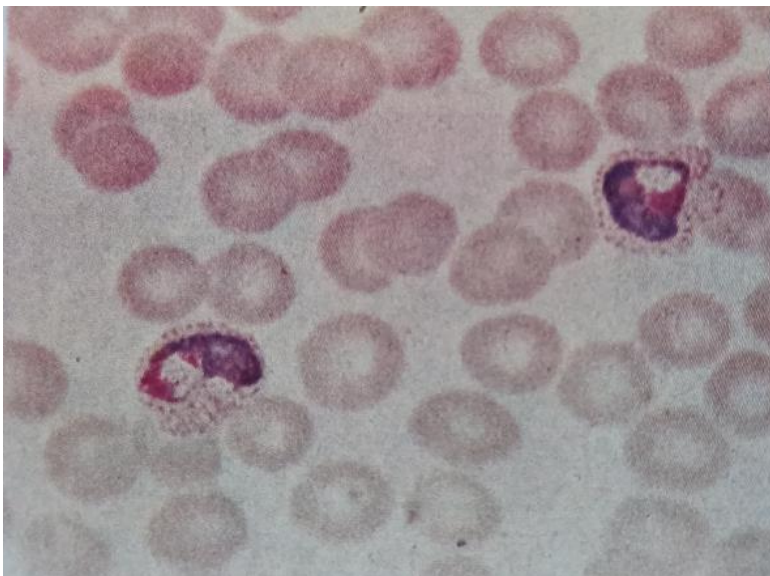
Η χρώση Giemsa αποτελείται από ηωσίνη και μπλε μεθυλενίου (κυανό). Η ηωσίνη βάφει ερυθρό τον πυρήνα του παρασίτου, ενώ το μπλε του μεθυλενίου βάφει μπλε το κυτταρόπλασμα (Εικ. 15). Αυτή η μέθοδος αποκαλύπτει ποσοτικές και ποιοτικές διαγνωστικές πληροφορίες όσον αφορά το μολυσματικό είδος πλασμωδίου και την ποσοστιαία κατανομή των μολυσμένων ερυθροκυττάρων (πυκνότητα παρασίτων, παρασιταιμία), συνήθως από την εξέταση παχιών και λεπτών κηλίδων επιχρισμάτων αίματος, αντίστοιχα (Πίν. 7, Εικ. 16). Επιπλέον, μπορεί επίσης να προσδιοριστεί το ακριβές στάδιο του ασεξουαλικού ερυθροκυτταρικού κύκλου στο οποίο ελήφθη δείγμα αίματος, το οποίο είναι χρήσιμο να ταιριάζει με τις κλινικές εκδηλώσεις του ασθενούς (Εικ. 17-21). Εάν δεν υπάρχουν παράσιτα κατά την πρώτη εξέταση, η δοκιμασία μπορεί να επαναλαμβάνεται κάθε 8-48 ώρες, εφόσον συντρέχει υποψία ελονοσίας.

Όταν εκτελείται η μικροσκόπηση ελονοσίας από εκπαιδευμένο προσωπικό, ο βαθμός ακρίβειας τόσο της ανίχνευσης όσο και της αναγνώρισης είναι υψηλός. Κατά συνέπεια, η μικροσκοπική εξέταση των επιχρισμάτων αίματος είναι η ευκολότερη και πιο αξιόπιστη δοκιμασία για τη διάγνωση της ελονοσίας και ως εκ τούτου καθιερώνεται σταθερά ως η μέθοδος «χρυσός κανόνας». Υπάρχουν ωστόσο και περιορισμοί στη συγκεκριμένη τεχνική προσέγγιση. Για παράδειγμα, έχει αμφισβητήσιμη ευαισθησία σε χαμηλού επιπέδου παρασιταιμία ( $\leq 50$  παρασιτοποιημένα ερυθροκύτταρα/μl αίματος). Επιπλέον, λόγω ανεπαρκών εγκαταστάσεων ή/και έλλειψης εξοπλισμού και αξιόπιστης παροχής ηλεκτρικού ρεύματος, σε συνδυασμό με έλλειψη έμπειρου προσωπικού, αυτή η προσέγγιση καθίσταται απρόσιτη σε πολλά κέντρα πρωτοβάθμιας υγειονομικής περίθαλψης σε

απομακρυσμένες κοινότητες, περιοχές, όπου η ελονοσία μπορεί να είναι εξαιρετικά ενδημική [35].



**Εικόνα 14** Μικροσκοπική εξέταση χρωματισμένων με Giemsa παρασκευασμάτων λεπτής στιβάδος ή παχιάς σταγόνας (1/2 ώρα ανά επίχρισμα σε καταδυτικό φακό (X100)). Απαιτείται κατ' αρχάς δείγμα αίματος επί πυρετού. Αν και η παχιά σταγόνα είναι πιο δύσκολο να διαβαστεί, επειδή επιτρέπει την εξέταση μεγαλύτερης ποσότητας αίματος, είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση παρσίτων της ελονοσίας [37].



**Εικόνα 15** Ενδοερυθροκυτταρικό στάδιο *P. vivax*, τροφοζώδιο [30].

**Πίνακας 7** Χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται συνήθως σε ερυθρά παρασιτούμενα από τα πλασμώδια [37].

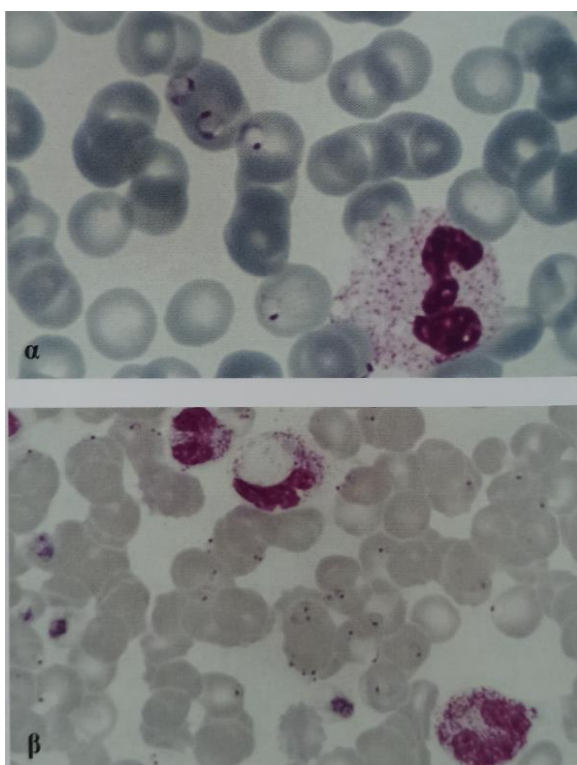
|                                               | <i>P. falciparum</i> | <i>P. vivax</i> | <i>P. ovale</i> | <i>P. malariae</i> |
|-----------------------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Ερυθρά μεγεθυσμένα                            | -                    | +               | Ποικίλει        | -                  |
| Ερυθρά μεγεθυσμένα + κοκκίωση Süffner         | -                    | +               | +               | -                  |
| Ερυθρά κανονικά                               | +                    | -               | Ποικίλει        | +                  |
| Ερυθρά κανονικά + κοκκία Mauer                | +                    | -               | -               | -                  |
| Ερυθρά ωσειδή (με οδοντωτή παρυφή)            | -                    | -               | +               | -                  |
| Επικυττάρειες μορφές πλασμωδίων               | +                    | Σπάνια          | -               | -                  |
| Ταινιοειδείς μορφές                           | -                    | -               | -               | +                  |
| Πολλαπλή μόλυνση ερυθρών                      | +                    | Σπάνια          | -               | -                  |
| Γαμετοκύτταρα ημισεληνοειδή                   | +                    | -               | -               | -                  |
| Μεροζωΐδια στα ώριμα σχιστά *                 | 8-24                 | 16-20           | 6-12            | 8-12               |
| Παρουσία όλων των σταδίων στο περιφερικό αίμα | -**                  | +               | +               | +                  |

\**P. falciparum*: Βρίσκονται σπανιότατα στο περιφερικό αίμα.

*P. vivax*: Για τα μεροζωΐδια, ανώμαλη κατανομή.

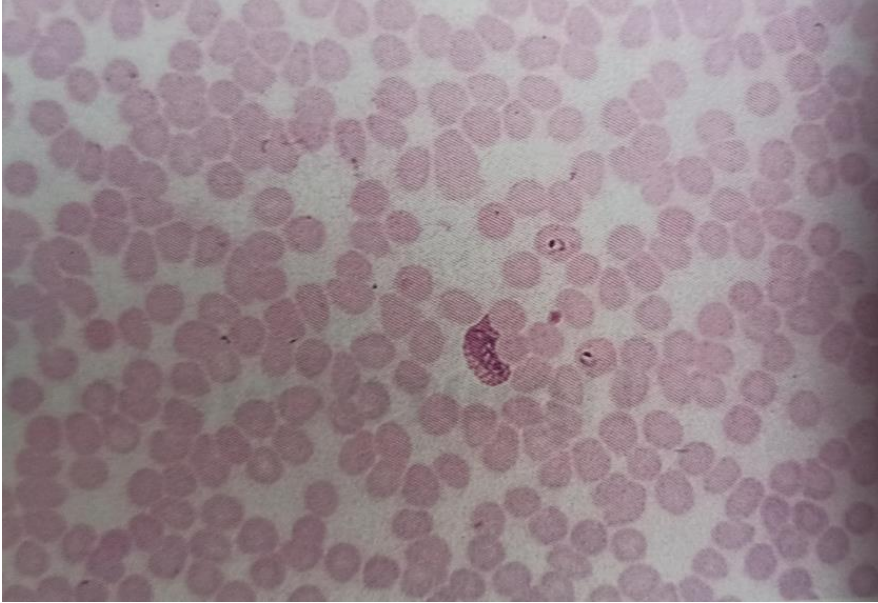
*P. malariae*: Για τα μεροζωΐδια, ομαλή κατανομή (σαν μαργαρίτα).

\*\* Παρουσία μόνο γαμετοκυττάρων και δακτυλιοειδών μορφών.

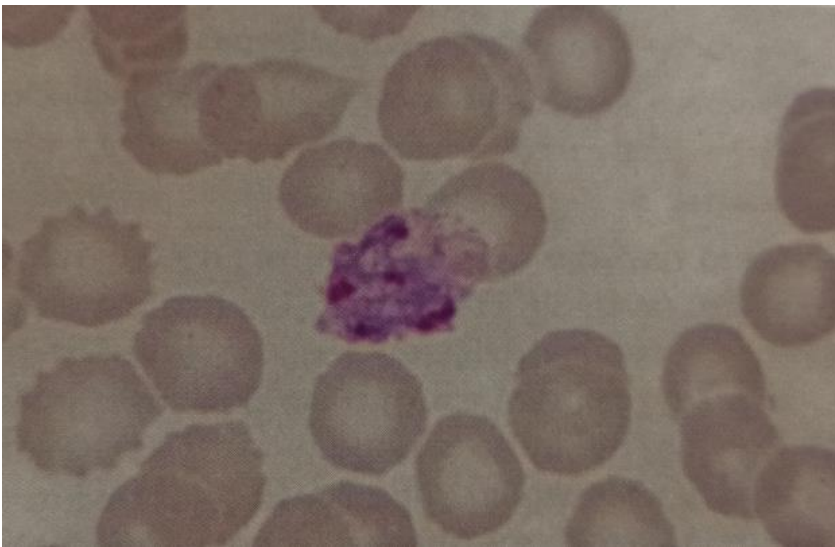


**Εικόνα 16** Δακτυλιοειδείς μορφές *P. falciparum* με υψηλή παρασιταιμία, σε επίχρισμα περιφερικού αίματος (α και β χρώση Giemsa) [6].





**Εικόνα 17** Μικροσκοπική απεικόνιση του *P. vivax*, με την εμφάνιση δακτυλίων και νέων τροφοζωϊτών, σε επίχρισμα περιφερικού αίματος. (διαφορετικά στάδια: μεγενθυμένα παρασιτιζόμενα ερυθροκύτταρα, παρουσία κηλίδων Schuffner με μορφή τροφοζωϊτών) [26].



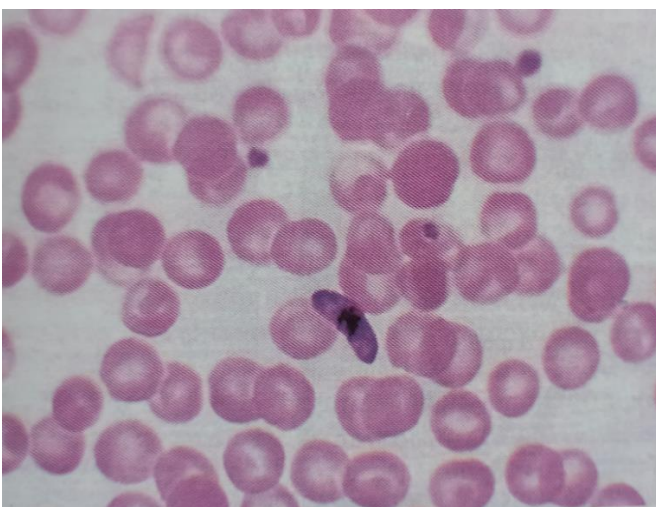
**Εικόνα 18** Άωρο σχιστό, *P. vivax* (χρώση Giemsa) [6].



**Εικόνα 19** Ωριμο σχιστό, *P. vivax* (χρώση Giemsa) [6].



**Εικόνα 20** Άωρο σχιστό, *P. malariae* (χρώση Giemsa) [6].

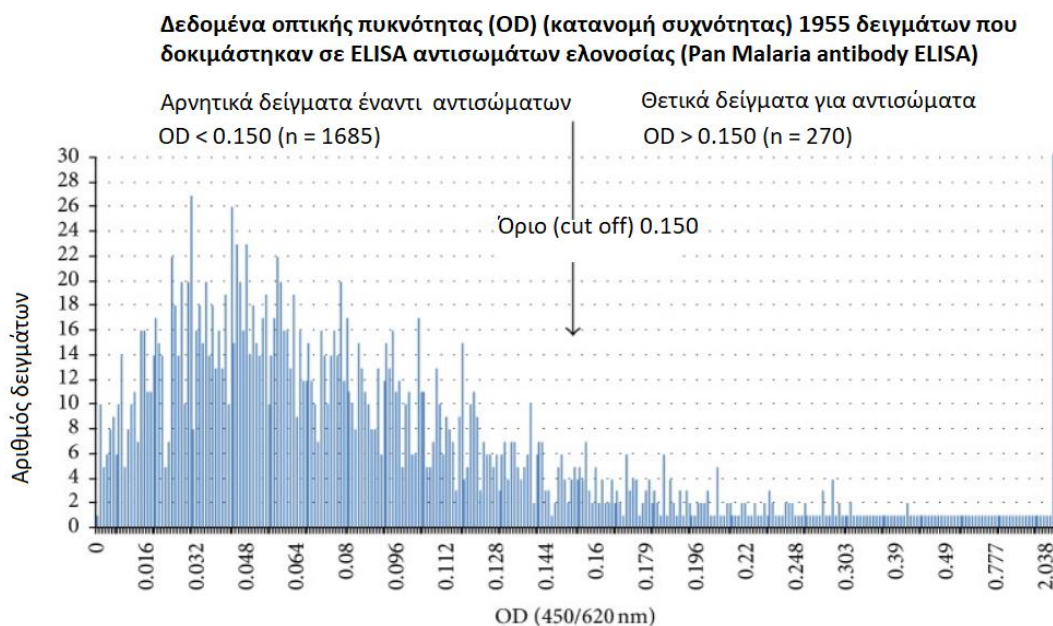


**Εικόνα 21** Ωριμο γαμετοκύτταρο *P. falciparum* (χαρακτηριστική μορφή για το είδος αυτό) [26].

### 1.7.2.3 Ορολογική διάγνωση

- Ανοσοδοκιμασία για αντισώματα ελονοσίας

Στην ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) η αντιδραστικότητα του αντισώματος προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) με φασματοφωτόμετρο (Εικ. 22). Οι μετρήσεις αντισωμάτων έναντι της ελονοσίας είναι χρήσιμες καθώς αντικατοπτρίζουν την ιστορική και πρόσφατη έκθεση στην νόσο. Ωστόσο, προς το παρόν, δεν υπάρχει τυποποιημένο πρωτόκολλο ELISA για τη μέτρηση αντισωμάτων ελονοσίας για επιδημιολογική χρήση. Συγκεκριμένα, οι τυπικές διαδικασίες λειτουργίας, οι θετικοί έλεγχοι (δηλαδή οι υπερανοσολογικοί οροί) και οι αρνητικοί έλεγχοι (δηλαδή οροί χωρίς έκθεση), καθώς και οι μέθοδοι ομαλοποίησης ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μελετών, γεγονός που καθιστά την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ χωρών ή πληθυσμών δύσκολη έως ανέφικτη [38].



**Εικόνα 22** Απεικόνιση αντιδραστικότητας του αντισώματος ελονοσίας που προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) με φασματοφωτόμετρο. Κατανομή συχνότητας των μετρήσεων OD 1955 δειγμάτων ορού που δοκιμάστηκαν σε αραιώση 1/100 σε Pan Malaria IgG CELISA. Τα δείγματα (n = 270) που εμφανίζουν ενδείξεις OD > 0,150 θεωρούνται θετικά [39].

Ειδικά αντισώματα για την ελονοσία που υπάρχουν στα δείγματα ορού ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα κιτ ELISA (π.χ. PAN Malaria Antibody CELISA, Cellabs Pty Ltd, Brookvale NSW, Αυστραλία). Το κάθε κιτ βασίζεται στην αρχή της έμμεσης ανοσοπροσοφητικής ανάλυσης (ELISA) και έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση της ειδικής απόκρισης IgG αντισωμάτων ελονοσίας στον ορό έναντι τεσσάρων διαφορετικών πλασμοδίων της ελονοσίας (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* και *P. ovale*). Το κιτ PAN Malaria Antibody CELISA έχει επικυρωθεί ανεξάρτητα έναντι άλλων διαγνωστικών μεθόδων (95,5% ευαισθησία και 92,2% ειδικότητα) [39]. Συγκεκριμένα, τα μικροβυθίσματα ELISA επικαλύπτονται με μια ομάδα ανασυνδυασμένων αντιγόνων ελονοσίας. Τα δείγματα ορού αραιώνονται στο 1/100 και επωάζονται στα μικροβυθίσματα. Μετά την επώαση και το πλύσιμο, τα φρεάτια επωάζονται με ένα σύζευγμα (αντι-ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, επισημασμένα με το ένζυμο horse radish peroxidase). Έπειτα από το πλύσιμο των φρεατίων προστίθεται και επωάζεται ένα υπόστρωμα χρωμογόνου (τετραμεθυλοβενζιδίνη), οδηγώντας σε ανάπτυξη χρώματος ανάλογη με την ποσότητα των αντισωμάτων ελονοσίας που υπάρχουν στο δείγμα. Αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες ορού παρέχονται στο κιτ [39].

Υπάρχουν πολλά εμπορικά διαθέσιμα κιτ ELISA, για τα οποία οι διαδικασίες παραγωγής και λειτουργίας είναι τυποποιημένες (π.χ. Trinity Biotech, newbio, DiaPro, Cellabs και NovaTec). Μέχρι τώρα, αυτά τα κιτ έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο αιμοδοσιών για ενδείξεις έκθεσης στην ελονοσία πριν από τη μετάγγιση. Θεωρητικά, αυτά τα κιτ μπορεί να αναδιανεμηθούν για επιδημιολογική καταγραφή, όπως φαίνεται σε μελέτες από την Αιθιοπία και το Ιράν [38].

Το εμπορικό κιτ ELISA Trinity Biotech σε έρευνες που διεξήχθησαν θεωρήθηκε πιο κατάλληλο για χρήση σε μεγάλη κλίμακα σε επιδημιολογικές έρευνες. Όλα τα εμπορικά κιτ ELISA που μελετήθηκαν (Trinity Biotech, newbio, DiaPro, Cellabs και NovaTec) ανέφεραν την ανίχνευση τεσσάρων ειδών ανθρώπινης ελονοσίας, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* και *P. ovale*, αλλά η ακρίβεια αυτών των προσδιορισμών στην ανίχνευση της έκθεσης στο *P. knowlesi* παραμένει άγνωστη. Η απόδοση των κιτ που χρησιμοποιούν δείγματα αποξηραμένου στίγματος από αίμα (DBS) απομένει να αξιολογηθεί. Οι μελλοντικές εργασίες θα πρέπει να επικεντρώνονται σε αυτές τις τεχνολογικές βελτιώσεις, καθώς και σε εκκρεμή ερωτήματα που σχετίζονται με τη χρήση ορολογικών εργαλείων για την πιστοποίηση πληθυσμών χωρίς ελονοσία [38].

- Ανοσοδοκιμασία για αντιγόνα ελονοσίας

Οι πλούσιες σε ιστιδίνη πρωτεΐνες, ειδικές για το *P. falciparum*, ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας κιτ ELISA (Malaria Antigen CELISA, Cellabs Pty Ltd, Brookvale NSW, Αυστραλία). Δείγματα ορού αραιωμένα 1/2 σε διάλυμα PBS/T ελέγχονται στα φρεάτια ELISA, επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα. Είναι γνωστό ότι ανιχνεύσιμα επίπεδα αντιγόνων HRP, ειδικά για *P. falciparum*, που υπάρχουν στον ορό. Τα αντιγόνα πρωτεΐνης ιστιδίνης που υπάρχουν στο δείγμα αίματος μπορούν να ανιχνευτούν, με την διαδικασία sandwich από το ένζυμο επισημασμένο με ανιχνευτές μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η ποσότητα των δεσμευμένων πρωτεϊνών ιστιδίνης με την διαδικασία sandwich είναι ανάλογη με την ένταση του χρώματος μετά την προσθήκη ενός υποστρώματος χρωμογόνου στα φρεάτια ELISA. Οι πλάκες διαβάζονται σε πλάκα ανάγνωσης διπλού μήκους κύματος (450/620 nm) [39].

