



Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία,
ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια (MIS 365280)



**«Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την
ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια»**

Παραδοτέο Π1.25

**Έκθεση αποτελεσμάτων σχετικά με την ανίχνευση, ποσοτικό
προσδιορισμό και τυποποίηση του ιού του Δυτικού Νείλου
σε άγρια πτηνά καθώς και σε ιπποειδή**

Υπεύθυνοι φορείς:

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Λάρισα, 2013



Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης



www.epanad.gov.gr



www.espa.gr



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία,
ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια (MIS 365280)



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	3
Μεθοδολογία	7
Αποτελέσματα	10
Συμπεράσματα Συζήτηση	24
Βιβλιογραφία	28

Εισαγωγή

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (ΔΝ) έχει απομονωθεί από διάφορα είδη πτηνών που διαβιούν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Απομόνωση του ιού του ΔΝ έχει αναφερθεί από πολλά είδη μεταναστευτικών πτηνών. Τα κοινά στοιχεία στη γενετική αλληλουχία μεταξύ στελεχών του ιού του ΔΝ που έχουν απομονωθεί από διάφορες γεωγραφικές περιοχές αποτελούν σαφή απόδειξη της μεταφοράς του μέσω μεταναστευτικών πτηνών. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα μεταναστευτικά είδη συμβάλλουν στην τυχαία εισαγωγή του ιού σε νέες περιοχές κατά τη διάρκεια των μεταναστεύσεών τους προς τις περιοχές διαχείμασης ή αναπαραγωγής.

Ένα βασικό συμπέρασμα που έχει εξαχθεί από πειραματικές μελέτες είναι η μεγάλη ποικιλομορφία στο παρατηρούμενο ιαμικό προφίλ μεταξύ των διαφόρων ειδών. Με ένα εκτιμώμενο όριο του 10^5 PFU ιϊκών σωματίων ανά ml αίματος, άνω του οποίου ένα γεύμα αίματος μπορεί να μεταδώσει τον ιό στο κουνούπι, διάφορα είδη πτηνών των τάξεων των Στρουθιόμορφων (κορακοειδή, σπουργίτια, σπίνοι κτλ.), των Χαραδριόμορφων (μπεκάτσες, γλάροι κτλ.), των Γλαυκόμορφων (κουκουβάγιες, μπούφοι κτλ.) και των Ιερακόμορφων (διάφορα είδη γερακιών) αναπτύσσουν για ορισμένες μέρες (συνήθως 1-4) τίτλους ιαμίας επαρκείς για τη μετάδοση του ιού σε τρεφόμενο κουνούπι (Komar και συν., 2003). Αντίθετα, είδη των τάξεων των Δρυοκολαπτόμορφων (δρυοκολάπτες), των Περιστερόμορφων (περιστέρια, δεκαοχτούρες κτλ.) και των Χηνόμορφων (αγριόπαπιες, χήνες κτλ.) αναπτύσσουν χαμηλότερους τίτλους, σε πολλές περιπτώσεις ανεπαρκείς για τη μετάδοση του ιού σε κουνούπια και την έναρξη του επιδημιολογικού κύκλου.

Σημαντική επίσης είναι η διαπίστωση της άμεσης μετάδοσης του ιού μεταξύ μολυσμένων και υγιών πτηνών που διέμεναν στον ίδιο χώρο, χωρίς την παρουσία ενδιάμεσων διαβιβαστών. Πιθανή οδός μετάδοσης θεωρήθηκε η κοπρανοστοματική. Η επιβεβαίωση της παρουσίας του ιού στα κόπρανα σε τουλάχιστον 17 από τα 24 υπό μελέτη είδη και τις στοματικές εκκρίσεις τουλάχιστον