#### 1.7.2.4 Ποσοτική μέθοδος Buffy Coat (QBC)

Στη μέθοδο Quantitative Buffy Coat (QBC), συλλέγονται δείγματα περιφερικού αίματος σε ειδικό σωλήνα που περιέχει πορτοκαλί ακριδίνης, αντιπηκτικό και πλωτήρα και στη συνέχεια φυγοκεντρώνται σε φυγόκεντρο μικροαιματοκρίτη. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, οι σωλήνες εξετάζονται χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού με προσαρμογέα σταδίου. Τα παράσιτα της ελονοσίας συμπυκνώνονται κάτω από τη στιβάδα των κοκκιοκυττάρων στον σωλήνα. Η μέθοδος QBC αναφέρεται ότι έχει ικανοποιητική ευαισθησία για την ανίχνευση των παρασίτων της ελονοσίας [40].

#### Αρχή μεθόδου

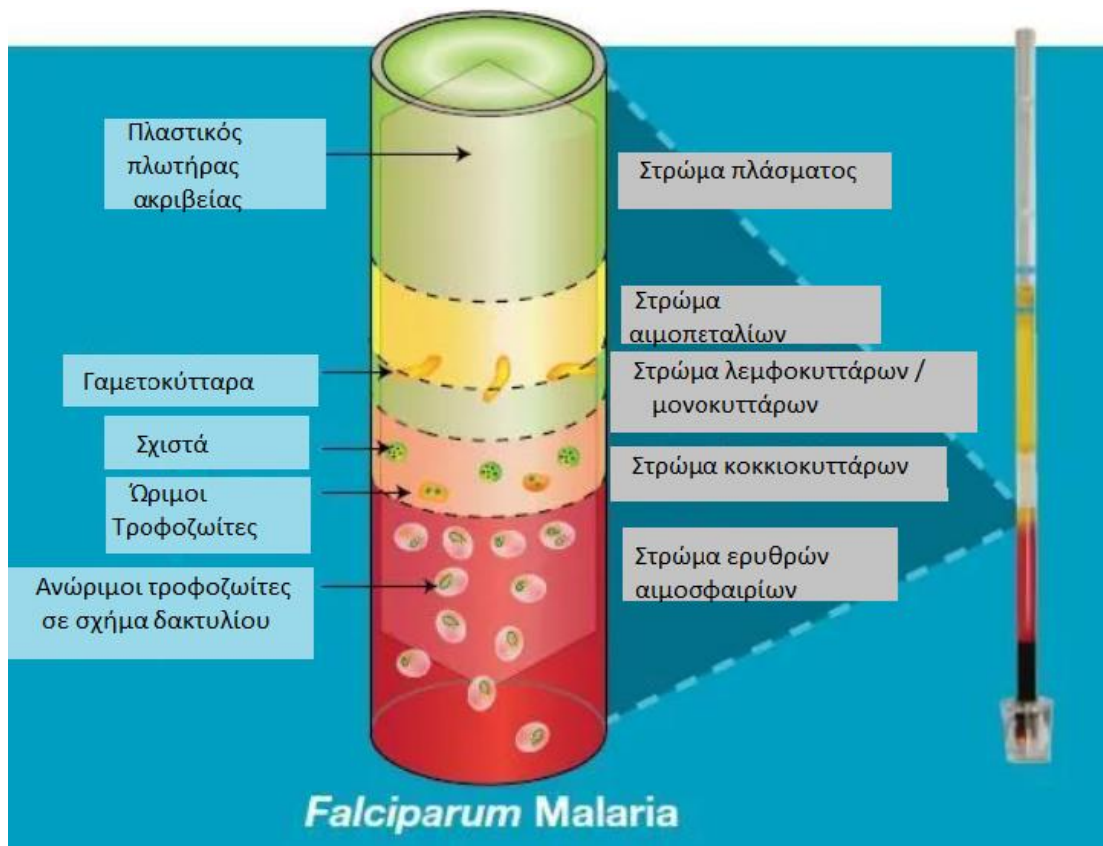
Το πορτοκαλί ακριδίνης δεσμεύει δεοξυριβονουκλεϊκά οξέα και ριβονουκλεϊκά οξέα. Το παράσιτο της ελονοσίας δεσμεύει το πορτοκαλί ακριδίνης στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα και εκπέμπει πράσινο και κόκκινο φθορισμό όταν διεγείρεται από μπλε φως (στα 460 nm) επιτρέποντας την ανίχνευση και εξέταση της μορφολογίας του παρασίτου, υπό πηγή υπεριώδους φωτός με μικροσκόπιο φθορισμού. Οι πυρήνες των παρασίτων εκπέμπουν κιτρινωπό-πράσινο φθορισμό, ενώ το κυτταρόπλασμα εμφανίζει έντονο κόκκινο φθορισμό. Τα ερυθροκύτταρα δεν χρωματίζονται από τη χρωστική ουσία, επομένως παραμένουν αφανή υπό φθορίζον φως (σκούρο φόντο), ενώ τα έντονα φθορίζοντα παράσιτα φαίνονται εύκολα. Τα περιγράμματα των βαμμένων παρασίτων διατηρούνται καλά και η γενική μορφολογία είναι παρόμοια με εκείνη των δειγμάτων που χρωματίζονται από τη χρώση Giemsa.

#### Αποτελέσματα/Ανάλυση

Εάν ένα δείγμα περιέχει παράσιτα ελονοσίας *P. falciparum*, τα αποτελέσματα θα είναι, ότι τα γαμετοκύτταρα σε σχήμα ημισελήνου θα εμφανιστούν κοντά στο ενδιάμεσο των στρωμάτων λεμφοκυττάρων/μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων. Επίσης, ένας μικρός αριθμός σχιστών και ώριμων τροφοζωϊτών μπορεί να εμφανιστεί στο στρώμα κοκκιοκυττάρων. Τέλος, θα εμφανιστούν ανώριμοι τροφοζωϊτες σε σχήμα δακτυλίου σε ολόκληρο το στρώμα ερυθρών αιμοσφαιρίων, με συγκέντρωση κοντά στο ενδιάμεσο με το στρώμα κοκκιοκυττάρων (Εικ. 23). Άλλα είδη παρασίτων, συμπεριλαμβανομένου του *P. vivax*, θα συγκεντρωθούν επίσης



κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης, αλλά εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά [41].



**Εικόνα 23** Σχηματική (αριστερά) και πραγματική (δεξιά) απεικόνιση στρωμάτων για *P. falciparum* στο τεστ QBC, ύστερα από φυγοκέντρηση [41].

### 1.7.3 Μοριακή διάγνωση

Η προϋπόθεση για να κατανοήσουμε τις γενετικές διαδικασίες του κυττάρου και πώς λειτουργούν αυτές είναι ο συνδυασμός απαιτητικών προσεγγίσεων σε πειραματικό επίπεδο. Τις τελευταίες δεκαετίες, η επιτυχημένη ανάπτυξη συγκεκριμένων μεθόδων αποτέλεσε τεράστιο θρίαμβο και ώθηση στο κλάδο της μοριακής βιολογίας. Τέτοιες μέθοδοι αφορούν τον διαχωρισμό, από τα μυριάδες μείγματα στο κύτταρο, των επιμέρους μακρομορίων και την ανατομή γονιδιώματος σε τμήματα μεγεθών που χρειάζονται στην ανάλυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA και στον πειραματικό χειρισμό.

Επιπλέον, έχουν εφαρμοστεί μοριακές προσεγγίσεις για ανάλυση στο πλήρες συμπλήρωμα του RNA και στις πρωτεΐνες των κυττάρων, καθώς και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε ολόκληρα γονιδιώματα. Αυτές οι γονιδιωματικές προσεγγίσεις, όπως και ο διαθέσιμος αριθμός των αλληλουχιών γονιδιωμάτων που αυξάνεται συνεχώς, έχει ως αποτέλεσμα την αξιόπαινη σύγκριση γονιδιωμάτων από διάφορους οργανισμούς. Η κατανόηση των ιδιοτήτων των μακρομορίων κατάφερε την επίτευξη των μοριακών μεθόδων. Οι τεχνικές υβριδισμού και αλληλούχησης, αναπτύχθηκαν λόγω των χαρακτηριστικών της ζεύξης και της δομής των βάσεων DNA και RNA, αντίστοιχα. Αυτές οι τεχνικές οδήγησαν στην ανάλυση της γονιδιακής δομής και έκφρασης σε ταχύ και λεπτομερή επίπεδο. Επιπρόσθετα, η γνώση στη λειτουργία της δραστηριότητας των DNA-πολυμερασών, DNA-λιγασών (δεσμασών) και των περιοριστικών ενδονουκλεασών, επέτρεψαν τη γένεση της τεχνικής κλωνοποίησης DNA, καθώς και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) [42].

Η διάγνωση σε μοριακό επίπεδο είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδος για τον προσδιορισμό της μοριακής υπογραφής μολυσματικών παραγόντων μέσω ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η τεχνική επιτρέπει την ταυτοποίηση του παρασίτου *Plasmodium* σε επίπεδο ειδών και σε αντίθεση με τη μέθοδο μικροσκόπησης, ανιχνεύει επίσης παρασιταιμία χαμηλού επιπέδου. Οι μοριακές μέθοδοι περιλαμβάνουν την κλασική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και διάφορες κατηγορίες της όπως, την εμφωλεασμένη (nested PCR), την πραγματικού χρόνου (real-time PCR), την ψηφιακή σταγονιδίων (droplet digital PCR) και την ισοθερμική ενίσχυση. Δυστυχώς, το κόστος αγοράς και η



συντήρηση του θερμοκυκλοποιητή ή του «μηχανήματος PCR» είναι ακριβά, ενώ το κόστος των αντιδραστηρίων, ανά δοκιμασία, είναι αδύνατο να καλυφθεί σε ρυθμίσεις χαμηλού εισοδήματος. Ακόμα, η λειτουργία και η ανάλυση δεδομένων απαιτούν υψηλά εκπαιδευμένο προσωπικό. Αυτοί οι παράγοντες συνδυάζονται για μια μοριακή διάγνωση, με αρκετά πλεονεκτήματα, όμως δεν είναι προσβάσιμοι σε χώρες με οικονομικά προβλήματα, στις οποίες η ελονοσία είναι ενδημική (Πίν. 8). Επιπρόσθετα, ακόμη και αν υπάρχει η επιλογή μεταφοράς δειγμάτων από απομακρυσμένες τοποθεσίες σε περιφερειακά εργαστήρια για επεξεργασία, τα αποτελέσματα των μοριακών διαγνώσεων δεν είναι συχνά διαθέσιμα αρκετά γρήγορα, ώστε να επηρεάσουν την ιατρική παρέμβαση.

Αν και αυτοί οι διάφοροι ευαίσθητοι μοριακοί προσδιορισμοί μπορεί να μην έχουν άμεσο θεραπευτικό όφελος, υπό συνθήκες πεδίου, βρίσκουν αξία ως ερευνητικό εργαλείο, όταν απαιτείται απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός πολύ χαμηλής πυκνότητας παρασίτων ή αναγνώριση μικτών λοιμώξεων. Αυτό μπορεί να επιτρέψει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την επιδημιολογία κάθε είδους *Plasmodium* σε διάφορες ρυθμίσεις μετάδοσης, ιδίως για την παρακολούθηση της μόλυνσης σε άτομα ασυμπτωματικά, σε περιοχές που στοχεύουν στην εξάλειψη της ελονοσίας [35].

**Πίνακας 8** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διαφόρων διαγνωστικών δοκιμών ελονοσίας [35].

| Διαγνωστική δοκιμή ελονοσίας       | Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                   | Μειονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Με βάση τη μικροσκοπία          | i) Πολύ ακριβής και συγκεκριμένη<br>ii) Παρέχει τόσο ποιοτικά(είδη <i>Plasmodium</i> ) όσο και ποσοτικά δεδομένα (πυκνότητα παρασίτων)<br>(iii) Αποκαλύπτει το στάδιο της μόλυνσης από ελονοσία | i) Απαιτεί άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό<br>ii) Απαιτεί αξιόπιστη παροχή ηλεκτρικής ενέργειας<br>iii) Χαμηλή ευαισθησία                                                                                                                          |
| 2. Μοριακή                         | i) Εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική<br>ii) Διακρίνει μεταξύ διαφορετικών ειδών <i>Plasmodium</i>                                                                                                 | i) Απαιτεί άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό<br>ii) Πολύ ακριβός εξοπλισμός<br>iii) Χρονοβόρα                                                                                                                                                        |
| 3. Ανοσολογική                     | i) Παρέχει πληροφορίες σχετικά με την επιδημιολογική επιτήρηση της ελονοσίας                                                                                                                    | (i) Δεν είναι δυνατή η διαφοροποίηση μεταξύ των παρελθουσών και των παρούσων λοιμώξεων                                                                                                                                                          |
| 4. Ταχεία διαγνωστική δοκιμή (RDT) | (i) Παρέχει αποτελέσματα πολύ γρήγορα<br>(ii) Ανέξοδη<br>(iii) Πολύ εύκολο στη χρήση με λίγη εκπαίδευση                                                                                         | i) Ανίκανη να ποσοτικοποιήσει την πυκνότητα παρασίτων<br>(ii) Δεν είναι δυνατή η διαφοροποίηση μεταξύ των παρελθουσών και των παρούσων λοιμώξεων<br>(iii) Η μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί το αντιγόνο μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα |

### 1.7.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

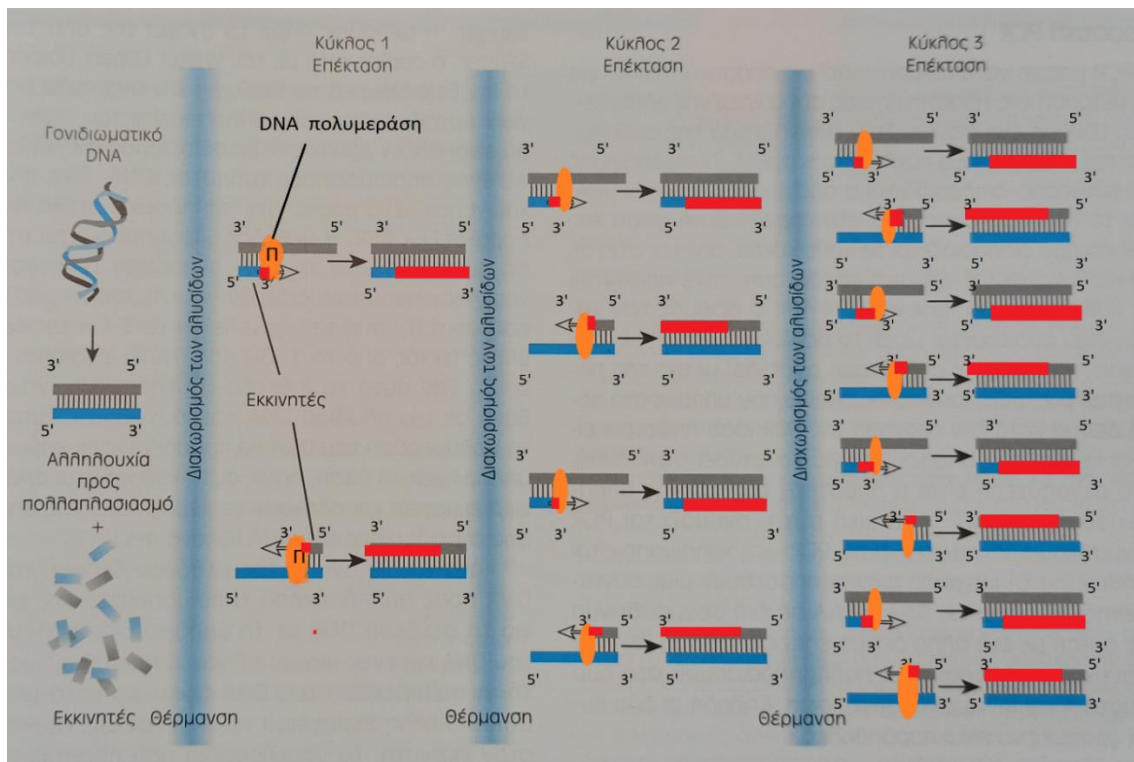
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία ισχυρή μέθοδος για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού (DNA) και χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της ελονοσίας. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται με βιοχημικό τρόπο (*in vitro*) και μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής ενισχύει τις ειδικές αλληλουχίες γενωμικού υλικού (DNA) που είναι χρήσιμες για τη διάγνωση [42-43]. Ο Kary Mullis επινόησε την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Τη χρονιά του 1988, η τεχνική PCR κατάφερε να αναγνωρισθεί ως εύχρηστη και αξιόπιστη μέθοδος.

Για να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη τεχνική είναι απαραίτητο στο αρχικό υλικό, το οποίο είναι ένα δείγμα γενετικού υλικού, να υπάρχει η συγκεκριμένη αλληλουχία που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Η PCR έχει πολλές εφαρμογές και παραλλαγές και το πιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της είναι, πως η αρχική ποσότητα του δείγματος που χρειαζόμαστε για την διεξαγωγή της, μπορεί να είναι πολύ μικρή, έστω και ένα μόνο μόριο γενετικού υλικού [44]. Τα βήματα της μεθόδου αυτής είναι συγκεκριμένα και διακριτά (Εικ. 24).

Στο πρώτο βήμα το εκμαγείο DNA υφίσταται θερμική αποδιάταξη. Τα συνθετικά μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια που χρειάζονται στην διαδικασία αυτή, το ένα είναι συμπληρωματικό προς το άκρο 5' της μιας αλυσίδας του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε και το άλλο είναι συμπληρωματικό στο άκρο 3' της άλλης αλυσίδας. Έτσι, στο επόμενο βήμα η σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) στις αντίστοιχες αλληλουχίες-στόχους είναι εφικτή. Η προσθήκη της DNA-πολυμεράσης στην αντίδραση είναι απαραίτητη και γίνεται για να χρησιμοποιήσει τα ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές (primers) και να ξεκινήσει την επιμήκυνση των συμπληρωματικών άκρων αυτών και να παράγει δίκλωνα DNA μόρια. Στην PCR χρησιμοποιείται η DNA Taq-πολυμεράση, η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, η οποία είναι θερμοάντοχη και παραμένει σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες, ακόμη και στους 94°C, οπότε παραμένει ενεργή σε όλο το χρονικό διάστημα των κύκλων της μεθόδου. Το ένζυμο αυτό βοηθάει στην προσθήκη νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα τη σύνθεση δεοξυνουκλεοτιδικών υποστρωμάτων DNA με εκμαγείο το μονόκλωνο DNA. Με αυτήν την αντίδραση και στις δύο αλυσίδες DNA παράγονται δίκλωνα DNA μόρια στην επιλεχθείσα περιοχή. Συνεπώς, ο

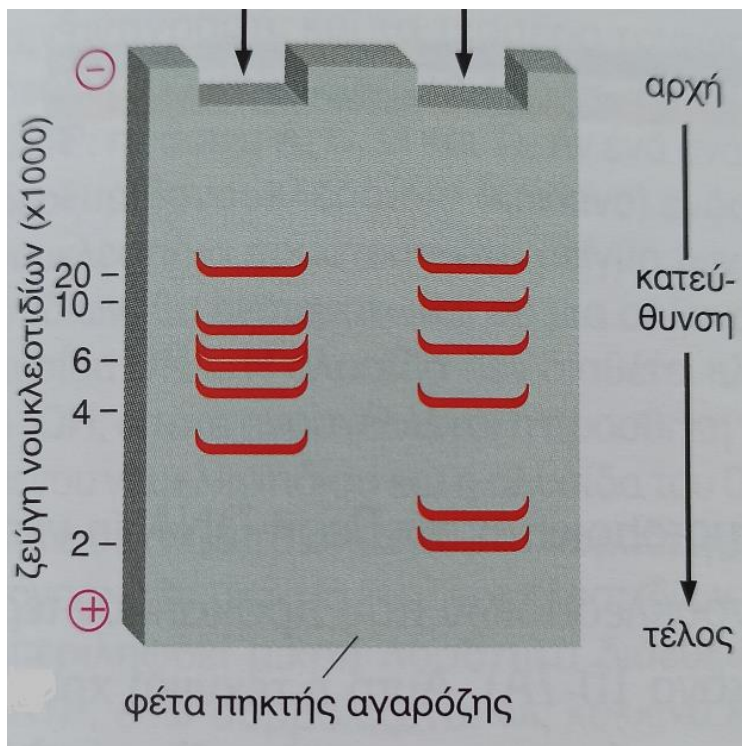
πρώτος κύκλος της PCR ολοκληρώνεται με παραχθέντα δύο δίκλινα αντίτυπα του αρχικού τμήματος DNA [42, 44].

Ακολουθεί ο δεύτερος κύκλος αποδιάταξης και σύνθεσης του DNA με τη χρήση των ίδιων εκκινητών. Έτσι, παράγονται τέσσερα αντίτυπα του ενδιαφέροντος τμήματος. Νέοι κύκλοι ακολουθούν, επαναλαμβάνοντας την αποδιάταξη και την σύνθεση DNA. Με αυτόν τον τρόπο η περιοχή που μας ενδιαφέρει ενισχύεται με γεωμετρική πρόοδο, ακολουθώντας τον μαθηματικό τύπο  $2^n$ , όπου  $n$  ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης του πειράματος. Η αρχή της PCR βασίζεται στους επαναλαμβανόμενους κύκλους διπλασιασμού DNA με το πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα ενίσχυσης ελάχιστων δειγμάτων DNA σε μεγάλες ποσότητες [42].

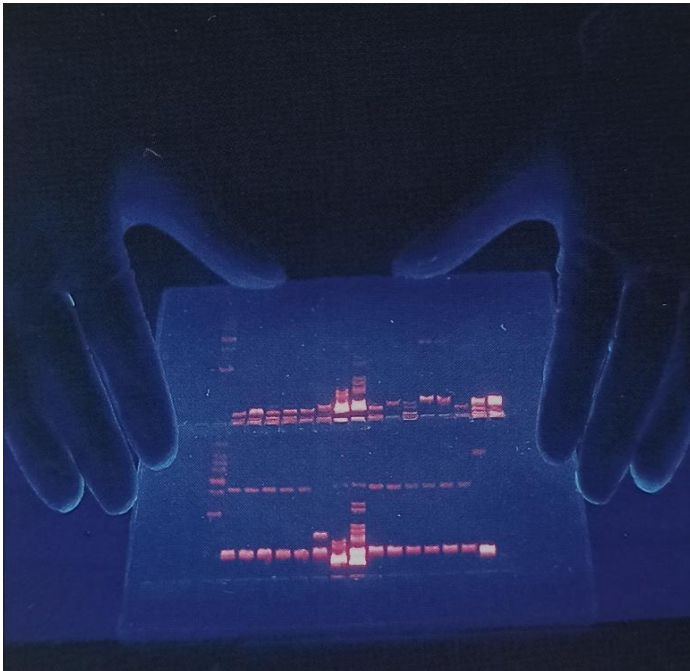


**Εικόνα 24** Σχηματική απεικόνιση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), (Αρχικά γίνεται η αποδιάταξη της αλληλουχίας DNA με αύξηση θερμοκρασίας. Έπειτα πραγματοποιείται η υβριδοποίηση των εκκινητών στις μονόκλωνες αλληλουχίες και με την βοήθεια της DNA Ταq-πολυμεράσης (Π) προκύπτουν δύο δίκλινα μόρια DNA. Έτσι, ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης. Τα δύο μόρια αυτά που προέκυψαν θα χρησιμοποιηθούν ως <<εκμαγείο>> για την δημιουργία τεσσάρων νέων μορίων στον δεύτερο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο η περιοχή που μας ενδιαφέρει ενισχύεται με γεωμετρική πρόοδο) [45].