3

12 από 14 είδη (Komar και συν., 2003), καθιστά δυνατή τη μετάδοσή του μέσω της κατάποσης ή/ και κατά την αμοιβαία περιποίηση των φτερών μεταξύ των πουλιών. Μετάδοση του ιού επιτεύχθηκε και με τη σίτιση κορακοειδών με ιστούς από μολυσμένο νεκρό σπουργίτι. Τα στοιχεία αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά, αν αναλογιστούμε ότι δύσκολα μπορεί να δικαιολογηθεί η τόσο εκτενής χωρικά εξάπλωση του ιού μέσα σε λίγα έτη, όπως συνέβη στη Βόρεια Αμερική, μόνο από τη μόλυνση των κουνουπιών. Απαιτείται ένα χρονικό διάστημα τουλάχιστον 10-14 ημερών μετά τη μόλυνσή τους, για να μεταδώσουν εκ νέου τον ιό, καθώς θα πρέπει ο ιός να πολλαπλασιαστεί στα εντερικά κύτταρα προτού εισβάλλει σε άλλους ιστούς και τελικά στους σιαλογόνους αδένες, απ' όπου μπορεί να μεταδοθεί εκ νέου σε ξενιστή (Meese και συν., 2003). Είναι πολύ δύσκολο επομένως να δικαιολογηθεί η εξάπλωση του ιού κατά 70 χιλιόμετρα κατά μέσο όρο ανά μήνα για 6-8 μήνες κάθε έτος, μόνο από τη δράση των κουνουπιών. Αντίθετα, η εμπλοκή των ενδημικών πτηνών και η άμεση μετάδοση του ιού μεταξύ τους προσφέρουν ένα συμπληρωματικό μηχανισμό εξάπλωσης του ιού. Είδη όπως τα κορακοειδή τρέφονται με πτώματα ζώων, μεταξύ των οποίων και νεκρά μολυσμένα ομοειδή πτηνά. Τα κορακοειδή σχηματίζουν μεγάλες αποικίες, με μία ημερήσια ακτίνα δράσης μέχρι 20 χιλιόμετρα από την κούρνια, με την περιοχή δράσης τους να αλληλεπικαλύπτεται με τις περιοχές δράσης πτηνών από γειτονικές φωλιές (Reiter και συν., 2010). Επίσης, ενήλικα νεαρά παραμένουν κοντά και βοηθούν τους γονείς τους στην ανατροφή των νεοσσών. Είναι επομένως αντιληπτό ότι πτηνά που πεθαίνουν από τη νόσο μπορεί να αποτελέσουν τροφή και μέσο μετάδοσης σε πτηνά γειτονικών φωλιών. Η κοπρανοστοματική οδός μετάδοσης μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική σε πολυπληθή σμήνη, η σίτιση με πτώματα ακόμη και μολυσμένων θηλαστικών αποτελεί επίσης πιθανό τρόπο εισόδου του ιού σε ένα σμήνος, και τέλος, η μετάδοση μπορεί να γίνει και *per os* στους νεοσσούς. Επιδημιολογικά μοντέλα στηρίζουν αυτές τις υποθέσεις και το διαφαινόμενο

σημαντικό ρόλο ενδημικών πουλιών στη διασπορά του ιού (Hartemink και συν., 2007).

Οι περισσότερες περιπτώσεις λοίμωξης με τον ιό του ΔΝ που έχουν καταγραφεί κατά τα τελευταία 30 χρόνια στην περιοχή της Μεσογείου προκαλούνται από το στέλεχος του ιού της γενετικής σειράς 1 (Ευρωπαϊκή Μεσογειακή/Κενυάτικη ομάδα), το οποίο χαρακτηρίζεται από μέτρια παθογένεια για τον άνθρωπο και το άλογο και αμελητέα ή μικρή παθογένεια για τα πτηνά. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναφερθεί σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης, στελέχη με αυξημένη λοιμογόνο δύναμη που κατατάσσονται στην Ισραηλο/Αμερικάνικη ομάδα της γενετικής σειράς 1 ή της σειράς 2. Μεταναστευτικά πτηνά που έχουν μολυνθεί κατά την χειμερινή περίοδο παραμονής τους στην Αφρική πιθανόν να εισαγάγουν αυτά τα πιο επικίνδυνα στελέχη στην Ευρώπη. Η εισαγωγή αυτών των στελεχών με αυξημένη λοιμογόνο δύναμη στη Μεσόγειο, μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες επιζωοτίες, ειδικά τα έτη που υπάρχουν ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες για τους πληθυσμούς των κουνουπιών.

Τα ιπποειδή και ειδικότερα τα άλογα είναι ευπαθή στον Πυρετό του ΔΝ. Η μόλυνσή τους γίνεται από δήγματα μολυσμένων με τον ιό του ΔΝ κουνουπιών *Culex spp.* Σε αντίθεση με τα πτηνά, τα ιπποειδή είναι (δευτερεύοντες) ξενιστές του ιού του ΔΝ, όπως ακριβώς και οι άνθρωποι. Τα ιπποειδή χαρακτηρίζονται ως αδιέξοδοι ξενιστές του ιού (dead-end hosts), διότι κατά τη μόλυνσή τους δεν αναπτύσσεται ικανοποιητική συγκέντρωση των ιικών σωματίων στο αίμα τους ώστε να είναι εφικτή η επαναμόλυνση του πληθυσμού των κουνουπιών (Bunning και συν., 2002; Nielsen και συν., 2008). Έτσι, τα ιπποειδή, σε αντίθεση με τα άγρια πτηνά και τα κουνούπια, δεν επιτελούν ουσιαστικό ρόλο στη διασπορά του ιού, ενώ άμεση μετάδοση του ΙΔΝ από τα άλογα στον άνθρωπο έχει αναφερθεί εξαιρετικά σπάνια και μόνο σε περιπτώσεις χειρισμού των ιστών – στόχων του ιού (νευρικό σύστημα) χωρίς ιδιαίτερες προφυλάξεις κατά τη νεκροψία αλόγων που κατέληξαν από τη

νόσο (Sebastian και συν., 2008; Castillo-Olivares και συν. 2004; Venter και συν. 2010).

Στις εύκρατες περιοχές του βόρειου ημισφαιρίου, ο κίνδυνος μόλυνσης των ιπποειδών από τον ΙΔΝ φαίνεται να είναι μεγαλύτερος κατά τη διάρκεια μιας τρίμηνης περιόδου, από τον Αύγουστο μέχρι και τον Οκτώβριο, όταν τα κουνούπια βρίσκονται στο υψηλότερο σημείο της δραστηριότητάς τους, ενώ στις υποτροπικές περιοχές η περίοδος υψηλού κινδύνου είναι περισσότερο εκτεταμένη μέχρι το σημείο να μην μπορεί πλέον να οριοθετηθεί επακριβώς και να αφορά ακόμη και ολόκληρη τη διάρκεια του έτους (Sebastian και συν., 2008; Nielsen και συν., 2008).

Έρευνες κατά τη διάρκεια επιδημιών Πυρετού του Δυτικού Νείλου έχουν προσδιορίσει σημαντικούς παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν στη λοίμωξη των αλόγων από ΙΔΝ. Συγκεκριμένα, οι ευνοϊκές για την αναπαραγωγή των κουνουπιών εδαφολογικές και κλιματικές συνθήκες (λιμνάζοντα ύδατα, βλάστηση, συχνές βροχοπτώσεις, υψηλές θερμοκρασίες) στην περιοχή που διαβιούν τα άλογα και η παρουσία πολλών οικόσιτων και άγριων ειδών πτηνών στην περιοχή που παρέχουν άφθονη πρόσβαση στα κουνούπια για γεύματα αίματος, επιτρέπουν τη δημιουργία και συντήρηση ενός πολύ μεγάλου πληθυσμού κουνουπιών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εύκολη διασπορά του ΙΔΝ, εφόσον ο ιός εισαχθεί στο οικοσύστημα της περιοχής συνήθως διαμέσου αποδημητικών πτηνών (Sebastian και συν., 2008; Ward και συν., 2006; Erp και συν., 2007).

Η ανίχνευση, ο προσδιορισμός και η τυποποίηση του ιού του ΔΝ σε άγρια πτηνά καθώς και σε ιπποειδή αποτελεί στοχευμένη δράση του προγράμματος, η οποία θα συμβάλλει στη κατανόηση της δυναμικής συμπεριφοράς του ιού ώστε να εκτιμηθούν οι δυνητικές εστίες διασποράς του ιού και να αποκτηθεί τεχνογνωσία για το σχεδιασμό ενός ολοκληρωμένου προγράμματος ελέγχου του νοσήματος στη χώρα μας.

Μεθοδολογία

Κατά τη μελέτη ανίχνευσης του ιού του ΔΝ στα άγρια πτηνά και στα ιπποειδή, πραγματοποιήθηκε τόσο ορολογική αναζήτηση της έκθεσης των ζώων στον ιό, όσο και η μοριακή αναζήτηση με ανίχνευση γενετικού υλικού του ιού για τη περαιτέρω μελέτη του μέσα από την αλληλούχισή του (sequencing).

Η δειγματοληψία των άγριων πτηνών πραγματοποιήθηκε από επιλεγμένες γεωγραφικές περιοχές (υγράτοποι, λίμνες κτλ.) περιλαμβάνοντας δείγματα από θηρευμένα πτηνά, τα οποία ανήκουν σε είδη θηρεύσιμα σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, κατά τις επιτρεπόμενες ανά είδος κυνηγετικές περιόδους, σε συνεργασία με τις κατά τόπους Κυνηγετικές Ομοσπονδίες. Επίσης, δείγματα συλλέχθηκαν από πτηνά που βρέθηκαν νεκρά αλλά και από συλληφθέντα με τη χρήση ειδικών παγίδων, με πραγματοποίηση αιμοληψίας και μετέπειτα απελευθέρωσης του πτηνού. Προτεραιότητα δόθηκε στην αναζήτηση δειγμάτων κορακοειδών, τα οποία έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί δείκτες παρουσίας του ιού σε τοπικό επίπεδο, και δειγμάτων αποδημητικών πτηνών που έχουν αναγνωριστεί ως φορείς του ΙΔΝ και ικανοποιούν τις απαιτήσεις που προαναφέρθηκαν για τη μεταφορά του ιού σε μεγάλες αποστάσεις κατά τη μετανάστευσή τους, όντας σε ιαμική φάση.