Για το διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων γίνεται ηλεκτροφόρηση. Πρωτεϊνικά μόρια και νουκλεϊκά οξέα διαφέρουν ως προς το σχήμα, το ηλεκτρικό φορτίο και το μέγεθός τους και κινούνται έχοντας διαφορετική ταχύτητα μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο. Έτσι με κατάλληλες συνθήκες και διατηρώντας τις βιολογικές τους ιδιότητες διαχωρίζονται (Εικ. 25). Αυτή η μέθοδος πραγματοποιείται σε πήκτωμα αγαρόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου, μία χρωστική που προσδένεται στο DNA, με αποτέλεσμα τη χρώση των τμημάτων-DNA, όταν είναι στο πήκτωμα. Όταν το πήκτωμα εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, εμφανίζονται φωτεινές ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν σε τμήματα συγκεκριμένου μεγέθους (Εικ. 26). Ο προσδιορισμός τους γίνεται με σύγκριση μορίων DNA γνωστού μεγέθους. Σημαντική αποτελεί η δυνατότητα ανάκτησης αυτών των μορίων με επαναχρησιμοποίησή τους σε επόμενα πειράματα [44].



**Εικόνα 25** Ενδεικτική παρουσία ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης [46].



**Εικόνα 26** Παρουσία φωτεινών ζωνών των προϊόντων της PCR, σε πήκτωμα αγαρόζης υπό υπεριώδη ακτινοβολία [46].

Η μοριακή ενίσχυση της μικρής υπομονάδας 18S ριβοσωμικού RNA (18S rRNA), που αξιοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Snounou et al. με μια εμφωλεασμένη τεχνική PCR (nested), είναι η πιο διαδεδομένη σε χρήση από τις τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος στη διαγνωστική έρευνα της ελονοσίας και έχει υιοθετηθεί και προσαρμοστεί από πολλούς επιστήμονες [43]. Ενώ η εξειδίκευση των αποτελεσμάτων PCR είναι εγγυημένη από τη φύση του στόχου και των εκκινητών και/ή ανιχνευτών, η ευαισθησία μπορεί να είναι πολύ μεταβλητή, ανάλογα με το ποια πρωτόκολλα χρησιμοποιούνται και τον πληθυσμό που υποβάλλεται σε διάγνωση ελονοσίας [47].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαγνωστική απόδοση περιλαμβάνουν την ποιότητα της προετοιμασίας του δείγματος, αποτελεσματικότητα εκχύλισης του νουκλεϊκού οξέος, την ποσότητα αίματος, την ποσότητα του προτύπου που περιλαμβάνεται στην αντίδραση, ο αριθμός αντίγραφων της ακολουθίας-στόχου και των ρυθμιστικών διαλυμάτων, των ενζύμων και άλλων υλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Η ποσότητα του αίματος που χρησιμοποιείται για ενίσχυση και οι μέθοδοι απομόνωσης (extraction) είναι οι κρίσιμοι παράγοντες για τον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης μεθόδων σε περιοχές πολύ χαμηλής μετάδοσης, όπου είναι πιθανές λοιμώξεις χαμηλής πυκνότητας [43].

### 1.7.3.2 Εμφωλεασμένη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Nested-PCR)

Στην μέθοδο αυτή, τα δείγματα ενισχύονται χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (nested-PCR) (για το *Plasmodium* το 18S rRNA γονίδιο), προσαρμοσμένα στο αρχικό πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Snounou et al. (1993) [47]. Το χαρακτηριστικό στην nested-PCR είναι ότι χρειάζονται δύο ομάδες εκκινητών που χρησιμοποιούνται σε διαδοχικές αντιδράσεις [43].

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι ένα ζεύγος ειδικό για το γένος *Plasmodium*, με τις ονομασίες rPLU5 (5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3') και rPLU6 (5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'), οι οποίοι ενισχύουν ένα προϊόν PCR 1.100 ζεύγη βάσεων (bp) από το γονίδιο μικρής υπομονάδας rRNA (18S rRNA). Στο δεύτερο βήμα χρησιμοποιούνται δύο ειδικοί εκκινητές για ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδιακών προϊόντων για τα είδη του πλασμοδίου. Συγκεκριμένα, για το *P. falciparum* οι προοριζόμενοι εκκινητές είναι οι rFAL1 (5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3') και rFAL2 (5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3') με μέγεθος 205 ζ.β. (bp) του PCR προϊόντος. Για το *P. vivax* το ζεύγος εκκινητών είναι rVIV1 (5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3') και rVIV2 (5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3') με μέγεθος 120 ζ.β. (bp) του PCR προϊόντος. Για το *P. ovale* οι εκκινητές είναι rOVA1 (5'-ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA-3') και rOVA2 (5'-GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG-3') με μέγεθος 800 ζ.β. (bp) του PCR προϊόντος. Τέλος, για το *P. malariae* είναι οι εκκινητές rMAL1 (5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3') και rMAL2 (5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3') με μέγεθος 144 ζ.β. (bp) του PCR προϊόντος [48-49].

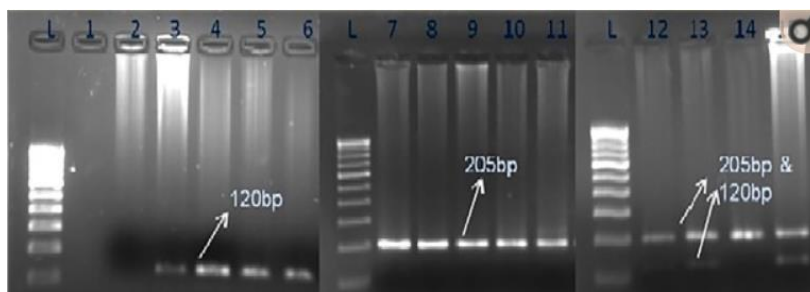
Οι συνθήκες των κύκλων της τεχνικής είναι η αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από 24 κύκλους υβριδοποίησης εκκινητών στους 58°C για 2 λεπτά, με συνέχεια της επιμήκυνσης στους 72°C για 2 λεπτά και της αποδιάταξης στους 94°C για 1 λεπτό, ακολουθούμενο από μια τελική υβριδοποίηση εκκινητών στους 58°C για 2 λεπτά και επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά. Η θερμοκρασία στη συνέχεια μειώνεται στους 4°C έως ότου ληφθούν τα δείγματα. Οι



παράμετροι κύκλου για τον δεύτερο γύρο της PCR ήταν οι ίδιες με την πρώτη αντίδραση, αλλά χρησιμοποιούνται 30 κύκλοι ενίσχυσης.

Τα ενισχυμένα προϊόντα ανιχνεύονται με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου μετά από ηλεκτροφόρηση πήκτωματος αγαρόζης 2%, με τα συγκεκριμένα εμφανιζόμενα μεγέθη των PCR προϊόντων που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Εικ. 27) [47]. Μερικά παραδείγματα επιδόσεων για τη δεδομένη μέθοδο είναι πως το όριο ανίχνευσης είναι τουλάχιστον 6 παράσιτα/μL για κηλίδες αίματος. Αποτελεί πιο ευαίσθητη μέθοδο από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ένα βήμα για τα τέσσερα κύρια είδη πλασμοδίου. Τέλος, ο χρόνος λήψης του αποτελέσματος είναι τρεις (3) ώρες και ο συνολικός χρόνος της διαδικασίας είναι 10 ώρες [43].

Γενικότερα, η nested-PCR είναι πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με την μικροσκοπήση, επιτρέποντας την ανίχνευση του *Plasmodium* σε περιπτώσεις με χαμηλά επίπεδα παρασίτων, καθώς και μικτών λοιμώξεων της ελονοσίας [49]. Τα μειονεκτήματα σε αυτήν την τεχνική είναι η χρήση δύο ομάδων εκκινητών σε διαδοχικές αντιδράσεις, επομένως υπάρχει περισσότερη δαπάνη και χρειάζεται περισσότερος χρόνος, καθώς υπάρχουν και πιο πιθανές μολύνσεις από μία PCR ενός σταδίου [43].



**Εικόνα 27** Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης που φαίνονται οι ζώνες από 15 αντιπροσωπευτικά προϊόντα PCR, (η πρώτη διαδρομή (διαδρομή L) περιέχει τον μοριακό δείκτη (δείκτης 100 ζ.β.) για σύγκριση προϊόντων PCR και για προσδιορισμό του μεγέθους του προϊόντος. Η διαδρομή ένα (1) περιέχει προϊόντα PCR από αρνητικό μάρτυρα, η διαδρομή δύο (2) περιέχει προϊόν αρνητικού μάρτυρα με ανθρώπινο DNA. Οι διαδρομές τρία έως έξι (3–6) εμφανίζουν προϊόν PCR 120 ζ.β. (bp) που σημαίνει μόλυνση μόνο από *P. vivax* και οι διαδρομές επτά έως έντεκα (7–11) δείχνουν προϊόν PCR 205 ζ.β. (bp) που μαρτυρεί μόνο μόλυνση του *P. falciparum*. Οι διαδρομές 13 και 15 παρουσιάζουν και τις δύο ζώνες μεγέθους 120 bp (*P. vivax*) και 205 bp (*P. falciparum*) σε ένα μόνο δείγμα, υποδεικνύοντας μικτές μολύνσεις ειδών, λόγω αυτών των δύο ειδών παρασίτων ελονοσίας) [48].

### 1.7.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

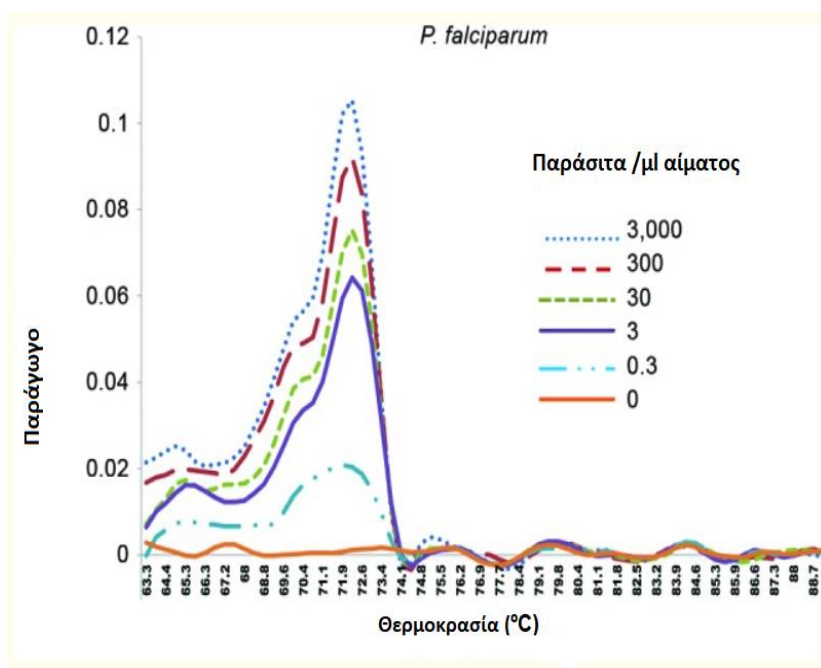
Είναι συχνό φαινόμενο, σε ένα δείγμα, να είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της ποσότητας ενός συγκεκριμένου μορίου γενετικού υλικού (DNA ή RNA). Η πραγματοποίηση ποσοτικοποιημένων μεθόδων αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ανάγνωσης (Real-Time PCR) έχει ως αποτέλεσμα, τη ποσοτική μέτρηση των προϊόντων αλλά και την παρακολούθηση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, το ρυθμό πολλαπλασιασμού του DNA-στόχου.

Σε αυτήν την τεχνική χρησιμοποιείται μοριακός ιχνηθέτης που συνίσταται σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο, του οποίου το ένα άκρο φέρει μία ομάδα απορρόφησης φθορισμού και το άλλο άκρο μία φθορίζουσα ομάδα. Ο ιχνηθέτης αυτός έχει σχεδιαστεί ώστε να δημιουργεί μία δομή στελέχους-βρόχου (stem-loop structure), φέροντας κοντά την ομάδα απορρόφησης φθορισμού και την φθορίζουσα ομάδα. Τη χρονική στιγμή αυτής της δομής και με φως υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), μέσω της διαδικασίας μεταφοράς ενέργειας μέσω αντανάκλασης φθορισμού (FRET-Fluorescence Resonance Energy Transfer), δεν πραγματοποιείται εκπομπή φωτός. Αυτό συμβαίνει γιατί η εκπομπή ενέργειας της φθορίζουσας ομάδας απορροφάται από την ομάδα απορρόφησης φθορισμού. Αντίθετα, όταν ο μοριακός ιχνηθέτης υποστεί θέρμανση και υβριδοποίηση με την αλληλουχία-στόχο που πολλαπλασιάζεται, η διαμόρφωσή του αλλάζει. Με την αλλαγή αυτή, υπό υπεριώδη ακτινοβολία εκπέμπεται φως, διότι η ομάδα απορρόφησης φθορισμού απομακρύνεται από τη φθορίζουσα ομάδα. Έτσι, καθώς συμβαίνει η αντίδραση με την αύξηση της ποσότητας αλληλουχίας-στόχου, ο αυξανόμενος φθορισμός μετριέται, με αποτέλεσμα να υπάρχει μέτρο αύξησης αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων μορίων (Εικ. 28).

Με τη χρήση μοριακών ιχνηθετών, οι οποίοι είναι σημασμένοι με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες (π.χ. Sybr Green), πραγματοποιείται εκπομπή φωτός διαφορετικού μήκους κύματος, με την επίτευξη ταυτόχρονης παρακολούθησης προϊόντων PCR σε μία μόνο αντίδραση [44]. Η αναγνώριση των πλασμιδίων της ελονοσίας πραγματοποιείται με ενίσχυση RT-PCR του γονιδίου rRNA 18SSU, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο από τους Mangold et al. (2005) και με βάση αυτό χρησιμοποιείται ένα συναινετικό ζεύγος εκκινητών για την ενίσχυση μιας ειδικής, για το είδος, περιοχής του γονιδίου rRNA 18SSU [50].



Οι συνθήκες αντίδρασης αποτελούνται και σε αυτήν την μέθοδο, από την αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από 40 κύκλους 90°C για 30 δευτερόλεπτα και 60°C για 30 δευτερόλεπτα. Η απόκτηση φθορισμού πραγματοποιείται στο τέλος κάθε σταδίου επιμήκυνσης [47]. Η ενίσχυση και η ανίχνευση φθορισμού πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας ειδικό θερμοκυκλοποιητή πραγματικού χρόνου. Το εύρος των θερμοκρασιών τήξης ( $T_m$ ) για κάθε *Plasmodium* είναι 74-76°C για το *P. vivax*, 71-73°C για το *P. falciparum* και 68-70 °C για το *P. malariae* [47]. Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ανάγνωσης, έχουμε ταχεία ενίσχυση, ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών φθορισμού που στοχεύουν το γενετικό υλικό. Το όριο ανίχνευσης σε αυτήν την τεχνική είναι 0,02 παράσιτα/μL για την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους, 1,22 παράσιτα/μL για ανίχνευση *P. falciparum*. Τέλος, ο χρόνος λήψης του αποτελέσματος είναι μία (1) ώρα και ο συνολικός χρόνος της διαδικασίας είναι δύομιση (2,5) ώρες [43].



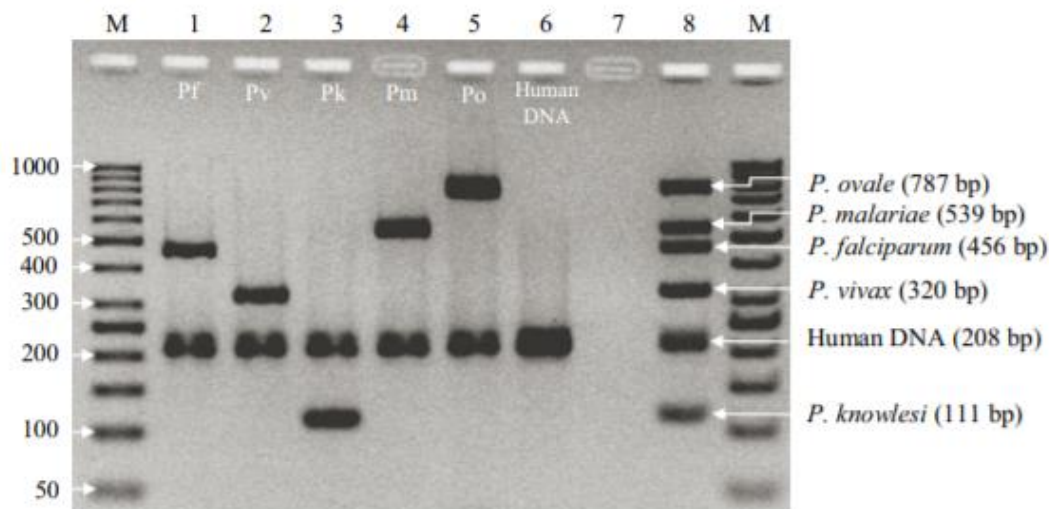
**Εικόνα 28** Σχηματική απεικόνιση πραγματοποίησης μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR), (*P. falciparum*, με αραιώσεις δειγμάτων 3.000, 300, 30, 3, 0,3 και 0 παράσιτο / μL αίματος) [47].

### 1.7.3.4 Πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Multiplex PCR)

Στην πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, το πλεονέκτημα είναι πως πραγματοποιείται ταυτόχρονη, πολλαπλή αντίδραση που ανιχνεύει την παρουσία πολλαπλών ειδών πλασμοδίου [43]. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί και αυτή θερμικό κυκλοποιητή.

Οι συνθήκες PCR αποτελούνται από την αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποδιάταξης στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, την υβριδοποίηση εκκινητών στους 58°C για 30 δευτερόλεπτα, και την επιμήκυνση στους 72°C για 45 δευτερόλεπτα, με τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά.

Το τελικό προϊόν της αντίδρασης φορτώνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, για 30 λεπτά. Τα δείγματα χρωματίζονται με βρωμιούχο αιθίδιο για 15 λεπτά και απεικονίζονται κάτω από υπεριώδη μετασχηματιστή (Εικ. 29) [51]. Τέλος, ο χρόνος λήψης του αποτελέσματος είναι δύο ώρες και ο συνολικός χρόνος της διαδικασίας είναι 4,5 ώρες [43].



**Εικόνα 29** Αποτελέσματα της ανάλυσης δειγμάτων ελονοσίας με την τεχνική multiplex PCR (Διαδρομή M: μοριακός δείκτης 50 ζ.β., διαδρομή 1: *P. falciparum*, διαδρομή 2: *P. vivax*, διαδρομή 3: *P. knowlesi*, διαδρομή 4: *P. malariae*, διαδρομή 5: *P. ovale*, διαδρομή 6: υγιές ανθρώπινο DNA δείγματος, διαδρομή 7: αρνητικός μάρτυρας (DNA κενό), διαδρομή 8: θετικός μάρτυρας και για τα 6 είδη *Plasmodium*.) [51].

### 1.7.3.5 Σύγκριση των τριών δοκιμασιών PCR

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης σε πραγματικό (RT-PCR) είναι μια γρήγορη, αυτοματοποιημένη, ακριβής και αποτελεσματική τεχνική για εφαρμογές με μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Αυτή η ανάλυση δείχνει υψηλό βαθμό ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε σύγκριση με τη μικροσκοπηση. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος έχει πλεονεκτήματα έναντι της εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (nested-PCR).

Για παράδειγμα, περιλαμβάνει μόνο ένα βήμα επεξεργασίας, ενώ η nested-PCR απαιτεί τουλάχιστον δύο. Η PCR σε πραγματικό χρόνο εκτελείται σε κλειστό σύστημα, το οποίο μειώνει την πιθανότητα μόλυνσης και απαλλάσσει το χειρισμό τοξικών αντιδραστηρίων και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ακόμα, τα αποτελέσματα λαμβάνονται τέσσερις φορές γρηγορότερα από αυτά της nested-PCR και αυτή η τεχνική επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παρασίτων. Οι Farcas et al. (2004) κατέδειξαν τη συσχέτιση μεταξύ του βαθμού παρασιταϊμίας που λαμβάνεται από δείγμα αίματος και του αριθμού αντιγράφων γονιδίων, που ενισχύονται με PCR σε πραγματικό χρόνο. Χρησιμοποιώντας την παχιά κηλίδα αίματος ως σημείο αναφοράς, με συγκριτική μελέτη μεταξύ της εμφωλεασμένης PCR, της πολυπλεκτικής PCR και της PCR σε πραγματικό χρόνο, διαπίστωσαν ότι η τελευταία παρουσίασε καλύτερη απόδοση όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητα (Πίν. 9) [52].