Η συντήρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στις κατάλληλες θερμοκρασίες (-20 για τα δείγματα ορών, -80 για τα δείγματα ιστών), ενώ την εκχύλιση του ολικού RNA των δειγμάτων ακολούθησε η ανάστροφη αντιγραφή του σε συμπληρωματικό DNA (cDNA).

Η ορολογική μελέτη των δειγμάτων πτηνών πραγματοποιήθηκε με μια σειρά αξιολογημένων διαγνωστικών τεχνικών:

- 1) Με έμμεσο ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας ειδικά anti-bird FITC-conjugates και πλάκες επιστρωμένες με κύτταρα μολυσμένα από τον ιό (EUROIMMUN).

7

- 2) Με ανταγωνιστική ELISA (West Nile Competition, ID Vet, Montpellier, France), αποφεύγοντας έτσι τη χρήση ειδικού anti-bird conjugate, κάτι αναγκαίο ιδιαίτερα στη περίπτωση σπανιότερων ειδών πτηνών για τα οποία δεν έχει επαληθευτεί η αντίδραση του αντι-αντισώματος με τα αντισώματα του ορού τους.
- 3) Με τη τεχνική μικρο-εξουδετέρωσης του ιού (micro-VNT) με τη χρήση κυτταρικής σειράς Vero επιμολυσμένης με στέλεχος του ιού του ΔΝ.

Κατά τη μοριακή διερεύνηση δειγμάτων ιστών χρησιμοποιήθηκε:

- 1) Η τεχνική real-time PCR βασισμένη στη χρήση Taqman probes, με την εφαρμογή ειδικού εμπορικού κιτ (LSI, TaqVet West Nile Virus -Dual IPC-) αφού πρώτα ελέγχθηκε ότι μπορεί να ανιχνεύσει ελληνικά στελέχη του ιού του ΔΝ.
- 2) Η τεχνική συμβατικής RT-PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών που στοχεύουν τη περιοχή NS5 του γενώματος του ιού, μία περιοχή με επαρκή γενωμική σταθερότητα για την διάγνωση της παρουσίας του ιού με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών, αλλά και με δυνατό φυλογενετικό σήμα, για την αποτελεσματική μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση της αλληλουχίας.

Η τυποποίηση και η φυλογενετική ανάλυση του ιού γίνεται με αλληλούχηση του γονιδιώματος του ιού και τη σύγκριση του με άλλα στελέχη. Δυο γενετικές σειρές του ιού του ΔΝ είναι ευρέως αναγνωρισμένες: η γενετική σειρά 1 (Ευρωπαϊκή Μεσογειακή/Κενυάτικη ομάδα), και η γενετική σειρά 2. Η γενετική σειρά 1 περιλαμβάνει στελέχη από την Αφρική, τη Μέση Ανατολή, την Ευρώπη, την Ινδία, την Αυστραλία και την Αμερική. Στελέχη της γενετικής σειρά 1 χαρακτηρίζονται από μέτρια παθογένεια για τον άνθρωπο και τα ιπποειδή και αμελητέα ή μικρή παθογένεια για τα πτηνά. Μέχρι πρόσφατα, όλα τα στελέχη της γενετικής σειράς 2 προέρχονταν από την υποσαχάρια Αφρική και τη Μαδαγασκάρη. Εν τούτοις, στελέχη της γενετικής σειράς 2 εντοπίστηκαν στην Ουγγαρία και στην Αυστρία σε αρπακτικά πτηνά (κατά τα έτη 2004-2005 και 2008-2009) και σε ιπποειδή στην

8

Αφρική το 2008. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναφερθεί από διάφορες περιοχές της Ευρώπης, στελέχη με αυξημένη μολυσματικότητα και παθογονικότητα που κατατάσσονται στην Ισραηλο/Αμερικάνικη ομάδα της γενετικής σειράς 1 ή 2. Τουλάχιστον πέντε νέες γενετικές σειρές έχουν προταθεί για στελέχη που έχουν απομονωθεί στην Κεντρική Ευρώπη, τη Ρωσία και την Ινδία. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η αύξηση της λοιμογονικότητας μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του. Η ταχεία εξάπλωση του ιού στην Ιταλία τα τελευταία δυο χρόνια αποδίδεται σε μια μετάλλαξη σε τμήμα της πρωτεΐνης NS3. Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του απομονωμένου στελέχους βοηθά στην καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας της νόσου και της εξελικτικής πορείας του ιού. Από προκαταρκτικές μελέτες σε κουνούπια στη Β. Ελλάδα φάνηκε ότι το επιδημικό στέλεχος που ανιχνεύτηκε ανήκε στη γενετική σειρά 2.

Σε αυτά τα πλαίσια επιχειρήθηκε η αλληλούχηση του γονιδιώματος των απομονωθέντων στελεχών για την ταξινόμηση τους σε γενετική σειρά, αλλά και για τον έλεγχο ύπαρξης μεταλλάξεων που μπορεί να προσδίδουν νέα χαρακτηριστικά.

Η ταυτοποίηση και φυλογενετική κατάταξη των στελεχών πραγματοποιήθηκε με την αλληλούχηση της γενωμικής περιοχής NS5. Η γονιδιακή αυτή περιοχή έχει χρησιμοποιηθεί και κατά το παρελθόν σε άλλες φυλογενετικές έρευνες, είναι μια περιοχή γενετικά σταθερή ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση της παρουσίας του ιού με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών αλλά και με αρκετά ισχυρό φυλογενετικό σήμα. Με την απόκτηση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας πραγματοποιείται ανάλυση των ακολουθιών και συγκρίνονται με τις ήδη δημοσιευμένες ακολουθίες με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών βιοπληροφορικής (MEGA 5.0).

Αποτελέσματα

Αποτελέσματα επιτήρησης άγριων πτηνών

Κατά τη πορεία του προγράμματος συλλέχθηκαν τα ακόλουθα δείγματα (ιστοί και οροί):

Είδος Πτηνού	Νο Δειγμάτων	Περιοχή	Περίοδος Συλλογής
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	18	Τρίλοφος Θεσσαλονίκης	Α' Εξάμηνο 2012
Μπεκάτσες (<i>Scolorax rusticola</i>)	6	Φλώρινα	Α' Εξάμηνο 2012
Τσίχλες (<i>Turdus philomelos</i>)	2	Νεστάνη Τρίπολης	Α' Εξάμηνο 2012
Τσίχλες (<i>Turdus philomelos</i>)	2	Περιοχή Έβρου	Α' Εξάμηνο 2012
Μπεκάτσες (<i>Scolorax rusticola</i>)	2	Καλαμπάκα Τρικάλων	Α' Εξάμηνο 2012
Αγριοπερίστερο (<i>Columba livia</i>)	1	Καλαμπάκα Τρικάλων	Α' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	6	Γαλλικός Ποταμός	Α' Εξάμηνο 2012
Κουρούνες (<i>Corvus cornix</i>)	3	Γαλλικός Ποταμός	Α' Εξάμηνο 2012
Μπεκάτσες (<i>Scolorax rusticola</i>)	10	Λίμνη Πλαστήρα	Α' Εξάμηνο 2012
Τσίχλες (<i>Turdus philomelos</i>)	2	Βασιλικά Θεσσαλονίκης	Α' Εξάμηνο 2012
Κίσσα (<i>Garrulus glandarius</i>)	1	Βασιλικά Θεσσαλονίκης	Α' Εξάμηνο 2012
Κιρκίρι	7	Χαλάστρα	Α' Εξάμηνο 2012

Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	8	Θήβα	Α' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	4	Θήβα	Β' Εξάμηνο 2012
Περιστερία (<i>Columba livia</i>)	3	Αττική	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	34	Αττική	Β' Εξάμηνο 2012
Περιστερία (<i>Columba livia</i>)	7	Θεσσαλία	Β' Εξάμηνο 2012
Κιρκινέζια (<i>Falco naumanni</i>)	2	Θεσσαλία	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	2	Θεσσαλία	Β' Εξάμηνο 2012
Μπεκάτσες (<i>Scolorax rusticola</i>)	3	Θεσσαλία	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	8	Μεσολόγγι	Β' Εξάμηνο 2012
Φιδαετός (<i>Circaetus gallicus</i>)	1	Μεσολόγγι	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	3	Ιωάννινα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	5	Αργίνο	Β' Εξάμηνο 2012
Κουρούνες (<i>Corvus cornix</i>)	3	Αργίνο	Β' Εξάμηνο 2012
Κουρούνες (<i>Corvus cornix</i>)	2	Σέρρες	Β' Εξάμηνο 2012
Τσίχλες (<i>Turdus philomelos</i>)	3	Σέρρες	Β' Εξάμηνο 2012
Περιστερία (<i>Columba livia</i>)	1	Σέρρες	Β' Εξάμηνο 2012
Ορτύκι (<i>Coturnix coturnix</i>)	1	Κιλκίς	Β' Εξάμηνο 2012
Τσίχλες (<i>Turdus philomelos</i>)	2	Πέλλα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	5	Γαλλικός Ποταμός	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	11	Τρίλοφος Θεσσαλονίκης	Β' Εξάμηνο 2012
Ορτύκι (<i>Coturnix coturnix</i>)	3	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Τρυγόνι (<i>Streptopelia Turtur</i>)	1	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	4	Βοιωτία	Β' Εξάμηνο 2012
Δεκαοχτούρα (<i>Streptopelia decaocto</i>)	1	Βοιωτία	Β' Εξάμηνο 2012
Φιδαετός (<i>Circaetus gallicus</i>)	1	Μεσολόγγι	Β' Εξάμηνο 2012