**Πίνακας 9** Σύγκριση ευαισθησίας και ειδικότητας των τριών διαγνωστικών μεθόδων (μικροσκοπηση, μοριακή ταυτοποίηση με χρήση εκκινητών nested PCR και multiplex PCR) [51].

| Είδη πλασμοδίων      | Ποσοστό (%) | Σύγκριση μεθόδων                  |                                      |                                |
|----------------------|-------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
|                      |             | <u>Μικροσκοπηση</u><br>Nested PCR | <u>Μικροσκοπηση</u><br>Multiplex PCR | <u>Nested PCR</u><br>Multiplex |
| <i>P. falciparum</i> | Ευαισθησία  | 75                                | 75                                   | 75                             |
|                      | Ευαισθησία  | 87                                | 87                                   | 83.3                           |
| <i>P. vivax</i>      | Ευαισθησία  | 100                               | 100                                  | 100                            |
|                      | Ευαισθησία  | 91                                | 80                                   | 87                             |
| <i>P. knowlesi</i>   | Ευαισθησία  | 8.8                               | 8.9                                  | 86.6                           |
|                      | Ευαισθησία  | 100                               | 100                                  | 66.7                           |
| <i>P. malariae</i>   | Ευαισθησία  | 100                               | 100                                  | 100                            |
|                      | Ευαισθησία  | 23.6                              | 24.4                                 | 100                            |

### 1.7.3.6 Γονοτυπική ανάλυση

Οι διεξαγωγές αναλύσεων της πληθυσμιακής δομής των παρασίτων που προκαλούν την ελονοσία (*Plasmodium*) σε επιδημιολογικό επίπεδο σε ενδημικές και μη περιοχές κρίνονται απαραίτητες.

Στο πλαίσιο διεξαγωγής τους, γίνεται αντιληπτός ο τρόπος που επηρεάζεται η μετάδοση της νόσου από την ποικιλομορφία που έχουν τα παρασίτα. Επιπρόσθετα, σχεδιάζονται οι εκάστοτε χειρισμοί που αφορούν το σχεδιασμό και την αξιολόγηση της φαρμακευτικής αποτελεσματικότητας εμβολιαστικών σκευασμάτων έναντι της νόσου [53]. Το σπουδαιότερο από όλα είναι η εφαρμογή της γονοτυπικής ανάλυσης στην δοκιμή αποτελεσματικότητας των ανθελονοσιακών φαρμάκων. Μέσα από τις κλινικές δοκιμές, πραγματοποιείται η αξιολόγηση των φαρμάκων σύμφωνα με την κλινική και παρασιτική εικόνα [54].

Τα τελευταία 30 (τριάντα) χρόνια, έχουν καταγραφεί εκατοντάδες εκατομμύρια μολύνσεις ελονοσίας στο ανθρώπινο είδος και δεκάδες εκατομμύρια θάνατοι, με κύρια εστία την υποσαχάρια Αφρική [8]. Σύμφωνα με επίσημα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, αναφέρονται για το έτος 2019 87 περιπτώσεις χωρών συνεχιζόμενης μετάδοσης ελονοσίας με καταμέτρηση 409.000 θανάτων [8]. Συμπερασματικά με αυτό, η θεραπεία τη νόσου έχει πρωταρχικό ρόλο, ώστε να αποφευχθούν τα εκατομμύρια περιπτώσεων και να μειωθούν οι θάνατοι των ανθρώπων. Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητη η χρήση γονοτυπικής ανάλυσης για ενδείξεις της αποτελεσματικότητας των ανθελονοσιακών φαρμάκων [8, 54]. Σε ενδημικές περιοχές με υψηλή μεταδοτικότητα της νόσου, έχει καταγραφεί υψηλή εμφάνιση μόλυνσης με επιπρόσθετα παράσιτα, μέσω της δράσης προγραμμάτων παρακολούθησης ανθελονοσιακών δοκιμών. Ύστερα από ένα χρονικό διάστημα ημερών από τη χορήγηση του ανθελονοσιακού σκευάσματος, υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης νέας λοίμωξης από το ήπαρ, λόγω πτώσης της επίδρασης πλέον των ανθελονοσιακών, σε χαμηλά επίπεδα. Ειδικότερα, η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των φαρμάκων και της γονοτύπησης του γενετικού υλικού του δείγματος, πριν και μετά τη λήψη αυτών μπορεί να συμβάλλει στην έναρξη της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, με αποφυγή επανεμφάνισης της νόσου [54].

Κατά τη διάρκεια των ετών 1997 έως 2007 πραγματοποιήθηκαν πάνω από 115 κλινικές δοκιμές, σε περιοχές όπου ενδημεί η ελονοσία, για αρκετά ανθελονοσιακά φάρμακα [54]. Χρησιμοποιήθηκαν ως μοριακοί δείκτες το γονίδιο

αντιγόνου της πλούσιας σε γλουταμινικό πρωτεΐνης *gluB*, της επιφανειακής πρωτεΐνης μεροζωϊτών *msp1* και της επιφανειακής πρωτεΐνης *msp2*, με τη τελευταία να χρησιμοποιείται σε επίπεδα της τάξεως του 97%. Τα δεδομένα τρία γονίδια έχουν επιφέρει ωφέλιμα αποτελέσματα με την χρήση τους σε παγκόσμιο επίπεδο [54].

Οι περιπτώσεις νέων λοιμώξεων δύνανται να καθορισθούν μέσω της γονοτύπησης. Ωστόσο, το δεδομένο επιτυγχάνεται με την συνιστώμενη, χρονικά λήψη δείγματος, η οποία είναι πριν την έναρξη θεραπείας και η επόμενη, με την επανεμφάνιση συμπτωμάτων αφού όμως, είχαν εξαφανιστεί. Τα αλληλόμορφα των παρασίτων που εμφανίζονται σύμφωνα με τη γονοτυπική σύγκριση των δύο συνιστώμενων δειγματοληψιών μπορεί να είναι διαφορετικά, με συμπέρασμα νέας παρασιτικής λοίμωξης. Από την άλλη, έστω και ένα αλληλόμορφο να είναι κοινό σε κάθε τόπο, η εκάστοτε λοίμωξη χαρακτηρίζεται ως υποτροπή της νόσου. Δηλαδή, εάν στην οπτικοποίηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη χρήση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης και συγκεκριμένων ειδικών πρωτόκολλων, υπάρχει παρουσία έστω και μίας ζώνης που αντιστοιχεί με ζώνη στην πρώτη ανάλυση χαρακτηρίζεται ως υποτροπή. Στην περίπτωση αυτή, αν υπάρχουν ενδείξεις καινούριων ζωνών, είτε μίας ζώνης είτε πολλών, δεν επηρεάζουν το συμπέρασμα του χαρακτηρισμού ως υποτροπιάζουσας περίπτωσης (Εικ. 30) [54].



**Εικόνα 30** Διαφοροποίηση υποτροπής και νέας λοίμωξης με τη συμβολή της γονοτύπησης, με χρήση ενός μοριακού δείκτη. (Ημέρα 0: λήψη δείγματος πριν τη θεραπεία, ημέρα X: λήψη δείγματος μετά τη θεραπεία, με εμφάνιση νέων συμπτωμάτων) [54].

Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την γονοτυπική ανάλυση είναι γονίδια που απαντώνται σε ένα και μόνο αντίγραφο. Τα αναγκαία χαρακτηριστικά αυτών είναι η σταθερότητα που πρέπει να διαθέτουν σε όλα τα στάδια του βιολογικού κύκλου του παρασίτου και υψηλή αλληλική ποικιλομορφία. Η παρουσία υψηλού πολυμορφισμού των γονιδίων και η εύκολη διάκριση των αλληλόμορφων με τη χρήση τους αποτελούν πλεονέκτημα για την επιλογή τους ως μοριακοί δείκτες.

Ο κύριος στόχος στο θέμα επιλογής τέτοιων πολυμορφικών μοριακών δεικτών, όπως των παραπάνω είναι ο εντοπισμός μεταλλάξεων ώστε, να χρησιμοποιηθούν σε επίπεδο φυσικής ανοσίας. Το συγκεκριμένο αποτελεί πολύ δύσκολο ως προς την επίτευξή του, αφού η ανοσία έχει ποικίλα χαρακτηριστικά από άτομο σε άτομο. Άλλοι δείκτες προς χρήση αποτελούν, οι μικροδορυφορικοί δείκτες, οι οποίοι είναι ένας αριθμός από τρία επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια και έχουν την καταλληλότητα επαναλαμβανόμενης τυποποίησης. Παλαιότερα, είχαν χρησιμοποιηθεί και άλλοι μοριακοί δείκτες όπως το γονίδιο *csp*, το γονίδιο της πρωτεΐνης *trap*, καθώς επίσης και το επιφανειακό αντιγόνο ερυθροκυττάρων *resa* [54].

Η γονοτύπηση δεν συνεχίζει σε επόμενες αναλύσεις όταν με έναν συγκεκριμένο μοριακό δείκτη εντοπιστεί νέα λοίμωξη. Στην περίπτωση που δεν υφίστανται ενδείξεις αυτής, τότε η γονοτυπική ανάλυση του ίδιου εξεταζόμενου δείγματος οφείλει περαιτέρω ανάλυση με τη χρήση δεύτερου μοριακού δείκτη. Εάν και σε αυτή την φάση ανάλυσης δεν εντοπιστεί, χρήζει επιπλέον ανάλυση με τη χρήση τρίτου μοριακού δείκτη, με συμπέρασμα εμφάνισης υποτροπής της νόσου, αν δεν υπάρξει και σε αυτήν την περίπτωση η εντόπιση νέας λοίμωξης [54].

Μερικές από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την γονοτυπική ανάλυση των παρασίτων της ελονοσίας είναι η μέθοδος εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Nested PCR), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης/περιορισμού μήκους θραύσματος (PCR/RFLP), καθώς επίσης και ο συνδυασμός αυτών με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Η μέθοδος εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Nested PCR) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πλασμοδίων, τα οποία είναι σε μικρούς πληθυσμούς. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιούνται εκκινητές που είναι ειδικοί ως προς την οικογένεια του προς γονοτυπική ανάλυση παρασίτου. Με την επιλογή αυτή, το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι η αύξηση ευαισθησίας και διάκρισης μεταξύ των αλληλόμορφων που είναι διαφορετικά μεταξύ τους. Το

πρωτόκολλο της μεθόδου είναι πιο αποτελεσματικό από αυτό της πρωτογενούς αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (pPCR). Για τους μοριακούς δείκτες *glurp*, *msp1* και *msp2*, το σύνηθες όριο ανίχνευσης είναι 50 έως 100 παράσιτα για κάθε αντίδραση.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων περιορισμού πραγματοποιείται ένα πρωτόκολλο εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη χρήση γενικών εκκινητών ή ειδικών εκκινητών ως προς την οικογένεια που ανήκει το παράσιτο ώστε να γίνει ενίσχυση. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την αντίδραση αυτή υφίστανται πέψη από περιοριστικά ένζυμα (π.χ. *Hinf I*). Έπειτα, τα πολυμορφικά θραύσματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου με υψηλή ανάλυση. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση των θραυσμάτων σε 100 έως 300 ζ.β. και ειδικότερα η διαφοροποίησή τους να αποτελεί μέχρι και 10 ζ.β. σε θραύσματα με μικρά μεγέθη. Σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η αναγνώριση μεταλλάξεων με τη χρήση αυτής της μεθόδου, αφού στην περίπτωση αυτή προκύπτουν νέες θέσεις ή απώλεια θέσεων στις θέσεις που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα.

Η μέθοδος εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και μεγέθους θραύσματος με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για να προσδιορίσει το μέγεθος των μικροδορυφορικών δεικτών και χρησιμοποιείται για θραύσματα του *msp2*. Ο μοριακός δείκτης *msp2* ενισχύεται από την εμφωλεασμένη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση αντίστροφων εκκινητών που διαθέτουν ετικέτα φθορισμού. Πριν το στάδιο της μετουσίωσης και της φόρτωσης σε ένα αυτοματοποιημένο sequencer, ώστε να εξακριβωθεί το μέγεθος των θραυσμάτων που προέκυψαν, γίνεται η πρόσθεση ενός γνωστού μεγέθους με επισήμανση φθορισμού. Ο υπολογισμός των μεγεθών των θραυσμάτων υπολογίζονται με ένα ειδικό λογισμικό [54].

Το *P. falciparum* αποτελεί το επικρατέστερο είδος πλασμοδίου ελονοσίας στην ήπειρο της Αφρικής με την πρόκληση των περισσότερων θανάτων παγκοσμίως [4]. Η γονοτυπική ανάλυση επιφέρει αποτελέσματα με τη σωστή χρήση συγκεκριμένου πρωτόκολλου για κάθε είδος πλασμοδίου και μοριακών δεικτών [54]. Μεγάλες έρευνες έχουν γίνει για το *P. falciparum*, όπου έχει μελετηθεί η ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν ένα ή πολλαπλά πολυμορφικά αντιγόνα αλλά και η δυναμική που έχουν αυτά [53]. Για δοκιμές ανθελονοσιακών με συνδυασμό γονοτύπησης κατά του *P. falciparum* χρησιμοποιούνται ειδικοί μοριακοί δείκτες.

Αυτοί είναι τα *glurp*, *mSP1*, *mSP2* με συνιστώμενη χρήση ειδικών εκκινήτων ως προς την οικογένεια του παρασίτου για τα δύο τελευταία, στην μέθοδο εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι μοριακός δείκτης του γονιδίου *mSP2* ή του γονιδίου *glurp* έχουν προτεραιότητα στη γονοτύπηση, τα οποία διαθέτουν πιο υψηλή διάκριση και ακολουθεί ο μοριακός δείκτης του γονιδίου *mSP1*. Για αυτόν τον λόγο όλοι οι μοριακοί δείκτης που συμμετέχουν σε αναλύσεις γονότυπων, οφείλονται να συνδυάζονται με κατάλληλες τεχνικές που επιτυγχάνουν την καλύτερα δυνατή εμφάνιση εμφάνιση της ποικιλομορφίας αυτών [54]. Τέλος, κάποιες έρευνες ως προς κάποια γονίδια (*pfhrp2* και *pfhrp3*) του *P. falciparum* στο παρελθόν, παρουσίασαν την καταγραφή απαλοιφών, το οποίο οδηγεί σε στοιχεία προς αύξησης του επιπολασμού της νόσου και δυσκολία διάγνωσης αυτής με κάποιες μεθόδους, στην ήπειρο της Αφρικής [4].

Το *P. vivax* εμφανίζεται με μεγαλύτερα ποσοστά κρουσμάτων από το *P. falciparum* σε κάποιες χώρες, όπως χώρες της Αμερικής και της Ευρώπης [4]. Ως εκ τούτου, σε αυτές τις χώρες χρήζει πρόσθετα η έρευνα σε αυτό το πλασμώδιο για την αποτελεσματική αντιμετώπισή του [4]. Δεν έχουν αναφερθεί ακόμη μελέτες που χρησιμοποιούν υψηλούς πολυμορφικούς δείκτης, ώστε να γίνει σύγκριση [53]. Όμως, όσον αφορά το *P. vivax*, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί μοριακοί δείκτης για τον γονότυπο του. Αυτοί κατηγοριοποιούνται στην ομάδα που βρίσκονται υπό φυσική επιλογή και στην ομάδα που είναι εξελικτικά ουδέτεροι ή σχεδόν ουδέτεροι. Ευρέως χρησιμοποιημένα γονίδια για την έρευνα γονότυπων αποτελούν το γονίδιο που κωδικοποιεί την επιφανειακή πρωτεΐνη μεροζωϊτών-1 (*Pvmsp-1*) και την πρωτεΐνη επιφάνειας μεροζωϊτών-3α (*Pvmsp-3α*), καθώς και την επιφανειακή πρωτεΐνη *Plasmodium vivax* των περισποροζωϊτών (*Pvcs*). Η χρήση τους οφείλεται στα χαρακτηριστικά που έχουν, αφού είναι πολύ πολυμορφικά και υπό φυσική επιλογή.

Επιπρόσθετα, μελέτες των τελευταίων ετών κάνουν χρήση μικροδορυφορικών δεικτών (MS-microsatellite markers) για την έρευνα της ποικιλομορφίας που παρουσιάζει το *P. vivax*. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι πως η εκτέλεσή τους γίνεται με λιγότερο κόπο και είναι επιλεκτικά ουδέτεροι. Εκτός αυτών, η ανάλυση με τη χρήση τους αυξάνεται σε σύγκριση με τους *Pvcs*, *Pvmsp-1* και *Pvmsp-3α* γενετικούς δείκτης, αντίστοιχα [55].

Για τη γονοτύπηση απομονωμένων στελεχών των δειγμάτων που λήφθηκαν από τα μολυσμένα με *P. vivax* άτομα στην Ελλάδα το 2011 χρησιμοποιήθηκαν



συνδυαστικά τρεις από τους μοριακούς δείκτες (Pvmsp-3a και τα MS m1501 και m3502) [55]. Ο στόχος μέσα από αυτή την εργαστηριακή έρευνα ήταν η πιθανή εύρεση αιτίας της έξαρσης των κρουσμάτων και πιο συγκεκριμένα ο προσδιορισμός πολλαπλών επαναεισαγωγών του *P. vivax* και ταυτόχρονα ο εντοπισμός περιοχών που έχουν συνεχή μετάδοση. Συμπερασματικά, η κατανόηση των περιοχών που έχουν μεγαλύτερη μετάδοση θα ενισχύσει τα επιδημιολογικά ευρήματα. Είναι σημαντική η καταγραφή των γονότυπων των αυξημένων αυτών κρουσμάτων του 2011, για τη σύγκριση και τη λήψη σωστών αποφάσεων για την πρόληψη και τον έλεγχο σε πιθανές επιδημίες της νόσου από το *P. vivax* σε μελλοντικό χρόνο στην Ελλάδα [55].

Η φυσική ανοσία ενός ατόμου και η ανοσία που αποκτά από το εμβόλιο κατά της νόσου στοχεύουν στις πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των μεροζωιτών. Το γονίδιο PvMsp-3a ανήκει στην οικογένεια γονιδίων Msp3 και σχετίζεται με την επιφανειακή πρωτεΐνη-3 (PfMsp-3) των μεροζωιτών του είδους *P. falciparum* σε γενετικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, η αναστολή ανοσίας, που αποκτά ένα άτομο με φυσικό τρόπο λόγω επαναλαμβανόμενης μόλυνσης από τη νόσο, οφείλεται σε αυτό το μόριο. Αυτό συμβαίνει διότι προκαλεί αναστολή των κυττάρων που μεσολαβούν για την εμφάνιση αντισωμάτων. Λόγω αυτού, η επιστήμη με στόχο υποψήφια εμβόλια οδηγήθηκε σε αυτό, με ένδειξη ενδιαφέροντος στην οικογένεια αντιγόνων Msp-3a του είδους *P. vivax*, αλλά και με το σκεπτικό της ανοσογόνου δράσεως. Τα γονίδια αυτά και οι κωδικοποιημένες πρωτεΐνες κατέχουν πολυμορφισμό σε υψηλό βαθμό [53]. Αυτό ερευνήθηκε σε εργαστήρια μέσα από ενίσχυση και ανάλυση αλληλουχίας γονιδίων PvMsp-3a με τη χρήση συντηρημένων και απομονωμένων στελεχών *P. vivax* που λήφθηκαν από ασθενείς διάφορων γεωγραφικών περιοχών (Κεντρική και Νότια Αμερική, Ινδία και Νότια Ασία) [53]. Οι υπάρχουσες διατηρημένες πλευρικές περιοχές παρέχουν τη δυνατότητα για ενίσχυση με την τεχνική PCR του PvMsp-3a γονιδίου. Η πολυμορφική φύση που έχουν αυτά τα μόρια υποδηλώνει πιθανή ύπαρξη της δύσκολης θέσης τους από ανοσολογικής επιλογής [53].

Αποτελεί σημαντικό κομμάτι η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων πριν τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για τη σύνθεση των γονοτύπων των παρασίτων με αντίστοιχους μοριακούς επιδημιολογικούς δείκτες με υψηλό βαθμό πολυμορφισμού. Οι παρόντες δείκτες *Plasmodium vivax* διαθέτουν είτε ανεπαρκή πολυμορφισμό και χρειάζονται πολύπλοκες μεθόδους ή αλληλουχία ώστε να ανιχνευθεί ο

πολυμορφισμός ή απαιτούν μεγάλες ποσότητες αίματος για βιοχημικές και ορολογικές μεθόδους [53].

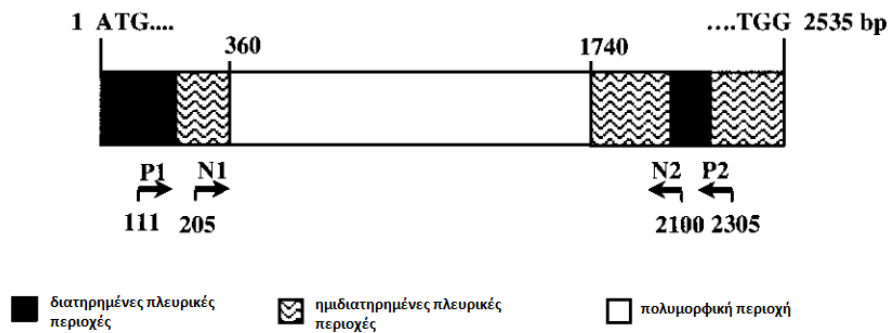
Το είδος του πλασμωδίου που έχει καταγραφεί στον Ελλαδικό χώρο με αποκορύφωμα την επιδημική έξαρση που εμφανίστηκε το έτος 2011 στη Λακωνία είναι το *P. νίναχ* [15, 55]. Έκτοτε, το Κέντρο Αναφοράς Ελονοσίας σε συνεργασία με τον ΕΟΔΥ καταγράφει την ετήσια κατανομή στελεχών *P. νίναχ* στον Ελλαδικό χώρο, παρακολουθώντας τυχόν επιδημικές εξάρσεις μεμονωμένων γεωγραφικών περιοχών [15, 55].

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης/περιορισμού μήκους θραύσματος (PCR/RFLP)**

Η παρουσία ενός πρωτόκολλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης/περιορισμού μήκους θραύσματος (PCR/RFLP) που βασίζεται στο γονίδιο *PvMsp-3a* που αναφέρθηκε προηγουμένως, αποδεικνύει τη χρησιμότητά του στις αναλύσεις στελεχών *P. νίναχ*. Η βασική προϋπόθεση είναι να αξιολογηθούν τα αλληλόμορφα που υπάρχουν της πρωτεΐνης-3a (*PvMsp-3a*)της και ο αριθμός τους ώστε, να πραγματοποιηθεί η ανάλυση [53].

### **Ενίσχυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης του γονιδίου *Pv-Msp3a***

Με την χρήση της τεχνικής εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιείται ενίσχυση γονιδίων *PvMsp3a*. Η διαδικασία γίνεται σε όγκους αντίδρασης 20 μl με 1-2 μl εκχύλισμα (extracts) DNA στον αρχικό κύκλο και 1,01 μl της πρώτης αντίδρασης στον γύρο της nested. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές PCR, που είναι οι πρωτεύοντες (P-Primary) και οι ένθετοι (N-nested) σχεδιάστηκαν από περιοχές που είναι γνωστό ότι διατηρούνται εντός έξι στελεχών του μορίου *P. νίναχ* (Galinski MR, Barnwell JW, unpublished data) (Εικ. 31).