Σφουριχτάρι	6	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Μπεκάτσα	2	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Πρασινοκέφαλη	1	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Φάσσα	3	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Κοκκινότσιγλα	1	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Δενδρότσιγλα	1	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Καπακλής	1	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Καστανιά	2	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Κότσουφας	2	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Σφουριχτάρι	1	Χαλάστρα	Β' Εξάμηνο 2012
Αγριοπερίστερο	2	Σέρρες	Β' Εξάμηνο 2012
Πρασινοκέφαλη	5	Σέρρες	Β' Εξάμηνο 2012
Βαρβάρα	1	Σέρρες	Β' Εξάμηνο 2012
Καπακλής	1	Σέρρες	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	10	Ξάνθη	Α' Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	8	Αττική	Α' Εξάμηνο 2013
Ψαρόνια (<i>Sturnus vulgaris</i>)	2	Αττική	Α' Εξάμηνο 2013
Μπεκάτσες (<i>Scolopax rusticola</i>)	6	Θεσσαλονίκη	Α' Εξάμηνο 2013
Μπεκάτσες (<i>Scolopax rusticola</i>)	10	Ημαθία	Α' Εξάμηνο 2013
Τσίχλες (<i>Turdus philomelos</i>)	20	Θεσσαλονίκη	Α' Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	2	Καρδίτσα	Α' Εξάμηνο 2013
Πρασινοκέφαλες πάπιες (<i>Anas platyrhynchos</i>)	40	Θεσσαλονίκη	Α' Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	6	Γαλλικός Ποταμός	Α' Εξάμηνο 2013
Κουρούνες (<i>Corvus cornix</i>)	3	Γαλλικός Ποταμός	Α' Εξάμηνο 2013
Νανόμπουφος (<i>Asio otus</i>)	1	Λάρισα	Α' Εξάμηνο 2013
Κιρκίρι	5	Χαλάστρα	Α' Εξάμηνο 2013

Μπεκασίνοι	1	Έβρος	Α' Εξάμηνο 2013
Σφυριχτάρι	2	Χαλάστρα	Α' Εξάμηνο 2013
Ψαλίδα	2	Χαλάστρα	Α' Εξάμηνο 2013
Σαρσέλα	1	Χαλάστρα	Α' Εξάμηνο 2013
Σπουργίτι (<i>Passer domesticus</i>)	1	Καρδίτσα	Β' Εξάμηνο 2013
Σπουργίτι (<i>Passer domesticus</i>)	1	Αθήνα	Β' Εξάμηνο 2013
Καρδερίνα (<i>Carduelis carduelis</i>)	1	Αττική	Β' Εξάμηνο 2013
Ποταμίδα (<i>Acrocephalus sp</i>)	1	Υλίκη Βοιωτίας	Β' Εξάμηνο 2013
Σταυλοχελίδονο (<i>Hirundo rustica</i>)	1	Αττική	Β' Εξάμηνο 2013
Σταυλοχελίδονο (<i>Hirundo rustica</i>)	1	Αταλάντη	Β' Εξάμηνο 2013
Σπουργίτι (<i>Passer domesticus</i>)	1	Αττική - Κρυονέρι	Β' Εξάμηνο 2013
Κότσυφας (<i>Turdus merula</i>)	1	Αττική-Κ. Χαλάνδρι	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	1	Φάρσαλα	Β' Εξάμηνο 2013
Χωραφοσπουργίτης (<i>Passer hispaniolensis</i>)	2	Καρδίτσα	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	4	Τρίλοφος Θεσσαλονίκης	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	6	Γαλλικός ποταμός	Β' Εξάμηνο 2013
Σταυλοχελίδονο (<i>Hirundo rustica</i>)	2	Νιγρίτα-Άγιος Δημήτριος	Β' Εξάμηνο 2013
Σπουργίτι (<i>Passer domesticus</i>)	3	Νιγρίτα-Άγιος Δημήτριος	Β' Εξάμηνο 2013
Κίσσα (<i>Garrulus glandarius</i>)	1	Νιγρίτα	Β' Εξάμηνο 2013
Κούκος (<i>Cuculus canorus</i>)	1	Καρδίτσα	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	20	Γαλλικός ποταμός	Β' Εξάμηνο 2013