**Εικόνα 31** Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου της επιφανειακής πρωτεΐνης μεροζωϊτών-3<sup>α</sup> του *P. vivax* (Pmmsp-3α) [53].

Συγκεκριμένα, οι εκκινητές αυτοί είναι: P1 5'-CAGCAGACACCATTTAAGG-3', P2 5'-CCGTTTGTGATTAGTTGC-3' και N1 5'-GACCAGTGTGATACCATTAACC-3', N2 5'-ATACTGGTTCTTCGTCTTCAGG-3' [53]. Για να ελεγχθεί η απουσία χαρακτηριστικών του ζεύγους εκκινητών που έχουν σημασία χρησιμοποιούνται προγράμματα υπολογιστών, Amplify (Engels W, University of Wisconsin, Madison, WI) και Primers 1.2 (Andersen R, Bristol, G, University of California, Los Angeles, CA) [53]. Όσον αφορά την Taq-πολυμεράση (Promega, Madison, WI) χρησιμοποιείται μία μονάδα ανά αντίδραση, με ολιγονουκλεοτιδικούς εναρκτές σε 0,1 mM τελική συγκέντρωση και 0,15 mM από καθένα από τα 4 τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (παρέχεται με Taq) με 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> που περιέχεται. Οι συνθήκες των κύκλων είναι οι εξής: πρωτογενής αντίδραση, 94 C για 3 λεπτά, 1 κύκλος, στη συνέχεια 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 56°C για 30 δευτερόλεπτα, 68 C για 2,5 λεπτά, 35 κύκλοι. Στην ένθετη (nested) αντίδραση, 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, 57 C για 30 δευτερόλεπτα, 68°C για 2,5 λεπτά, 30 κύκλοι. Τα προϊόντα της PCR γίνονται εμφανή υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV) με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% με περιεχόμενο το βρωμιούχο αιθίδιο με 0,25 mg/ml. Η παράλληλη χρήση των δεικτών μοριακών μεγεθών εξυπηρετεί ως μέτρο σύγκρισης των εξαχθέντων ζωνών των υπό διερεύνηση δειγμάτων (0,1 mg/λωρίδα, δείκτης (ladder) 1-kb, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) [53]. Η ταξινόμηση των διαφορετικών γονότυπων των εξαχθέντων PCR προϊόντων γίνεται με γράμματα ως A (περίπου 1.900 ζ.β.), B

(περίπου 1.500 ζ.β.) ή C (περίπου 1.150 ζ.β.) γονότυπους, σύμφωνα με το μέγεθος των ζωνών, αντίστοιχα [55].

### **Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραύσματος περιορισμού των προϊόντων ενίσχυσης PnMsp-3a**

Σε αυτό το στάδιο, από κάθε προϊόν PCR λαμβάνονται 4 μl και υπόκεινται σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού HhaI και ξεχωριστά με το AluI, αντίστοιχα. Οι όγκοι της αντίδρασης είναι 20 μl (5 μονάδες ενζύμου/αντίδρασης Promega) σε ρυθμιστικό διάλυμα με το ένζυμο για 4-5 ώρες στους 37°C. Η οπτικοποίηση των θραυσμάτων DNA γίνεται υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV) με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8% με περιεχόμενο το βρωμιούχο αιθίδιο με 0,25 mg/ml. Για να γίνει η μέτρηση των μεγεθών των ζωνών πραγματοποιείται και σε αυτό το σημείο η παράλληλη χρήση των δεικτών μοριακών μεγεθών, οι οποίοι εξυπηρετούν ως μέτρο σύγκρισης (0,1 mg/λωρίδα, δείκτης XIV, Roche Diagnostics) [53]. Σε αντίθεση με το προηγούμενο στάδιο, η ταξινόμηση του μοτίβου των εξαχθέντων ζωνών γίνεται με τη χρήση συγκεκριμένων αριθμών (για παράδειγμα A10, A3, C1) [55].

## 1.8 Πρόληψη

Για να επιτευχθεί η σωστή πρόληψη από την ελονοσία, θα πρέπει να ληφθούν και να τηρηθούν κάποια προληπτικά μέτρα. Αυτά τα μέτρα πρόληψης οφείλουν να εφαρμόζονται σε ατομικό και κοινοτικό επίπεδο. Ιδιαίτερα σημαντικά κρίνονται τα μέτρα πρόληψης σε ταξιδιώτες, που ταξιδεύουν σε χώρες όπου η ελονοσία ενδημεί.

### Ατομικά προληπτικά μέτρα προστασίας

Τα αναφερόμενα προληπτικά μέτρα προστασίας αφορούν το κάθε άτομο ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, το κάθε άτομο θα πρέπει να κάνει χρήση κατάλληλων ρούχων, τα οποία καλύπτουν όσο το δυνατόν περισσότερο το σώμα του (μακριά μανίκια και παντελόνια, ανοιχτόχρωμα και φαρδιά ρούχα). Επιπλέον, θα πρέπει να γίνεται χρήση εντομοαπωθητικών σε ακάλυπτο δέρμα ακόμα και πάνω από τα ρούχα, με δραστικές ουσίες (DEET, πικαριδίνη/ικαριδίνη, IR 3535, αιθέρια έλαια ευκάλυπτου). Επίσης, η χρήση κουνουπιέρας στη διάρκεια του ύπνου είναι πολύ σημαντική κυρίως σε βρέφη, παιδιά, ηλικιωμένους, πάσχοντες, εγκύους. Επίσης, η ατομική καθαριότητα έχει αποτέλεσμα, λόγω απομάκρυνσης του ιδρώτα.

### Προληπτικά μέτρα στο σπίτι

Κάθε οικογένεια ή ατομικά το κάθε άτομο θα πρέπει να λαμβάνει κάποια μέτρα που αφορούν την οικία που διαμένει. Για παράδειγμα, η χρήση σητών σε πόρτες, παράθυρα, φεγγίτες, αεραγωγούς τζακιού, αγωγούς εξαερισμού των βόθρων είναι σημαντικό μέτρο πρόληψης. Επίσης, η χρήση ανεμιστήρων (ιδίως οροφής) ή κλιματιστικών είναι απαραίτητη, καθώς και η χρήση εντομοκτόνων/εντομοαπωθητικών χώρου [π.χ. φιδάκια, αεροζόλ, ηλεκτροδοτούμενες θερμαινόμενες ταμπλέτες και εξατμιζόμενα υγρά κλπ]. Πολύ σημαντική είναι η απομάκρυνση των στάσιμων νερών και από μικρές εστίες (π.χ. από λεκάνες, βάζα, κουβάδες, πιατάκια γλαστρών), όπου τα κουνούπια αφήνουν τα αυγά τους. Τα δοχεία φύλαξης νερού (όπως κουβάδες, καρότσια, βαρέλια) συνιστάται να είναι γυρισμένα ανάποδα ή καλυμμένα. Επιπρόσθετα, το κούρεμα γρασιδιού, θάμνων, φυλλωσιών, όπου τα ενήλικα κουνούπια βρίσκουν καταφύγιο, αποτελεί πολύ καλό μέτρο πρόληψης. Θα πρέπει να γίνεται αντικατάσταση σπασμένων σωλήνων νερού που τρέχουν και καθαρισμός των φύλλων στις υδρορροές. Το πότισμα κατά προτίμηση θα πρέπει να γίνεται το πρωί. Τέλος, η

ύπαρξη/δημιουργία κλίσης στον κήπο, για απομάκρυνση των νερών, αποτελεί και αυτό ένα καλό μέτρο πρόληψης.

### **Προληπτικά μέτρα στην κοινότητα**

Εκτός από τα ατομικά μέτρα πρόληψης και τα μέτρα που θα πρέπει να λαμβάνει κάθε άτομο στο σπίτι του, θα πρέπει και η κοινότητα να λάβει κάποια μέτρα. Αρχικά, θα πρέπει να πραγματοποιείται, καθαρισμός των αγωγών υδάτων και των αρδευτικών καναλιών με ό,τι εμποδίζει την ροή του νερού. Ο καθαρισμός των αγριόχορτων και της βλάστησης από τα επιφανειακά νερά σε κανάλια και ρέματα, είναι επίσης σημαντικός. Επιπλέον, η αποφυγή αλόγιστης χρήσης νερού θα πρέπει να λαμβάνεται, κυρίως όταν δεν υπάρχουν κατάλληλοι αγωγοί αποχέτευσης. Η συστηματική εφαρμογή προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών, όπως οι ψεκασμοί, αποτελεί μία άκρως αναγκαία επεμβατική κίνηση σε επίπεδο πρόληψης της ελονοσίας στην κοινότητα [21, 56]. Τέλος, η αποξήρανση υγροτόπων μπορεί να εξαλείψει τις περιοχές αναπαραγωγής του φορέα [21].

### **Προληπτικά μέτρα σε ταξιδιώτες**

Τα άτομα που ταξιδεύουν σε χώρες που ενδημεί η ελονοσία απαιτούνται να λαμβάνουν μέτρα προφύλαξης. Ξεχωριστά το κάθε μέτρο προφύλαξης δεν παρέχει πλήρη προστασία, συνεπώς με την εφαρμογή όλων μαζί υφίσταται η μέγιστη δυνατή προστασία. Για να μειωθεί ο κίνδυνος δήγματος από κουνούπια στη διάρκεια του ταξιδιού, ο ταξιδιώτης οφείλει να τηρήσει τα μέτρα ατομικής πρόληψης και να χρησιμοποιεί ανθελονοσιακά σκευάσματα (χημειοπροφύλαξη). Η χημειοπροφύλαξη πρέπει να επιλέγεται σύμφωνα με τη χώρα και την περιοχή προορισμού, την εποχή πραγματοποίησης του ταξιδιού, τη διάρκεια του ταξιδιού και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ταξιδιώτη.

Τα ανθελονοσιακά σκευάσματα που συνιστανται είναι χλωροκίνη ή μεφλοκίνη ή ατοβακόνη/προγουανίλη ή δοξουκυκλίνη ή πριμακίνη. Ο χρόνος έναρξης και η διάρκεια της χημειοπροφύλαξης διαφέρει ανάλογα με το συνιστώμενο φάρμακο [22].

### 1.8.1 Εμβόλια

Η ελονοσία είναι μια απειλητική μολυσματική ασθένεια για τη ζωή του ανθρώπου με πολύ μακρά ιστορία. Σε αρχαία κείμενα από το 2700 π.Χ αναφέρονται τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ελονοσίας (σπληνομεγαλία και θανατηφόρος πυρετός ανά περιόδους) στην Κίνα και την Αίγυπτο. Έχουν περάσει περίπου 5000 χρόνια, αλλά αυτό το θανατηφόρο παράσιτο συνυπάρχει με τους ανθρώπους. Ήδη έχει γίνει η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στα φάρμακα κατά της ελονοσίας, κουνουπιών ανθεκτικά σε εντομοκτόνα και του πρόσφατα αναδυόμενου ανθεκτικού *Plasmodium falciparum* (Pf) σε πολλά φάρμακα στην Καμπότζη. Το συγκεκριμένο επικίνδυνο στέλεχος, το οποίο στη συνέχεια εξαπλώθηκε στην Ταϊλάνδη και το Βιετνάμ έχει αποκτήσει αντοχή τόσο στην αρτεμισίνη όσο και στην πιπερακίνη. Επομένως, η ανάπτυξη εμβολίων κατά της ελονοσίας, αποτελεί υψηλή προτεραιότητα σε ενδημικές περιοχές και θα είναι επίσης μεγάλο το όφελος και στους ταξιδιώτες από χώρες χωρίς ελονοσία [57].

Τα εμβόλια ταξινομούνται γενικά σε τρεις κατηγορίες, με διαφορετικές προσεγγίσεις στην πρόληψη. Τα προ-ερυθροκυτταρικά εμβόλια που στοχεύουν στην πρόληψη του σταδίου της μόλυνσης του αίματος. Η επόμενη κατηγορία αφορά τα εμβόλια, που αποσκοπούν στην αντιμετώπιση της παρασιταϊμίας προλαμβάνοντας την κλινική εικόνα της νόσου, στο μολυσμένο άτομο από το στέλεχος. Στην τρίτη κατηγορία, συγκαταλέγονται τα εμβόλια, τα οποία εμποδίζουν τη μετάδοση της νόσου στον πληθυσμό. Ειδικότερα, τα εμβόλια σε αυτήν την κατηγορία, στοχεύουν τα γαμετοκύτταρα, με την παραγωγή αντισωμάτων, του μολυσμένου ατόμου. Συνεπώς, επιτυγχάνεται η μη πραγματοποίηση του σταδίου αναπαραγωγής των γαμετοκυττάρων στο ανωφελές, με αποτέλεσμα τη διακοπή της εξάπλωσης της νόσου σε επόμενα άτομα. Υπάρχει μια αναπτυσσόμενη εκτίμηση ότι τα εμβόλια που συνδυάζουν πολλαπλούς στόχους και στάδια θα απαιτηθούν για την επίτευξη της εξάλειψης και τη διατήρησή της.

Η επίτευξη αποτελεσματικών εμβολίων κατά της ελονοσίας υπήρξε σημαντικός στόχος της ερευνητικής κοινότητας για την ελονοσία, για πολλές δεκαετίες. Το 2006, ο παγκόσμιος χάρτης πορείας για την τεχνολογία εμβολίων κατά της ελονοσίας εδραίωσε την επίτευξη ενός εμβολίου 80% αποτελεσματικό κατά της ελονοσίας *P. falciparum* έως το 2025, το οποίο θα παρέχει προστασία για περισσότερο από τέσσερα χρόνια. Ο νέος χάρτης πορείας της τεχνολογίας που

επικαιροποιήθηκε το 2012 περιγράφει ότι έως το 2030 θα πρέπει να αναπτυχθούν εμβόλια, που παρέχουν τουλάχιστον 75% προστατευτική αποτελεσματικότητα κατά των κλινικών συμπτωμάτων, ώστε να μειώσουν τη μετάδοση του παρασίτου και να αναπτυχθούν σε μαζικές εκστρατείες [33].

Λόγω του πολύπλοκου κύκλου ζωής του παρασίτου *Plasmodium*, οι προσπάθειες ανοσοαπόκρισης του ξενιστή έχουν επικεντρωθεί πιο πρόσφατα στο προ-ερυθροκυτταρικό στάδιο της λοίμωξης για προστασία από το πρώιμο στάδιο της λοίμωξης. Ωστόσο, αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο το δυναμικό των εμβολίων που εμποδίζουν τη μετάδοση και η ανάγκη για εμβόλια ενάντια του *P. vivax* [33]. Πολλές δοκιμές εμβολίων βρίσκονται τώρα στη φάση της κλινικής μελέτης για την ελονοσία του ανθρώπου, όπως ένα εμβόλιο υπομονάδας, το οποίο χρησιμοποιεί μέρος μιας πρωτεΐνης που είναι ένας σημαντικός παράγοντας, για την πρόκληση απόκρισης αντισωμάτων ή επαγωγή ανοσίας που προκαλείται από T κύτταρα.

Το RTS, S, είναι ένα προ-ερυθροκυτταρικό εμβόλιο για την πρόληψη της κλινικής ελονοσίας *P. falciparum* σε παιδιά και καθιστά το πρώτο εμβόλιο που ολοκλήρωσε επιτυχώς μια κλινική δοκιμή Φάσης III [33]. Συγκεκριμένα, το RTS, S/AS01 (Mosquirix, GlaxoSmithKline) που είναι πλησιέστερα προς το εμπόριο, στοχεύει τον σποροζωΐτη (ένα στάδιο του παρασίτου της ελονοσίας που απελευθερώνεται από μολυσμένα κουνούπια) ή τα παράσιτα σταδίου του ήπατος (τα σποροζωΐδια μολύνουν τα ηπατοκύτταρα και αναπτύσσονται θυγατρικά κύτταρα για το επακόλουθο στάδιο της μόλυνσης στο αίμα) [57]. Το εμβόλιο αυτό εγκρίθηκε πρόσφατα από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) ανέμενε αμέσως να κάνει τις πρώτες συστάσεις πολιτικής εμβολίων κατά της ελονοσίας. Ειδικότερα, οι δοκιμές που διεξήχθησαν σε παιδιά της Αφρικής, έδειξαν αποτελεσματικότητα εμβολίου 50% για την κλινική ελονοσία σε παιδιά ηλικίας 5-17 μηνών, αλλά μόνο το 30% στα βρέφη, τον πληθυσμό που βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα επικινδυνότητας [33]. Αυτό το εμβόλιο στη συνέχεια κυκλοφόρησε το 2019 στο Μαλάουι, τη Γκάνα και την Κένυα για 360.000 παιδιά ετησίως σε επιλεγμένες ενδημικές περιοχές. Αυτή η δοκιμή θα δείξει την αποτελεσματικότητα στη χορήγηση μεγάλης κλίμακας [57].

Ενώ το RTS, S αποδεικνύει ότι είναι πιθανό ένα εμβόλιο κατά της ελονοσίας, ένα υποψήφιο εμβόλιο ιδανικών προδιαγραφών, οφείλει να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα [33]. Παρομοίως, εμβόλια ελονοσίας υπομονάδας σε στάδιο



αίματος έχουν επίσης αναπτυχθεί για κλινική χρήση. Το BK-SE36 είναι ένα υποψήφιο εμβόλιο υπομονάδας για *Pf* σταδίου αίματος που χρησιμοποιεί ένα μέρος της πρωτεΐνης sera, το οποίο είναι ένα επιφανειακό αντιγόνο που υπάρχει σε παρασιτοποιημένα ερυθρά αιμοσφαίρια (pRBC). Η προστατευτική αποτελεσματικότητα του BK-SE36 ήταν 72% μετά από ένα (1) έτος χορήγησης για άτομα ηλικίας 6–20 ετών στην Ουγκάντα [57].

Ένας άλλος τύπος εμβολίου είναι το εμβόλιο ολόκληρου του οργανισμού. Ο εμβολιασμός με ολόκληρους ακτινοβολημένους σποροζωίτες είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά εμβόλια κατά της πρόκλησης με ομόλογα στελέχη παρασίτων, αποδίδοντας έως 100% προστασία. Ωστόσο, οι ακτινοβολημένοι σποροζωίτες δεν είναι τόσο αποτελεσματικοί έναντι των ετερόλογων στελεχών των παρασίτων. Το γενετικά εξασθενημένο παράσιτο της ελονοσίας (GAP) είναι ένας άλλος υποψήφιος για ένα ηπατικού σταδίου εμβόλιο. Ο Schajik και οι συνεργάτες του έχουν αναπτύξει το GAP-*Pf*, το οποίο δεν διαθέτει τα γονίδια b9 και slarp στο στάδιο των σποροζωιτών. Αυτό το υποψήφιο εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε σε ελεγχόμενη ανθρώπινη λοίμωξη από ελονοσία δοκιμή Φάσης 1/ 2α. Ενώ επιβεβαιώθηκε το προφίλ ασφάλειας και η επαγωγή μιας *Pf* ειδικής ανοσολογικής απάντησης, η αναμενόμενη ισχυρή αποτελεσματικότητα δεν ήταν εμφανής σε αυτή τη δοκιμή [57].

Τα εμβόλια που στοχεύουν στα παράσιτα σταδίου του ήπατος εμφανίζουν εγγενές πρόβλημα. Εάν το εμβόλιο επιτρέπει ακόμη και έναν ώριμο μεροζωίτη να αναδυθεί από το ήπαρ στο αίμα, η αναπαραγωγή του παρασίτου θα συμβεί ανεξέλεγκτα. Ωστόσο, ορισμένα αντιγόνα είναι κοινά μεταξύ των παρασίτων, στα στάδια του ήπατος και του αίματος. Σε αντίθεση με τα εμβόλια σταδίου του ήπατος, δεν έχουμε GAP σταδίου του αίματος για χρήση στον άνθρωπο. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα οφέλη από τη χρήση εμβολίων ολόκληρου του οργανισμού. Για παράδειγμα, τα εμβόλια ολόκληρου του οργανισμού περιέχουν το πλήρες συμπλήρωμα των πρωτεϊνών των παρασίτων, ενώ τα εμβόλια υπομονάδας συνήθως περιέχουν μόνο μία ή περισσότερες πρωτεΐνες στόχους. Επομένως, εάν το κυρίαρχο παράσιτο της ελονοσίας σε μια ενδημική περιοχή αποκτήσει μετάλλαξη στο γονίδιο που στοχεύει το εμβόλιο υπομονάδας, το εμβόλιο είναι πιθανό να καταστεί αναποτελεσματικό, ενώ ένα εμβόλιο ολόκληρου του οργανισμού θα είναι πιο σταθερό έναντι των μεταλλάξεων ενός γονιδίου [57].

Ένα πολύ αποτελεσματικό εμβόλιο που εμποδίζει τη μετάδοση και έχει τη δυνατότητα να διακόψει τη μετάδοση του παρασίτου *Plasmodium* από μολυσμένους

ανθρώπους σε κουνούπια, που δεν εκδηλώνουν συμπτωματολογία της νόσου, θα ήταν βασικό εργαλείο εξάλειψης της ελονοσίας, ωστόσο ένα τέτοιο εμβόλιο θα απαιτούσε εκτεταμένο πρόγραμμα έρευνας και ανάπτυξης. Αυτό περιλαμβάνει συναίνεση μεταξύ των εμπειρογνομόνων σχετικά με τις κλινικές και εντομολογικές μετρήσεις που απαιτούνται για να εκτιμηθεί εάν έχει συμβεί μια αλλαγή στη μετάδοση, καθώς και τα εργαλεία που απαιτούνται για την αποτελεσματική μέτρηση του τελικού σημείου της μειωμένης μετάδοσης παρασίτων στα κουνούπια. Ένα αυτόνομο εμβόλιο αποκλεισμού μετάδοσης, προσφέρει προστασία σε κοινοτικό επίπεδο, αλλά δεν προσφέρει την εμβολιασμένη ατομική προστασία από τη μόλυνση του *Plasmodium*. Επομένως, το ιδανικό εμβόλιο θα ήταν ένας συνδυασμός εμβολίων που προστατεύει τα άτομα από τη νόσο και/ή τη μόλυνση από το *Plasmodium* και σταματά τη μετάδοση πολλαπλών ειδών (και στελεχών), ιδιαίτερα των πιο διαδεδομένων (*P. falciparum* και *P. vivax*). Τέτοια συνδυαστικά εμβόλια δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί και δεν θα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο την επόμενη πενταετία.

Για την παγκόσμια ανάπτυξη, έχουν λάβει χώρα διάφορα έργα για την εύρεση εμβολίων κατά της ελονοσίας, με αποτέλεσμα όμως μόνο τέσσερα να βρίσκονται σε δοκιμές Φάσης IIb ή III (Πίν. 10). Εκτός από αυτό, όλα στοχεύουν το *P. falciparum*, με εξαίρεση ενός, που είναι υποψήφιο προς το παρόν. Δεδομένου της αύξησης κρουσμάτων από *P. vivax* ή μικτών λοιμώξεων, η πιθανή κατάληξη της αντιμετώπισης της νόσου δεν θα είναι επαρκής. Μαζί με αυτό, η ύπαρξη τριών άλλων ειδών *P. ovale*, *P. malariae* και *P. knowlesi*, το οποίο είναι ζωόφιλο είδος, δυσχεραίνει την κατάσταση [33].

**Πίνακας 10** Πρόσφατες πληροφορίες κλινικών δοκιμών εμβολίων ελονοσίας [33].

| Τύποι εμβολίων              | Φάση Ια                          | Φάση Ιβ    | Φάση Ιια             | Φάση ΙΙβ          | Φάση ΙΙΙ   |
|-----------------------------|----------------------------------|------------|----------------------|-------------------|------------|
|                             | ChAd63/MVA ME-TRAP + Matrix M    | Ad35.CS    | Ad35.CS/RTS,S-AS01   | ChAd63/MA ME-TRAP | RTS,S-AS01 |
| Προερυθροκυτταρικού σταδίου | Polyepitope DNA EP 1300          | PfSPZ      | AD35.CS/Ad26.CS      |                   |            |
|                             | PfCelTOS FMP012                  |            | ChAd63/MCA           |                   |            |
|                             | CSVAC                            |            | M3V.Ad.PfCA          |                   |            |
|                             |                                  |            | M3v.d/Ad.PfCA        |                   |            |
|                             | ChAd63.AMA/MVA.AMA1 + Al/CPG7909 | EBA 175.R2 | ChAd63/MVA MSP 1     | GMZ2              |            |
| Σταδίου αίματος             | SR11.1                           | SE36       | ChAd63.AMA1/MVA.AMA1 | MSP3              |            |
|                             | ChAd63/MVA PnDBP *               |            | FMP2.1-AS01B         |                   |            |
| Απόκλισης                   | Pfs25-EPA                        |            |                      |                   |            |
| μετάδοσης                   | Pfs25-VLP                        |            |                      |                   |            |

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Σκοπός εργασίας:

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η συμβολή της στοχευμένης μοριακής μεθόδου γονοτύπησης σε κρούσματα ελονοσίας από *P. vivax* και η μεταξύ τους συσχέτιση, με σκοπό την εξαγωγή πιθανών συμπερασμάτων σε επιδημιολογικό επίπεδο.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Προέλευση δειγμάτων

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνολικά 22, τα οποία είχαν αποσταλεί στο Κέντρο Αναφοράς Ελονοσίας του τομέα Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων της πρώην Σχολής Δημόσιας Υγείας (νυν Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής). Τα συγκεκριμένα δείγματα τέθηκαν σε έλεγχο για διάγνωση ελονοσίας (με μικροσκόπηση, RDTs, PCR ) και ταυτοποιήθηκαν ως θετικά με P. νίναχ. Από τα δείγματα αυτά, απομονώθηκε γενετικό υλικό DNA, το οποίο φωτομετρήθηκε για έλεγχο τυχόν προσμίξεων πρωτεϊνών και βεβαίωσης της καθαρότητας του DNA που λήφθηκε (Εικ 32). Το γενωμικό υλικό ακολούθως φυλάχθηκε σε βαθιά κατάψυξη στους  $-40^{\circ}\text{C}$ , αποτελώντας μέρος του αρχείου του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας για μελλοντική χρήση (Εικ. 33). Η κατανομή των χρησιμοποιηθέντων δειγμάτων περιελάμβανε 14 περιπτώσεις για το έτος 2016 και οκτώ περιπτώσεις για το έτος 2015, αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα αναφέρθηκαν ως εισαγόμενα εκτός από ένα, το οποίο θεωρήθηκε εγχώριο. Το χρονικό διάστημα που διήρκησαν τα πειράματα που μου ανατέθηκαν, τα οποία αφορούν τα δείγματα αυτά, ήταν από τον Μάρτιο του έτους 2017 έως τον Σεπτέμβριο του ίδιου έτους.



**Εικόνα 32** Φωτόμετρο (Eppendorf).



**Εικόνα 33** Καταψύκτης βιολογικών υλικών (βαθιά κατάψυξη στους  $-40^{\circ}\text{C}$ ) (MRC Laboratory Equipment).

### **Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ενίσχυσης του γονιδίου P<sub>v</sub>-Msp3a**

Για την επίτευξη της γονοτυπικής ανάλυσης των θετικών με *P. vivax* δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο η στοχευμένη μοριακή μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ενίσχυσης του γονιδίου P<sub>v</sub>-Msp3a. Εφαρμόστηκε στοχευμένο μοριακό πρωτόκολλο, το οποίο βασίζεται στη μέθοδο της εμφωλεασμένης PCR (Nested PCR), μέσω της οποίας ενισχύεται μία καθορισμένη περιοχή του Msp3a γονιδίου του *P. vivax*.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία αποτελείται από δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας του τελικού προϊόντος αντίδρασης. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την εκτέλεση της εξωτερικής PCR (outer) με τη χρήση των καθορισμένων εναρκτών P1-P2 (P1: 5'-CAGCAGACACCATTTAAGG-3', P2: 5'-CCGTTTGTGATTAGTTGC-3') [53]. Στο δεύτερο στάδιο εφαρμόζεται η εσωτερική PCR (inner) με τη χρήση ενός ζεύγους εκκινητών N1-N2 ( N1: 5'-

GACCAGTGTGATACCATTAACC-3', N2: 5'-ATACTGGTTCTTCGTCTTCAGG-3') [53]. Η αυξανόμενη ευαισθησία της μεθόδου επιτυγχάνεται με την επιλογή προς χρήση του προϊόντος που προκύπτει από την πρώτη αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR), ως αρχικό προϊόν στην δεύτερη αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, το προϊόν της πρώτης αντίδρασης λειτουργεί ως μήτρα γενετικού υλικού (DNA) στην δεύτερη αντίδραση, οδηγώντας στην υβριδοποίηση των εκκινητών N1-N2 σε αλληλουχίες που περιέχονται σε αυτό.

### **Αντιδραστήρια**

Οι ποσότητες όλων των αντιδραστηρίων υπολογίζονται ανάλογα με το πόσα δείγματα είναι προς εξέταση και με την ποσότητα όγκου που απαιτεί η αντίδραση. Τα δείγματα στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ήταν 22 θετικά *P. νίναχ* και ο απαιτούμενος όγκος αντίδρασης ήταν 20 μλ. Ο όγκος αντίδρασης αποτελείται από δύο μλ γενωμικού υλικού δείγματος και 18 μλ μείγματος αντιδραστηρίων (master mix).

Απαραίτητος είναι ο συνυπολογισμός του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα στο συνολικό αριθμό δειγμάτων. Εκτός από το συγκεκριμένο, η παρασκευή περίσσειας ποσότητας μείγματος αντιδραστηρίων (*n* δείγματα + 1, όπου *n*= αριθμός δειγμάτων, με θετικό και αρνητικό μάρτυρα) διασφαλίζει τυχόν αστοχίες που οφείλονται στο χρησιμοποιούμενο εξοπλισμό ή τον χρήστη που πραγματοποιεί τα εν λόγω πειράματα.

### **Σύσταση αντιδραστηρίων εξωτερικής PCR (outer-πρώτο στάδιο αντίδρασης)**

Η σύσταση των αντιδραστηρίων για την παρασκευή του αρχικού προϊόντος αντίδρασης για κάθε δείγμα ήταν 2 μλ ρυθμιστικού διαλύματος PCR (Buffer) 1X (το οποίο περιείχε MgCl<sub>2</sub>), 0,2 μλ από τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), 0,12 μλ από τον κάθε εκκινητή, 0,2 μλ ενζύμου Taq-DNA πολυμεράση και 15,36 μλ απιονισμένο νερό (H<sub>2</sub>O). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την εταιρεία Promega. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε διαμοίραση του αντιδρώντος μείγματος σε ισόποσες ποσότητες των 18 μλ ανά δείγμα και προσθήκη 2 μλ γενετικού υλικού (Πίν. 11).



**Πίνακας 11** Σύσταση αντιδραστηρίων στην εξωτερική PCR.

| Εξωτερική PCR (OUTER)           |                  |                    |
|---------------------------------|------------------|--------------------|
| Αντιδραστήρια                   | Όγκος ανά δείγμα | Τελική συγκέντρωση |
| PCR Buffer                      | 2 µl             | 1 (X)              |
| MgCl <sub>2</sub>               | 0                | 0                  |
| dNTPs                           | 0,2 µl           | 0,1 (mM)           |
| Primers:                        |                  |                    |
| P1                              | 0,12 µl          | 0,6 (mM)           |
| P2                              | 0,12 µl          | 0,6 (mM)           |
|                                 |                  |                    |
| Taq (units)                     | 0,2 µl           | 1 (units)          |
| H <sub>2</sub> O                | 15,36 µl         | -                  |
| DNA                             | 2 µl             | -                  |
| <b>Τελικός όγκος αντίδρασης</b> | <b>20 µl</b>     | -                  |

Σύσταση αντιδραστηρίων εσωτερικής PCR (inner-δεύτερο στάδιο αντίδρασης)

Η σύσταση των αντιδραστηρίων για την παρασκευή του προϊόντος για την εσωτερική αντίδραση PCR ήταν ακριβώς ίδια με της εξωτερικής αντίδρασης. Προστέθηκαν 2 µl ρυθμιστικού διαλύματος PCR (Buffer) 1X, το οποίο περιείχε MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl από τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), 0,12 µl από τον κάθε εκκίνητη N1-N2, 0,2 µl Taq-DNA πολυμεράσης και 15,36 µl απιονισμένο νερό (H<sub>2</sub>O), για κάθε δείγμα. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την εταιρεία Promega. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε διαμοίραση του αντιδρώντος μείγματος σε ισόποσες ποσότητες των 18 µl ανά δείγμα και προσθήκη 2 µl γενετικού υλικού (Πίν. 12).

**Πίνακας 12** Σύσταση αντιδραστηρίων στην εσωτερική PCR.

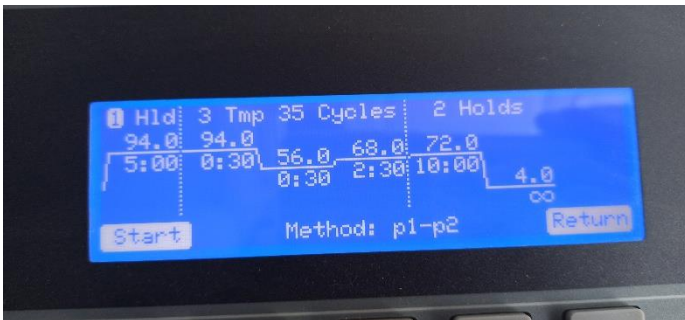
| Εσωτερική PCR (INNER)         |                                       |                    |
|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| Αντιδραστήρια                 | Όγκος ανά δείγμα                      | Τελική συγκέντρωση |
| PCR Buffer                    | 2 $\mu$ l                             | 1 (X)              |
| MgCl <sub>2</sub>             | 0                                     | 0                  |
| dNTPs                         | 0,2 $\mu$ l                           | 0,1 mM             |
| Primers:                      |                                       |                    |
| N1                            | 0,12 $\mu$ l                          | 0,6 mM             |
| N2                            | 0,12 $\mu$ l                          | 0,6 mM             |
|                               |                                       |                    |
| Taq (units)                   | 0,2 $\mu$ l                           | 1 mM               |
| H <sub>2</sub> O              | 15,36 $\mu$ l                         | -                  |
| DNA                           | 2 $\mu$ l                             | -                  |
| <b>Τελικός<br/>αντίδρασης</b> | <b>όγκος<br/>20 <math>\mu</math>l</b> |                    |

### Συνθήκες ενισχυμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

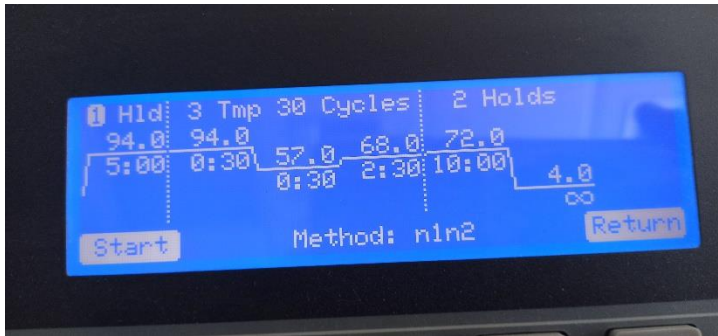
Το επόμενο στάδιο της προτεινόμενης μεθοδολογίας περιελάμβανε την τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή PCR (Applied Biosystems) και επιλέχθηκε συγκεκριμένο πρόγραμμα κύκλων αντίδρασης (Εικ. 34). Οι συνθήκες των δύο προγραμμάτων της Nested PCR ήταν, για την εσωτερική PCR (με εκκινητές P1-P2) 94°C για 5 λεπτά, στη συνέχεια 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 56°C για 30 δευτερόλεπτα, 68°C για 2,5 λεπτά (για 35 κύκλους αντίδρασης), 72°C για 10 λεπτά (Εικ. 35) και για την εξωτερική PCR (με εκκινητές N1-N2) ήταν, 94°C για 5 λεπτά, 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 57°C για 30 δευτερόλεπτα, 68°C για 2,5 λεπτά (για 30 κύκλους αντίδρασης), 72°C για 10 λεπτά (Εικ. 36).



Εικόνα 34 Θερμικός κυκλοποιητής PCR (Applied Biosystems).



Εικόνα 35 Συνθήκες εξωτερικής PCR.



Εικόνα 36 Συνθήκες εσωτερικής PCR.

### Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης

Μετά το πέρας των αντιδράσεων της PCR στο θερμικό κυκλοποιητή, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για την ανάλυσή τους, σε ειδικό εργαστηριακό χώρο για ηλεκτροφορήσεις (Εικ. 37). Αρχικά, τοποθετήθηκε το πήκτωμα αγαρόζης 1% σε μια οριζόντια συσκευή για ηλεκτροφόρηση (Consort) και καλύφθηκε με διάλυμα TAE (Lonza).

Για την τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος αναμείχθηκαν πρώτα με τη βοήθεια μικροπιπέττας τα εξαχθέντα προϊόντα της PCR (4 μl/δείγμα) με σταγόνες από το διάλυμα φόρτωσης (διάλυμα μπλε της βρωμοφαινόλης με σακχαρόζη) (περίπου 1-2 μl). Το δεδομένο διάλυμα φόρτωσης (bromophenol blue) κάνει τα δείγματα ορατά λόγω χρώματος και τα βοηθά να κατακαθίσουν στον πυθμένα του κάθε φρεατίου.

Ύστερα από αυτό το σημείο τοποθετήθηκαν τα δείγματα, καθώς και ο αρνητικός και ο θετικός μάρτυρας. Ένα πηγαδάκι στο μέσο του πηκτώματος οφείλει να παραμείνει κενό, λόγω της αναγκαίας τοποθέτησης του δείκτη μοριακών μεγεθών 100 ζευγών βάσεων (NIPPON Genetics). Ο δείκτης μοριακών μεγεθών εξυπηρετεί ως μέτρο σύγκρισης των εξαχθέντων ζωνών των υπό διερεύνηση δειγμάτων.

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τέθηκε σε ηλεκτρικό πεδίο, προσέχοντας τη σύνδεση ηλεκτροδίων στους πόλους της συσκευής να είναι η σωστή, στα 90-100 Volt για περίπου 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, τα προϊόντα της PCR έχουν ανοίξει και είναι ευδιάκριτα ως ζώνες. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε ακολούθως σε τράπεζα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), προκειμένου οι εκάστοτε

ζώνες να γίνουν ορατές σε σκοτεινό θάλαμο. Φορώντας ειδικά προστατευτικά γυαλιά φωτογραφίσαμε το αποτέλεσμα αυτό με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.



**Εικόνα 37** Ειδικός χώρος εργαστηρίου για ηλεκτροφορήσεις.

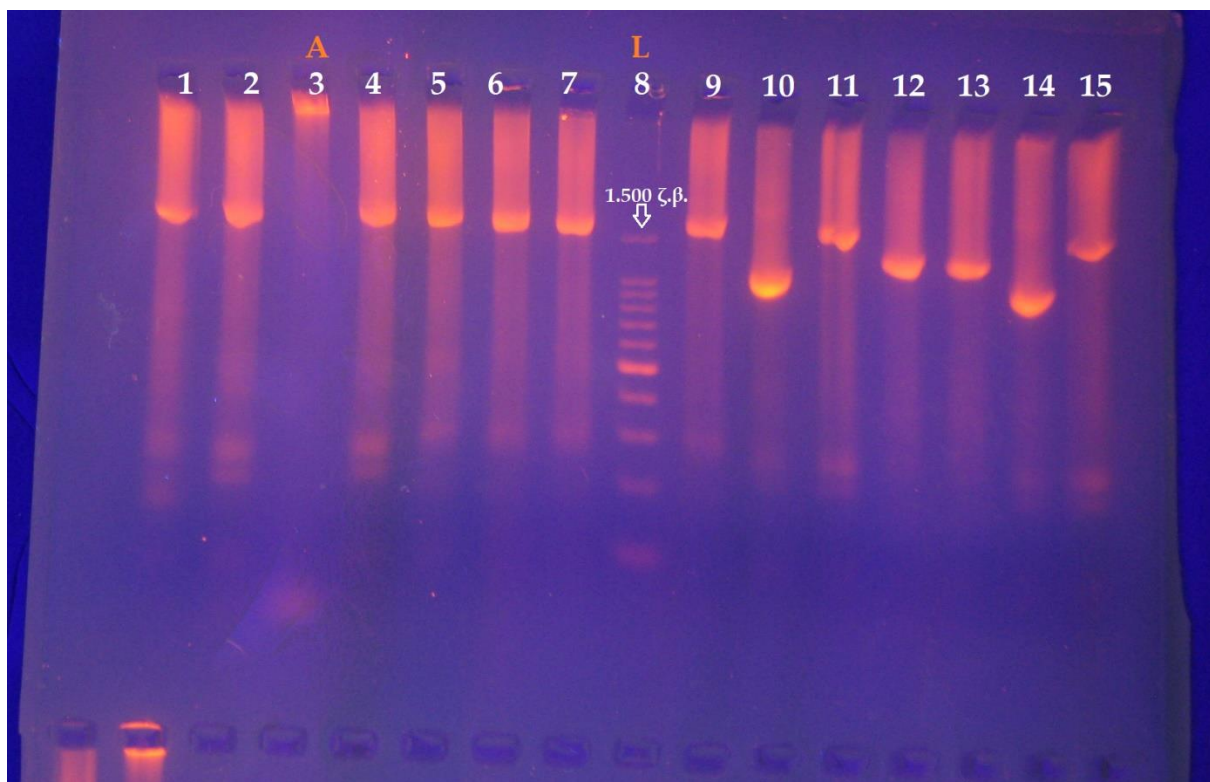
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση της ποικιλομορφίας του *P. νίναχ* ανέδειξε τρεις διακριτούς γονοτύπους A, B και C γονότυπους στο πλαίσιο ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της εσωτερικής PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ταξινόμηση των δειγμάτων σε διαφορετικούς γονότυπους του *P. νίναχ* έγινε σύμφωνα με την παρουσία των συγκεκριμένων ζωνών που προέκυψαν από το κάθε δείγμα. Αναλυτικότερα, η γονοτυπική κατηγοριοποίηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το μέγεθος σε ζεύγη βάσεων της κάθε ζώνης, με την κατηγορία γονότυπου A *P. νίναχ* να αφορά την ύπαρξη ζώνης με μέγεθος μεγαλύτερο από 1.500 ζ.β. (bp), την κατηγορία γονότυπου B με μέγεθος μικρότερο από 1.500 ζ.β. (bp) και την γονότυπου C κατηγορία με μέγεθος περίπου 1.150 ζ.β. (bp) [55]. Ως εκ τούτου, εάν μία ζώνη έχει μέγεθος 1.700 ζ.β. τότε χαρακτηρίζεται ως A γονότυπος πλασμωδίου *νίναχ*. Ακολούθως εάν, μία ζώνη έχει μέγεθος 1.300 ζ.β. χαρακτηρίζεται ως B γονότυπος *P. νίναχ*. Εντούτοις, υπάρχουν και περιπτώσεις κατά τις οποίες δεν είναι εύκολος ο διαχωρισμός, ιδιαίτέρως των γονοτύπων A και B, τα οποία και έχουν ως κοινό όριο μεγέθους τα 1.500 ζ.β. Οι ζώνες που προκύπτουν διαχωρίζονται λαμβάνοντας υπ' όψη το εύρος ζωνών του δείκτη μοριακών μεγεθών 100 ζ.β., χωρίς να υπόκεινται σε ξεκάθαρο αριθμό μεγέθους αντίστοιχων ζευγών βάσεων (π.χ. 1.450 ζ.β.), διότι οπτικά καθίσταται δύσκολη η συγκεκριμένη μέτρηση ζευγών βάσεων. Υπάρχει σαφής κίνδυνος στην ερμηνεία ζωνών με μέγεθος που προσεγγίζει τα 1.400 ζ.β., οπότε και η συγκεκριμένη ανάλυση που ακολουθείται περιλαμβάνει την αξιοποίηση περισσότερο εξειδικευμένων μεθοδολογικών πρωτοκόλλων. Η προτεινόμενη γονοτυπική ανάλυση η οποία μπορεί να περατωθεί είναι με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων Hha I και Alu I και ακόμα περισσότερο με τους μικροδορυφορικούς δείκτες (MS-microsatellite markers) [53, 55].

Τα αποτελέσματα των ζωνών γονοτύπησης του Msp3a των δειγμάτων, απεικονίζονται στο πάνω μέρος της εικόνας 38. Πιο συγκεκριμένα, στο μέσο μέρος, φαίνεται ο μοριακός δείκτης 100 ζ.β. (DNA base ladder 100 b.p.), η ύπαρξη του οποίου είναι απαραίτητη για την αντιστοιχία των ζωνών των δειγμάτων σε διακριτά μεγέθη ζευγών βάσεων. Στην διαδρομή οχτώ (8) του μοριακού δείκτη, η κάτω ζώνη αντιστοιχεί στο μέγεθος 100 ζ.β., η επόμενη στο μέγεθος 200 ζ.β. και κάθε ζώνη

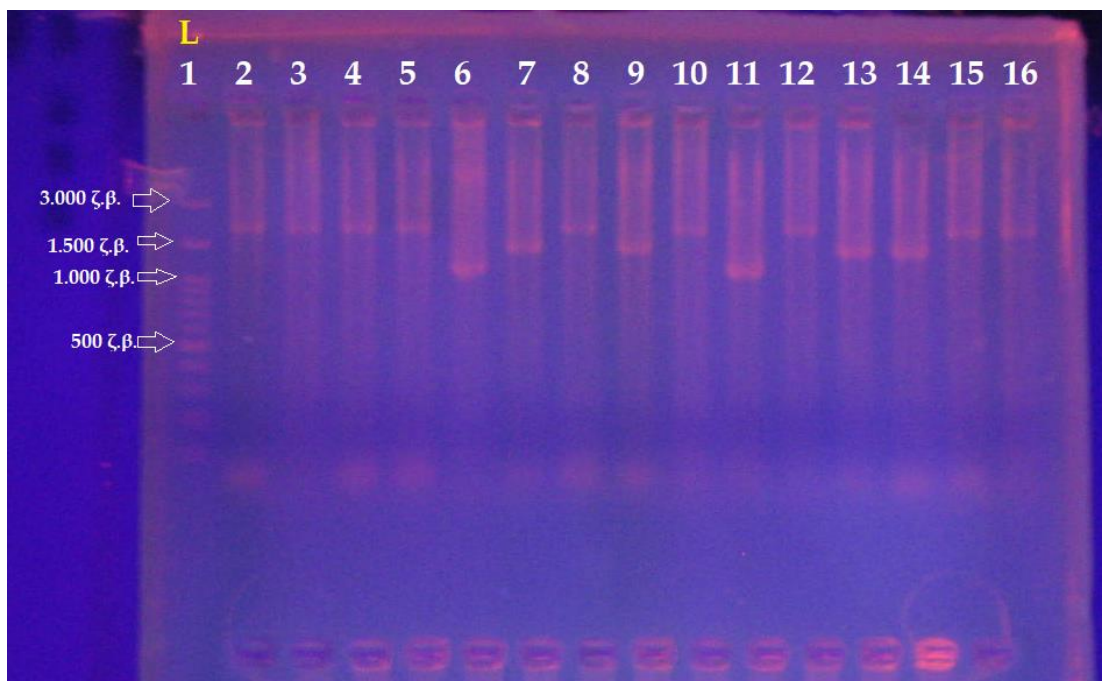
αντιστοιχεί στην αύξηση μεγέθους κατά 100 ζ.β., αντίστοιχα όπως φαίνεται στη διαδρομή αυτή, με την πιο φωτεινή ζώνη να δηλώνει το μέγεθος 500 ζ.β. και την τελευταία ζώνη το μέγεθος 1.500 ζ.β. (κανονικά η τελευταία ζώνη του μοριακού δείκτη αφορά το μέγεθος των 3.000 ζ.β. αλλά δεν είναι εμφανή σε αυτήν την εικόνα, παρατηρείται όμως στην επόμενη). Με τη βοήθεια του μοριακού δείκτη, απεικονίζεται ο γονότυπος A στις διαδρομές ένα (1), δύο (2), τέσσερα (4), πέντε (5), δηλαδή η ύπαρξη ζώνης μεγαλύτερου μεγέθους από 1.500 ζ.β. καθώς επίσης και στις διαδρομές έξι (6) και επτά (7) με ζώνες οριακά μικρότερου μεγέθους. Στη διαδρομή τρία (3), απεικονίζεται ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, ο οποίος ορθά δεν έχει δώσει κάποια ζώνη, γεγονός που επιβεβαιώνει την απουσία επιμολύνσεων στην εν λόγω αντίδραση. Οι διαδρομές μετά το μοριακό δείκτη μεγεθών, πιο συγκεκριμένα οι εννέα (9), έντεκα (11) και δεκαπέντε (15) αντιστοιχούν στο γονότυπο A (>1.500 ζ.β.). Στις διαδρομές δέκα (10) και δεκατέσσερα (14) φαίνεται η ύπαρξη ζώνης μεγέθους περίπου 1.150 ζ.β. με αντιστοιχία του γονότυπου C. Από την άλλη πλευρά, στις διαδρομές δώδεκα (12) και δεκατρία (13) φαίνεται η ύπαρξη ζώνης μεγέθους μικρότερου από 1.500 ζ.β. και μεγαλύτερου από 1.150 ζ.β. με κατάληξη αντιστοιχίας στο γονότυπο B.



**Εικόνα 38** Αντιπροσωπευτικά προϊόντα εσωτερικής PCR σε πήκτωμα αγαρόζης υπό υπεριώδη ακτινοβολία. (Γονότυπος A (διαδρομές 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 15), γονότυπος B (διαδρομές 12, 13), γονότυπος C (διαδρομές 10, 14), αρνητικός μάρτυρας (A: διαδρομή 3), δείκτης μοριακών μεγεθών 100 ζ.β. (L: διαδρομή 8)).

Άλλο ένα παράδειγμα εξαγόμενων αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στην εικόνα 39. Σε αυτήν την περίπτωση, του μοριακού δείκτη 100 ζ.β. (DNA base ladder 100 b.p.), στη διαδρομή ένα (1), η τελευταία ζώνη αφορά το μέγεθος των 3.000 ζ.β και η επόμενη το μέγεθος των 1.500 ζ.β. Οι κατηγορίες των γονότυπων διαχωρίζονται με τον ίδιο τρόπο. Στο πάνω μέρος του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης, η παρουσία του γονότυπου A αντιστοιχεί στις ακόλουθες διαδρομές: δύο (2), τρία (3), τέσσερα (4), πέντε (5), οχτώ (8), δέκα (10), δώδεκα (12), δεκαπέντε (15) και δεκάξι (16), με ύπαρξη ζώνης μεγαλύτερου μεγέθους από 1.500 ζ.β. Ενώ, η παρουσία του γονότυπου B είναι αισθητή στις διαδρομές επτά (7), εννέα (9), δεκατρία (13) και δεκατέσσερα (14), με εμφανή ζώνη ενδιάμεσου μεγέθους 1.500 ζ.β. και 1.150 ζ.β. Οι απομείναντες διαδρομές έξι (6) και έντεκα (11), με εξαχθέντες ζώνες μεγέθους περίπου 1.150 ζ.β. αντιστοιχούν στην τελευταία κατηγορία του γονότυπου C.





**Εικόνα 39** Αντιπροσωπευτικά προϊόντα εσωτερικής PCR σε πήκτωμα αγαρόζης υπό υπεριώδη ακτινοβολία. (Γονότυπος A (διαδρομές 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 16), γονότυπος B (διαδρομές 7, 9, 13, 14), γονότυπος C (διαδρομές 6, 11), δείκτης μοριακών μεγεθών 100 ζ.β. (L: διαδρομή 1)).

Η ταξινόμηση των *Msp3a* γονότυπων που προέκυψαν από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται στον πίνακα 13 που ακολουθεί. Όλα τα δείγματα λήφθηκαν από άτομα που ζούσαν στο νομό της Λακωνίας, στην Πελοπόννησο και προσεβλήθησαν από ελονοσία, πιο συγκεκριμένα από κουνούπια μολυσμένα με *P. νίναχ*. Υπήρξαν 14 περιπτώσεις επιβεβαιωμένων κρουσμάτων για το έτος 2015 και αντίστοιχα οχτώ (8) για το έτος 2016. Όλα τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν ως εισαγόμενα κρούσματα από *P. νίναχ*, εκτός από ένα εγχώριο κρούσμα του 2015. Το συγκεκριμένο μεμονωμένο δείγμα, προήλθε από μόνιμο κάτοικο της περιοχής, χωρίς αναφορά πρόσφατου ταξιδιού στο ιστορικό του. Συνολικά, από τα 22 δείγματα, τα 11 περιελάμβαναν τον γονότυπο A, τα επτά τον γονότυπο B και τα υπόλοιπα τέσσερα τον γονότυπο C, αντίστοιχα. Ο πιο συχνός γονότυπος που αντιστόιχησε στα έτη 2015 και 2016 ήταν ο γονότυπος A. Σε επίπεδο ποσοστιαίας κατανομής, τα στελέχη του γονότυπου A κατέλαβαν το 50%, του γονότυπου B το 31,8% και του γονότυπου C το 18,1%, αντίστοιχα (Πίν. 14).

**Πίνακας 13** Ταξινόμηση των Pν-Msp3a γονότυπων των δείγματα της εργασίας.

| A/A | Έτος | Δείγμα-Κωδικός<br>Εργ. | msp3a | Σύνολα:         |
|-----|------|------------------------|-------|-----------------|
| 1   | 2016 | 4921                   | B     |                 |
| 2   | 2016 | 4923                   | A     | A=11            |
| 3   | 2016 | 4380                   | A     |                 |
| 4   | 2016 | 4528                   | A     |                 |
| 5   | 2016 | 4555                   | A     |                 |
| 6   | 2016 | 4585                   | B     | B=7             |
| 7   | 2016 | 4608                   | C     |                 |
| 8   | 2016 | 4693                   | A     |                 |
| 9   | 2016 | 4739                   | A     |                 |
| 10  | 2016 | 4740                   | A     | C=4             |
| 11  | 2016 | 4764                   | C     |                 |
| 12  | 2016 | 4855                   | B     |                 |
| 13  | 2016 | 4935                   | C     |                 |
| 14  | 2016 | 5151                   | B     |                 |
| 15  | 2015 | 2511                   | A     |                 |
| 16  | 2015 | 2566                   | A     |                 |
| 17  | 2015 | 2653                   | A     |                 |
| 18  | 2015 | 2692                   | B     |                 |
| 19  | 2015 | 2693                   | B     |                 |
| 20  | 2015 | 2890                   | C     | Τοπική μετάδοση |
| 21  | 2015 | 2942                   | B     |                 |
| 22  | 2015 | 3222                   | A     |                 |
|     |      |                        |       |                 |
|     |      | ΛΑΚΩΝΙΑ                |       |                 |

**Πίνακας 14** Ποσοστιαία κατανομή (%) των Pν-Msp3a γονότυπων των δειγμάτων της εργασίας.

| Έτη: 2015-2016<br>(v=22)           | Γονότυποι Pν-Msp3a |        |        |
|------------------------------------|--------------------|--------|--------|
|                                    | A                  | B      | C      |
| Σύνολο Δειγμάτων                   | 11                 | 7      | 4      |
| <b>Ποσοστιαία<br/>κατανομή (%)</b> | 50%                | 31,80% | 18,10% |

Αναφορικά με το έτος 2016, επτά (7) κρούσματα είχαν γονότυπο A, τέσσερα (4) κρούσματα είχαν γονότυπο B και τρία (3) κρούσματα γονότυπο C, αντίστοιχα

(Πίν. 15). Ο περισσότερο επικρατής γονότυπος Pν-Msp3a του έτους 2016 ήταν ο γονότυπος A. Η ποσοστιαία κατανομή των στελεχών του έτους 2016 του γονότυπου A ήταν 50%, του γονότυπου B ήταν 28,6% και του γονότυπου C ήταν 21,4%, αντίστοιχα (Πίν. 16).

**Πίνακας 15** Ταξινόμηση των Pν-Msp3a γονότυπων των στελεχών *P. νίνα* των δειγμάτων του έτους 2016.

| Α/Α           | Έτος | Δείγματα  | Γονότυποι Pν-Msp3a |          |          |
|---------------|------|-----------|--------------------|----------|----------|
|               |      |           | A                  | B        | C        |
| 1             | 2016 | 4921      |                    | B        |          |
| 2             | 2016 | 4923      | A                  |          |          |
| 3             | 2016 | 4380      | A                  |          |          |
| 4             | 2016 | 4528      | A                  |          |          |
| 5             | 2016 | 4555      | A                  |          |          |
| 6             | 2016 | 4585      |                    | B        |          |
| 7             | 2016 | 4608      |                    |          | C        |
| 8             | 2016 | 4693      | A                  |          |          |
| 9             | 2016 | 4739      | A                  |          |          |
| 10            | 2016 | 4740      | A                  |          |          |
| 11            | 2016 | 4764      |                    |          | C        |
| 12            | 2016 | 4855      |                    | B        |          |
| 13            | 2016 | 4935      |                    |          | C        |
| 14            | 2016 | 5151      |                    | B        |          |
| <b>Σύνολο</b> |      | <b>14</b> | <b>7</b>           | <b>4</b> | <b>3</b> |

**Πίνακας 16** Ποσοστιαία κατανομή (%) των Pν-Msp3a γονότυπων των δειγμάτων του έτους 2016.

| Έτος: 2016<br>(v=14) | Γονότυποι Pν-Msp3a |       |       |
|----------------------|--------------------|-------|-------|
|                      | A                  | B     | C     |
| Σύνολο Δειγμάτων     | 7                  | 4     | 3     |
| <b>Ποσοστό %</b>     | 50%                | 28,6% | 21,4% |

Αναφορικά με το έτος 2015, τέσσερα (4) κρούσματα είχαν γονότυπο A, τρία (3) κρούσματα είχαν γονότυπο B και ένα (1) κρούσμα γονότυπο C, αντίστοιχα (Πίν. 17). Ο περισσότερο επικρατής γονότυπος Pν-Msp3a του έτους 2015 ήταν ο

γονότυπος A, κατά αναλογία με το έτος 2016. Η ποσοστιαία κατανομή των στελεχών του έτους 2015 ήταν 50% του γονότυπου A, 37,5% του γονότυπου B και 12,5% του γονότυπου C, αντίστοιχα (Πίν. 18).

Εν κατακλείδι, ο περισσότερο επικρατής γονότυπος την περίοδο 2015-2016 ήταν ο A, με ποσοστιαία εκδήλωση συχνότητας της τάξεως του 50%. Από την άλλη πλευρά, ο γονότυπος C καταγράφεται στα λιγότερα κρούσματα με ποσοστιαία εκδήλωση συχνότητας της τάξεως του 21,4% για το έτος 2016 και 12,5% για το έτος 2015, αντίστοιχα (Πίν. 16 και Πίν. 18).

**Πίνακας 17** Ταξινόμηση των Pν-Msp3a γονότυπων των στελεχών P. νίναχ των δειγμάτων του έτους 2015.

| Α/Α           | Έτος | Δείγματα | Γονότυποι Pν-Msp3a |          |          |
|---------------|------|----------|--------------------|----------|----------|
|               |      |          | A                  | B        | C        |
| 1             | 2015 | 2511     | A                  |          |          |
| 2             | 2015 | 2566     | A                  |          |          |
| 3             | 2015 | 2653     | A                  |          |          |
| 4             | 2015 | 2692     |                    | B        |          |
| 5             | 2015 | 2693     |                    | B        |          |
| 6             | 2015 | 2890     |                    |          | C        |
| 7             | 2015 | 2942     |                    | B        |          |
| 8             | 2015 | 3222     | A                  |          |          |
| <b>Σύνολο</b> |      | 8        | <b>4</b>           | <b>3</b> | <b>1</b> |

**Πίνακας 18** Ποσοστιαία κατανομή (%) των Pν-Msp3a γονότυπων των δειγμάτων του έτους 2015.

| Έτος: 2015<br>(ν=8) | Γονότυποι Pν-Msp3a |       |       |
|---------------------|--------------------|-------|-------|
|                     | A                  | B     | C     |
| Σύνολο Δειγμάτων    | 4                  | 3     | 1     |
| <b>Ποσοστο %</b>    | 50%                | 37,5% | 12,5% |

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γονοτυπική ανάλυση της πληθυσμιακής δομής των πλασμωδίων που προκαλούν την ελονοσία, συμβάλλει σε διάφορες πτυχές αντιμετώπισής της. Χάρη σε αυτήν μπορεί να κατανοηθεί η επιρροή μετάδοσης της νόσου, ο σχεδιασμός και η αξιολόγηση εμβολίων έναντι της νόσου και η αποτελεσματικότητα των ανθελονοσιακών φαρμάκων.

Η στοχευμένη μοριακή μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ενίσχυσης του γονιδίου *Pv-Msp3a* που εφαρμόστηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, ανίχνευσε με επιτυχία το γονίδιο *msp3a*. Τα θετικά δείγματα με *P. vivax* που χρησιμοποιήθηκαν, λήφθηκαν από άτομα που ζούσαν στο νομό της Λακωνίας τα έτη 2015 και 2016. Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης εργασίας, χρησιμοποιήθηκε ένα στοχευμένο μοριακό πρωτόκολλο [53], το οποίο βασίζεται στη μέθοδο της εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Nested PCR), μέσω της οποίας ενισχύεται μία καθορισμένη περιοχή του *Msp3a* γονιδίου του *P. vivax*. Οι γονότυποι του πλασμωδίου *vivax* καθορίστηκαν σε A, B και C σαν ένα πρώτο μέτρο διαφοροποίησης των γονοτύπων, με συχνότητα κατανομής 50% του A στο σύνολο των 22 δειγμάτων.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία η γονοτυπική ανάλυση των γενωμικών υλικών των είκοσι δύο αυτών δειγμάτων δεν επεκτείνεται στα περαιτέρω βήματα γονοτυπικής ανάλυσης. Η ακολουθούμενη γονοτυπική ανάλυση έχει άλλα στάδια για πιο ξεκάθαρο διαχωρισμό υποομάδων, η οποία εκπληρώνεται με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *Hha I* και *Alu I* και ακόμα περισσότερο με τους μικροδορυφορικούς δείκτες (MS-microsatellite markers) [53, 55].

Ανάλογες προσπάθειες έχουν γίνει και από λοιπές ερευνητικές ομάδες, τα ευρήματα των οποίων έχουν καταγραφεί στο χώρο της διεθνούς βιβλιογραφίας. Η εύρεση του γονότυπου A, σε μεγαλύτερα ποσοστά από τους άλλους δύο γονότυπους, στο σύνολο των γενωμικών υλικών πιθανότατα υποδηλώνει για τους B και C κάποια εμφάνιση μειονεκτημάτων στην φυσική κατάσταση των παρασίτων που τα περιέχουν. Υπό αυτή την έννοια, έχει προταθεί πως ο γονότυπος A, ο οποίος και καταγράφεται με την περισσότερο αυξημένη συχνότητα σε φυσικούς πληθυσμούς δειγμάτων, πιθανότατα δικαιολογεί περιπτώσεις απαλοιφών που επισυμβαίνουν σε μικρές ομάδες στελεχών *P. vivax*, η δράση των οποίων

μεταφράζεται σε απώλεια λειτουργικότητας του εμπλεκόμενου παρασιτικού οργανισμού. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα μιας έρευνας γονοτυπικής ανάλυσης με ενίσχυση του γονιδίου Pn-Msp3a, σε απομονωμένα *P. vivax* στελέχη στο Δελχί της Ινδίας, έδειξαν πως ο γονότυπος A είχε μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης με 72,2% σε αντίθεση με τους γονότυπους B και C με (19,44% και 9,72%, αντίστοιχα) [58-60]. Παρόμοια κατανομή συχνότητας αναφέρθηκε και σε λοιπές γονοτυπικές αναλύσεις του γονιδίου Pnmsp3-a στην Ταϊλάνδη, αλλά και στην Παπούα Νέα Γουινέα [53, 58, 61]. Το *P. vivax* χαρακτηρίζεται από παρουσία εκτεταμένης γενετικής ποικιλομορφίας. Μέσα από την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου που στοχεύει στο γονίδιο της πρωτεΐνης-3α του μεροζώιτη, δημιουργούνται οι προϋποθέσεις για την ανάπτυξη ενός πιθανού εμβολίου έναντι του συγκεκριμένου είδους πλασμοδίου της ελονοσίας [53, 62].

Σύμφωνα με την τελευταία καταγραφή του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας, το έτος 2020 αναφέρθηκαν πέντε περιπτώσεις κρουσμάτων από *P. vivax* (το ένα αποτελεί περίπτωση μεικτής λοίμωξης με το πλασμώδιο *P. falciparum*) [3]. Το γεγονός ότι καταγράφονται ακόμα κρούσματα *P. vivax* στον Ελλαδικό χώρο, σε ετήσια πλέον βάση, υποδηλώνει πως το συγκεκριμένο είδος πλασμοδίου έχει εγκατασταθεί στη χώρα μας. Η γονοτυπική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για την έξαρση κρουσμάτων του 2011, διευκρίνισε κάποιες πιθανότητες για τη μεταδοτικότητα της νόσου. Στην πλειοψηφία των δειγμάτων (34), προερχόμενα από την Πελοπόννησο και πιο συγκεκριμένα το δήμο Ευρώτα, αναδείχθηκαν δύο κοινοί απλότυποι. Λόγω αυτών, πιθανότατα, προκλήθηκε η συνεχής μετάδοση της νόσου [55]. Μία έτερη μελέτη συνεισέφερε στα ήδη υπάρχοντα επιδημιολογικά ευρήματα της περιόδου 2009-2013 στην Ελλάδα, αναφορικά με την επαναφορά του *P. vivax* στη Λακωνία [63]. Η πρόκληση μιας συνεχής μετάδοσης προήλθε λόγω της εισόδου μεταναστών (Ινδία) στη χώρα μετά το 2006. Ειδικότερα, αυτό εξηγείται λόγω του συνδυασμού της εμφάνισης ιδίων απλότυπων από παλαιότερες αναλύσεις και της ανάγκης των ατόμων για απασχόληση σε αγροτικές περιοχές ως εργατικό προσωπικό τους καλοκαιρινούς μήνες. Μέσα από αυτές τις αναλύσεις διατυπώνονται τα σωστά μέτρα πρόληψης, καθώς επίσης και η χορήγηση κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής πληθυσμούς με συρροές κρουσμάτων ελονοσίας [63]. Επιπρόσθετα, έχει γίνει αναφορά επανεμφάνισης κρουσμάτων και σε άλλες χώρες, όπου είχε εξαλειφθεί η νόσος στο παρελθόν, όπως η Κορέα (1993) [64] και η Σιγκαπούρη (2009) [65].

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω πληροφορίες, καθίσταται επιτακτική ανάγκη για διαμόρφωση στοχευμένων μεθοδολογιών εντοπισμού του συγκεκριμένου είδους. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αναφερόμενο στο γονιδίο Pν-Msp3a [53], διαθέτει την απαιτούμενη ευαισθησία για ανίχνευση νέων κρουσμάτων.

Κατά ανάλογο τρόπο με την Ελλάδα, υπάρχουν περιπτώσεις και άλλων χωρών, όπου το συγκεκριμένο είδος πλασμωδίου ενοχοποιείται για την εκδήλωση πολλαπλών κρουσμάτων ελονοσίας. Το 2019, η ελονοσία αποτέλεσε ενδημική νόσο σε 87 χώρες παγκοσμίως με καταγραφή 229 εκατομμυρίων κρουσμάτων [4]. Από τα εν λόγω ποσοστά, καταγράφεται πτωτική τάση στα αναφερόμενα με *P. vivax*, έναντι των αντίστοιχων του έτους 2000 (7% με 108 περιπτώσεις ενδημικών για ελονοσία χωρών) [4]. Στην Αφρικανική ήπειρο, οι χώρες με καταγεγραμμένα κρούσματα ελονοσίας από *P. vivax* είναι η Ισημερινή Γουινέα με 15.790 το 2019, η Ερυθραία με 6.108 (έναντι 15.790 κρουσμάτων για το έτος 2018), η Αιθιοπία με 166.340 (έναντι 102.412 για το 2018), ενώ η Ζιμπάμπουε που δεν είχε καμία καταγραφή από το 2010 εμφάνισε 9.299 κρούσματα μόνο για το έτος 2019 [4]. Τέλος, η Ουγκάντα δεν έχει καταγεγραμμένα δεδομένα κρουσμάτων από το 2011, με τελευταίο έτος καταγραφής το 2010 με 15.812 κρούσματα [4]. Το 2019 στην ήπειρο της Αμερικής η καταγραφή περιπτώσεων ελονοσίας με *P. vivax* ήταν 136.949 στη Βραζιλία, 37.197 στην Κολομβία και 618 στο Μεξικό, αντίστοιχα [4]. Το Περού εμφάνισε την ένδειξη των 19.600 περιστατικών και η Βενεζουέλα 308.133 περιστατικά [4]. Στην ανατολική Μεσόγειο, μερικές καταγραφές ήταν 170.747 περιπτώσεις στο Αφγανιστάν και 323.355 στο Πακιστάν. Στην Τουρκία καταγράφηκαν μόνο 34 περιπτώσεις για το έτος 2013 [4]. Τέλος, τα 181.514 κρούσματα *P. vivax* στην Ινδία ξεπέρασαν τα αντίστοιχα 86.769 της Ινδονησίας [4].

Άλλη μία πολύ σημαντική προσέγγιση μέσω της γονοτύπησης, είναι ο καθορισμός της αποτελεσματικότητας των ανθελονοσιακών, μέσω διαφοροποίησης υποτροπής και νέας λοίμωξης. Ειδικότερα, ο καθορισμός επιτυγχάνεται με τη σύγκριση των αλληλόμορφων του πλασμωδίου, που προκύπτουν μέσω της μεθόδου, πριν και μετά τη λήψη ανθελονοσιακού. Η περίπτωση εμφάνισης διαφορετικών αλληλόμορφων, οδηγεί σε συμπέρασμα νέας παρασιτικής λοίμωξης. Από την άλλη, αν έστω και ένα αλληλόμορφο είναι κοινό σε κάθε τόπο, είτε η λοίμωξη χαρακτηρίζεται ως υποτροπή της νόσου, είτε ερμηνεύεται ως μη αποτελεσματικότητα του ανθελονοσιακού σκευάσματος [54]. Ομοίως, σε μία άλλη μελέτη πραγματοποιείται η δεδομένη προσέγγιση. Αναφέρεται πως το 82% των

δειγμάτων παρουσίασαν υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου ή αποτυχία σε δοκιμή θεραπείας. Χάρης τη γονοτυπική ανάλυση αυτών, παρουσιάστηκε ίδιος γονότυπος. Το υπόλοιπο 18% εμφάνισε διαφορετικό γονότυπο, με το συμπέρασμα νέας λοίμωξης ή υποτροπή, αλλά από μόλυνση διαφορετικού παράσιτου. Συνεπώς, με την εφαρμογή του πρωτόκολλου αυτού μπορούν να αναγνωριστούν τυχόν υποτροπιάσεις και ανθεκτικότητα του παρασίτου σε ανθελνοσιακά φάρμακα [59].



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη εργασία πέτυχε να αναδείξει την αξία της γονοτυπικής ανάλυσης σε εργαστηριακό επίπεδο, αναφορικά με τη διερεύνηση κρουσμάτων *P. ninax* σε δείγματα της Λακωνίας. Συγκεκριμένα, η ποικιλομορφία του γονιδίου *Msp3a* του πλασμωνδίου *ninax* επιβεβαιώθηκε με σαφήνεια. Η ύπαρξη της γονοτύπησης αποτελεί κυρίαρχο ρόλο στην αντιμετώπιση της ελονοσίας με αρκετούς τρόπους. Η συγκεκριμένη τεχνική κρίνεται ως άκρως υποσχόμενη και αναμένεται να βοηθήσει σε πιθανές νέες ή δυνητικές εξάρσεις.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι επιδημιολογικές μελέτες που διεξάγονται σε ενδημικές και μη περιοχές για ελονοσία ανά τον κόσμο κρίνονται απαραίτητες από άποψη Δημόσιας Υγείας. Απώτερος στόχος παραμένει η διερεύνηση της μετάδοσης της νόσου στον άνθρωπο, μέσω των πέντε διαφορετικών ειδών πλασμωδίων που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία επιχείρησε να διερευνήσει περαιτέρω και να χαρακτηρίσει το γονοτυπικό προφίλ περιστατικών ελονοσίας από *P. vivax*. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 22 θετικά δείγματα για αυτό το είδος πλασμωδίου και αξιολογήθηκε η συμβολή της γονοτυπικής ανάλυσης. Τα συγκεκριμένα δείγματα είχαν αποσταλεί στο Κέντρο Αναφοράς Ελονοσίας του Τομέα Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων της πρώην Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας (νυν Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής) και ληφθεί από άτομα που προέρχονται κυρίως από ενδημικές χώρες και κατοικούν στην Πελοπόννησο. Τα δείγματα που μελετήθηκαν αφορούν σε 14 περιπτώσεις για το έτος 2016 και οκτώ περιπτώσεις για το έτος 2015, αντίστοιχα.

Η επίτευξη της γονοτυπικής ανάλυσης των θετικών με *P. vivax* δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο με εφαρμογή στοχευμένης μοριακής μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε μοριακό πρωτόκολλο, η αρχή του οποίου βασίζεται στη μέθοδο της εμφωλεασμένης PCR (Nested PCR), μέσω της οποίας ενισχύεται μία καθορισμένη περιοχή του *Msp3a* γονιδίου του *P. vivax*, ένα γονίδιο αντίγονου υψηλής πολυμορφικότητας της επιφανειακής πρωτεΐνης 3a των μεροζωιτών του πλασμωδίου, που χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας των πλασμωδίων. Η προτεινόμενη μεθοδολογία αποτελείται από δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR, με τη χρήση διαφορετικών ζευγών εκκινητών για κάθε αντίδραση (P1-P2 & N1-N2) και αποσκοπεί στην αύξηση της ευαισθησίας του τελικού προϊόντος αντίδρασης.

Τα αποτελέσματα της εργασίας ανέδειξαν τον εντοπισμό τριών διακριτών γονοτύπων του *P. vivax* στο σύνολο των δειγμάτων που ελέγχθηκαν (A, B, C). Η πλειοψηφία των δειγμάτων κατηγοριοποιήθηκε ως έχοντα τον γονότυπο A. Επιπρόσθετα, αναδείχθηκε η αξία της εφαρμογής γονοτυπικής ανάλυσης στη διερεύνηση περιστατικών ελονοσίας από *P. vivax*, η οποία πρέπει να επεκτείνεται

και στη μελέτη περισσότερων γονιδιακών περιοχών ώστε τα αποτελέσματα να έχουν ουσιαστική συμβολή στην επιδημιολογική συσχέτιση των περιστατικών.

## ABSTRACT

Epidemiological studies carried out in endemic and non-endemic areas for malaria around the world are considered imperative from a public health point of view. Investigation for transmission of malaria to humans remains the ultimate goal, through the action of the five currently described different species of *Plasmodium*.

The present study attempted to further investigate and characterize the genotypic profile of malaria *P. vivax* cases. A total of 22 positive samples were used and the contribution of genotypic analysis was evaluated. These samples were sent to the Malaria Reference Center of the Department of Parasitology, Entomology and Tropical Diseases of the former National School of Public Health (currently Department of Public Health Policies, School of Public Health, University of Western Attica), taken from people descending from endemic countries who reside in the Peloponnese region. The samples examined were related to 14 cases for the year 2016 and eight cases for the year 2015, respectively.

Genotypic analysis of positive *P. vivax* samples was carried out in the laboratory using a targeted polymerase chain reaction molecular protocol. More specifically, a nested PCR approach was implemented, according to which a defined area of the Msp3a gene of *P. vivax* was amplified. The latter constitutes a highly polymorphic antigen-encoding gene of the surface protein 3a of plasmodium merozoites, often used in studies of genetic diversity of plasmodium isolates. The proposed methodology consists of two successive PCR reactions, using different pairs of primers for each reaction (P1-P2 & N1-N2) and aims to increase the sensitivity of the final reaction product.

The extracted results showed the identification of three distinct genotypes of *P. vivax* in all tested samples (A, B, C). The majority of samples were categorized as having genotype A. Furthermore, implementation of genotypic analysis in the investigation of malaria cases from *P. vivax* was highlighted, a notion which should be extended towards studying additional genetic regions and contributing substantially in terms of epidemiological correlation of clinical cases.

## Βιβλιογραφία

1. Ανωγιάτης-Pelé Δ, Τσιάμης Κ, Αθανασόπουλου Ι, 2019, Πολιτικές παρεμβολές στην αντιμετώπιση του λοιμώδους νοσήματος της ελονοσίας: Το ανθελονοσιακό πρόγραμμα της UNRRA στη μεταπολεμική Ελλάδα (1945-1949), δέκατος τέταρτος τόμος των «Τετραδίων Ιστορικής Δημογραφίας», ΤΥΠΟΕΚΔΟΤΙΚΗ ΣΤΕΦΑΝΙΔΟΥ ΣΤΕ. ΦΩΤΕΙΝΗ, ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΜΗΜΑ ΙΣΤΟΡΙΑΣ, ΚΕΡΚΥΡΑ, ISSN: 2241-5769.
2. ΕΟΔΥ (διαθέσιμο από: <https://eody.gov.gr/pagkosmia-imeria-elonosias-25-apriliou-2019-miden-elonosia-xekina-me-emena/>, πρόσβαση στις 1-09-20).
3. ΕΟΔΥ (διαθέσιμο από: [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/MALARIA\\_ANNUAL\\_REPORT\\_2020\\_GR.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/MALARIA_ANNUAL_REPORT_2020_GR.pdf), πρόσβαση στις 30-01-21).
4. WHO, WORLD MALARIA REPORT 2020 (available at: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/9789240015791-eng.pdf?sfvrsn=d7a8ec53\\_3&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/9789240015791-eng.pdf?sfvrsn=d7a8ec53_3&download=true), accessed at 30-01-21).
5. Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M, 2011, Ιατρική Μικροβιολογία, 1<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση- 17<sup>η</sup> Αγγλική Έκδοση, Εκδόσεις Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, BROKEN HILL Publishers Ltd.
6. Βακάλης Ν, 2003, Ιατρική Παρασιτολογία, Ιατρικές Εκδόσεις ΖΗΤΑ.
7. Πόγγας Ν, Χαρβάλου Α, 2011, Ιατρική Μικροβιολογία, Α΄ Έκδοση, Εκδόσεις Οδυσσέας.
8. WHO, WORLD MALARIA REPORT 2019 (available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721>, accessed at 10-7-20).

9. Malaria Site, (available at: <https://www.malariasite.com/malaria-parasites/>, accessed at 10-7-20).
10. ΕΟΔΥ (διαθέσιμο από: <https://eody.gov.gr/disease/elonosia/>, πρόσβαση στις 10-7-20).
11. Warrell DA and Gilles HM, 2002, Essential Malariology, 4th edition, CRC Press, Boston: Oxford University Press, (available at: <https://www.amazon.com/Essential-Malariology-4Ed-David-Warrell/dp/0340740647>, accessed at 10-7-20).
12. MALWEST, (available at: <http://www.malwest.gr/el-gr/%CE%B5%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%B9%CE%B1/%CF%80%CE%BB%CE%B7%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%AF%CE%B5%CF%82%CE%B3%CE%B9%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%BA%CE%BF%CE%B9%CE%BD%CF%8C/%CF%84%CE%B9%CE%B5%CE%AF%CE%BD%CE%B1%CE%B9%CE%B7%CE%B5%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AF%CE%B1%CF%80%CF%8E%CF%82%CE%BC%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B4%CE%AF%CE%B4%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B9.aspx>, accessed at 10-7-20).
13. Kousoulis AA, Chatzigeorgiou KS, Danis K, et al. Malaria in Laconia, Greece, then and now: a 2500-year-old pattern. International Journal of Infectious Diseases (2013); 17:e8-e11.
14. Vakali A, Patsoula E, Spanakos G, et al. Malaria in Greece, 1975 to 2010. Eurosurveillance(2012); 17:20322-20330.
15. ΕΟΔΥ (διαθέσιμο από: [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/MALARIA\\_ANNUAL\\_REPORT\\_2019\\_GR.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/MALARIA_ANNUAL_REPORT_2019_GR.pdf), πρόσβαση στις 06-01-21).
16. CDC (available at: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/#tabs-1-5>, accessed at 05-12-20).

17. Livadas GA and Georgopoulos G, Development Of Resistance To DDT By Anopheles Sacharovi In Greece. Bull. Org. mond. Sante(1953); 8:497-511.
18. Patsoula E, Samanidou-Voyadjoglou A, Spanakos G, et al. Molecular characterization of the Anopheles maculipennis complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. Medical and Veterinary Entomology (2007); 21:36-43.
19. United States Environmental Protection Agency (EPA) (available at: <https://www.epa.gov/mosquitocontrol/mosquito-life-cycle#:~:text=%20All%20mosquito%20species%20go%20through%20four%20distinct,emerging%20and%20after%20its%20body%20parts...%20More%20>, accessed at 17-11-20).
20. CDC (available at: <https://www.cdc.gov/malaria/about/faqs.html>, accessed at 07-12-20).
21. Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, et al. Climate, environment and transmission of malaria. Le Infezioni in Medicina(2016); n. 2, 93-104.
22. ΕΟΔΥ (διαθέσιμο από: [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/elonosia\\_taksidi.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/elonosia_taksidi.pdf), πρόσβαση στις 09-12-20).
23. WHO (available at: <https://www.who.int/countries/eth/areas/cds/malaria/en/>, accessed at 09-12-20).
24. CDC (available at: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>, accessed at 09-12-20).
25. CDC (available at: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>, accessed at 09-12-20).
26. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, 2012, Ιατρική Μικροβιολογία, 6<sup>η</sup> Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε., Αθήνα.

27. Nature Reviews Genetics (available at: [nature reviews genetics circle life plasmodium - Bing images](#), accessed at 17-11-20)
28. Bennink S, Kiesow MJ, Pradel G, The development of malaria parasites in the mosquito midgut. Cellular Microbiology(2016); 18(7):905–918.
29. CDC (available at: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>, accessed at 14-12-20).
30. Ζαραλής ΑΘ, 2008, Ερυθροκύτταρο και Αναιμίες, Εκδόσεις Ροτόντα.
31. ΕΟΔΥ (διαθέσιμο από: [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/eisagogi\\_elonosia.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/eisagogi_elonosia.pdf), πρόσβαση στις 06-01-21).
32. CDC (available at: [https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/Malaria\\_Treatment\\_Guidelines.pdf](https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/Malaria_Treatment_Guidelines.pdf), accessed at 14-12-20).
33. Hemingway J, Shretta R, Wells TNC, et al. Tools and Strategies for Malaria Control and Elimination: What Do We Need to Achieve a Grand Convergence in Malaria?. PLOS Biology(2016).
34. CDC (available at: [https://www.cdc.gov/malaria/new\\_info/2020/artesunate\\_approval.html](https://www.cdc.gov/malaria/new_info/2020/artesunate_approval.html), accessed at 17-12-20).
35. Mekanjuola RO and Taylor-Robinson AW, Improving Accuracy of Malaria Diagnosis in Underserved Rural and Remote Endemic Areas of Sub-Saharan Africa: A Call to Develop Multiplexing Rapid Diagnostic Tests. Scientifica(2020).
36. Maltha J, Gillet P, Jacobs J, Malaria rapid diagnostic tests in travel medicine. Clinical Microbiology And Infection(2013); 19:408-415.



37. ΕΟΔΥ (διαθέσιμο από: [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/ergastiriaki\\_diagnosi\\_elonosias.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/ergastiriaki_diagnosi_elonosias.pdf), πρόσβαση στις 3-7-20).
38. Hoogen LL, Bareng P, Alves J, et al. Comparison of Commercial ELISA Kits to Confirm the Absence of Transmission in Malaria Elimination Settings. *Front Public Health*(2020); 8:480.
39. Obeidi N, Rajasekariah GH, Nabipour I, et al. Immunological Testing Reveals Exposure to Malaria in the Hypoendemic Region of Iran. *Int Sch Res Notices*(2014).
40. CDC (available at: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/blood/microexam.html>, accessed at 03-01-21).
41. Tankeshwar A, Quantitative Buffy Coat (QBC) Test: Principle, Method and Analysis. 2015 (available at: <https://microbeonline.com/quantitative-buffy-coat-qbc-test-principle-method-analysis/>, accessed at 03-01-21).
42. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R, 2011, Μοριακή Βιολογία Του Γονιδίου, 6<sup>η</sup> Αμερικάνικη- 1<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση, Υτορία Εκδόσεις ΕΠΕ.
43. WHO, Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings, 2014.
44. Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski J. A., 2007, Ανασυνδυασμένο DNA, 3<sup>η</sup> Αγγλική- 1<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
45. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, 2011, Ιατρική Γενετική, 7<sup>η</sup> Αγγλική – 2<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
46. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2006, Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, 2<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ Α.Ε.

47. Costa DC, Madureira AP, Amaral LC, et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods?. *Mem Inst Oswaldo Cruz*(2014); 109: 21–28.
48. Siwal N, Singh US, Dash M, et al. Malaria diagnosis by PCR revealed differential distribution of mono and mixed species infections by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in India. *PLoS One*(2018); 13(3): e0193046.
49. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong M, et al. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. *Journal of Clinical Microbiology*(2006); 44(3):1087-9.
50. Mangold K, Manson R, Koay E, et al. Real-time PCR for detection and identification of Plasmodium spp. *J Clin Microbiol*(2005); 43:2435–2440.
51. Stanis CS, Song BK, Chua TH, et al. Evaluation of new multiplex PCR primers for the identification of Plasmodium species found in Sabah, Malaysia. *Turkish Journal of Medical Sciences*(2016); 46:207-218.
52. Lima G, Levi JE, Geraldi MP, et al. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*(2011); vol.106 no.6 Rio de Janeiro.
53. Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, et al. Polymorphism at the merozoite surface protein-3a locus of plasmodium vivax: global and local diversity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*(1999); 61(4):518–552.
54. WHO, METHODS AND TECHNIQUES FOR CLINICAL TRIALS ON ANTIMALARIAL DRUG EFFICACY: genotyping to identify parasite populations Informal consultation organized by the Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization 29–31 May 2007, Amsterdam, The Netherlands.

55. Spanakos G, Alifrangis M, Schousboe ML, et al. Genotyping *Plasmodium vivax* isolates from the 2011 outbreak in Greece. *Malar J.*(2013); 12:463.
56. ΕΟΔΥ (διαθέσιμο από: [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/MOSQUITO\\_PROTECTION\\_EODY\\_WEB\\_2020.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/MOSQUITO_PROTECTION_EODY_WEB_2020.pdf), πρόσβαση στις 06-01-21).
57. Imai T, Suzue K, Ngo-Thanh H, et al. Potential and Limitations of Cross-Protective Vaccine against Malaria by Blood-Stage Naturally Attenuated Parasite. *Vaccines (Basel)*(2020); 8:375.
58. Cui L, Mascorro CN, Fan Q, et al. Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand. *Am J Trop Med Hyg*(2003); 68:613-619.
59. Kaul A, Bali P, Anwar S, et al. Genetic diversity and allelic variation in MSP3 $\alpha$  gene of paired clinical *Plasmodium vivax* isolates from Delhi, India. *Journal of Infection and Public Health*(2019); 12:576-584.
60. Rayner JC, Corredor V, Feldman D, et al. Extensive polymorphism in the *plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3 $\alpha$  is limited to specific domains. *Parasitology*(2002); 125:393-405.
61. JR Kim, M Imwong, A Nandy, et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Kolkata, India. *Malaria Journal*(2006); 71.
62. Verma A, Joshi H, Singh V. et al. *Plasmodium vivax* msp-3 $\alpha$  polymorphisms: analysis in the Indian subcontinent. *Malar J*(2016); 15.
63. Spanakos G, Snounou G, Pervanidou D, et al. Genetic Spatiotemporal Anatomy of *Plasmodium vivax* Malaria Episodes in Greece, 2009–2013. *Emerging Infectious Diseases*(2018); 24:541-548.

64. Lee JS, Kho WG, Lee HW, et al. Current status of vivax malaria among civilians in Korea. Korean J Parasitol(1998); 36:241-248. 10.3347/kjp.1998.36.4.241.

65. Ng LC, Lee KS, Tan CH, et al. Entomologic and molecular investigation into *Plasmodium vivax* transmission in Singapore, 2009. Malar J(2010); 9:305-10.1186/1475-2875-9-305.