Χουχουριστής (<i>Strix aluco</i>)	1	Καλλίδρομο-Άγιος Σεραφείμ	Β'Εξάμηνο 2013
Ορτύκι (<i>Coturnix coturnix</i>)	4	Λαύριο-Κερατέα	Β'Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	5	Σπάτα Συκιές	Β'Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	5	Πικέρμι	Β'Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	3	Αρτέμιδα	Β'Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	2	Ραφήνα	Β'Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	4	Παιανία-Παλήνη	Β'Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	1	Λούτσα-Βραυρώνα	Β'Εξάμηνο 2013
Σπουργίτι (<i>Passer domesticus</i>)	1	Πικέρμι	Β'Εξάμηνο 2013
Σκουφοβουτηχτάρα. (<i>Podiceps cristatus</i>)	2	Βόλβη	Β'Εξάμηνο 2013
Τσικνόπαπια (<i>Aythya fuligula</i>)	1	Βόλβη	Β'Εξάμηνο 2013
Φαλαρίδα (<i>Fulica atra</i>)	1	Βόλβη	Β'Εξάμηνο 2013
Πρασινοκέφαλες πάπιες (<i>Anas platyrhynchos</i>)	3	Χαλάστρα	Β'Εξάμηνο 2013
Κιρκίρι (<i>Anas crecca</i>)	1	Χαλάστρα	Β'Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	5	Μαρκόπουλο	Β'Εξάμηνο 2013
Καρακάξες (<i>Pica pica</i>)	3	Σπάτα	Β'Εξάμηνο 2013
ΣΥΝΟΛΟ	416		



Εικόνα 1. Χάρτης απεικόνισης των σημείων δειγματοληψίας των άγριων πτηνών κατά τη πορεία του προγράμματος.

Τα ακόλουθα δείγματα ανευρέθηκαν θετικά (μοριακά ή/και ορολογικά) κατά τη πορεία του προγράμματος:

Είδος	Περιοχή	Ημ. Δειγματοληψίας
Κουρούνα (<i>Corvus cornix</i>)	Γαλλικός	Α' Εξάμηνο 2012

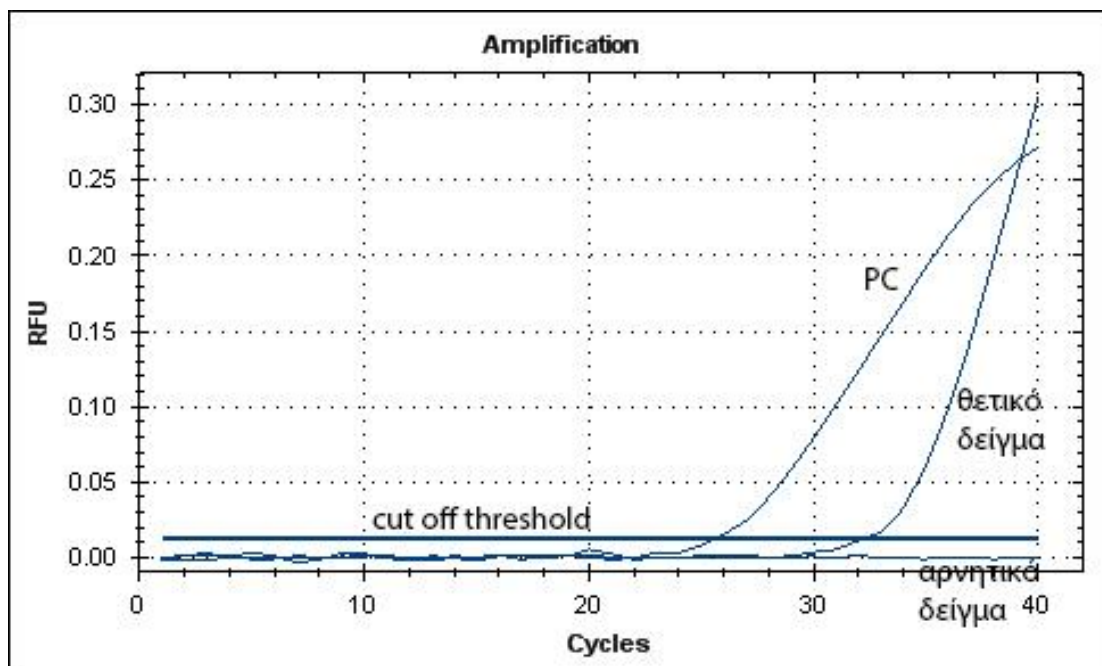
	ποταμός	
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Θήβα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Θήβα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Τρίλοφος	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Τρίλοφος	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Πικέρμι- Ραφήνα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Πικέρμι- Ραφήνα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Πικέρμι- Ραφήνα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Παιανία- Μαρκόπουλο	Β' Εξάμηνο 2012
<i>Circaetus gallicus</i> (Φιδαετός)	Μεσολόγγι	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Θήβα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Σπάτα	Β' Εξάμηνο 2012
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Ξάνθη	Α' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Ξάνθη	Α' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Γαλλικός ποταμός	Α' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Αττική	Α' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Αττική	Α' Εξάμηνο 2013
Κούκος (<i>Cuculus canorus</i>)	Καρδίτσα	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Γαλλικός	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Γαλλικός	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Γαλλικός	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Γαλλικός	Β' Εξάμηνο 2013

Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Σπάτα Συκιές	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Πικέρμι	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Πικέρμι	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Αρτέμιδα	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Παιανία- Παλήνη	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Παιανία- Παλήνη	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Μαρκόπουλο	Β' Εξάμηνο 2013
Σπουργίτι (<i>Passer domesticus</i>)	Αθήνα	Β' Εξάμηνο 2013
Σταυλοχελίδονο (<i>Hirundo rustica</i>)	Αταλάντη	Β' Εξάμηνο 2013
Κότσουφας (<i>Turdus merula</i>)	Αττική-Κ. Χαλάνδρι	Β' Εξάμηνο 2013
Πρασινοκέφαλη πάπια (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Κοκκινότσιχλα	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Σφυριχτάρι	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Κότσουφας	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Κότσουφας	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Χωραφοσπούργιτο	Καρδίτσα	Β' Εξάμηνο 2013
Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Τρίλοφος	Β' Εξάμηνο 2013
ΣΥΝΟΛΟ	39	

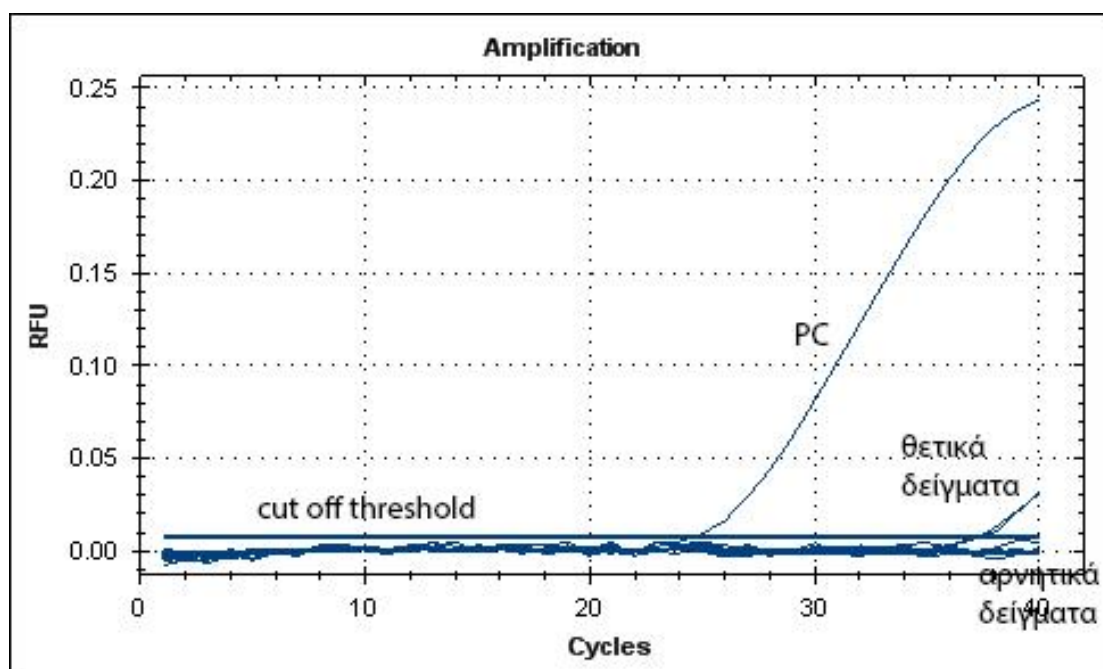
Η χρησιμοποίηση των ορολογικών δεδομένων που προέκυψαν από την διερεύνηση των δειγμάτων των πτηνών, σε συνδυασμό με προγενέστερα ορολογικά δεδομένα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας και τη χρήση στατιστικών εργαλείων και Γεωγραφικών Συστημάτων Πληροφοριών (GIS) επέτρεψαν την

αξιολόγηση και προσδιορισμό περιοχών υψηλού κινδύνου για τη περαιτέρω εξάπλωση του ιού στα επόμενα χρόνια (αναλυτικά η περιγραφή των αποτελεσμάτων της μελέτης στο παραδοτέο Π1.12).

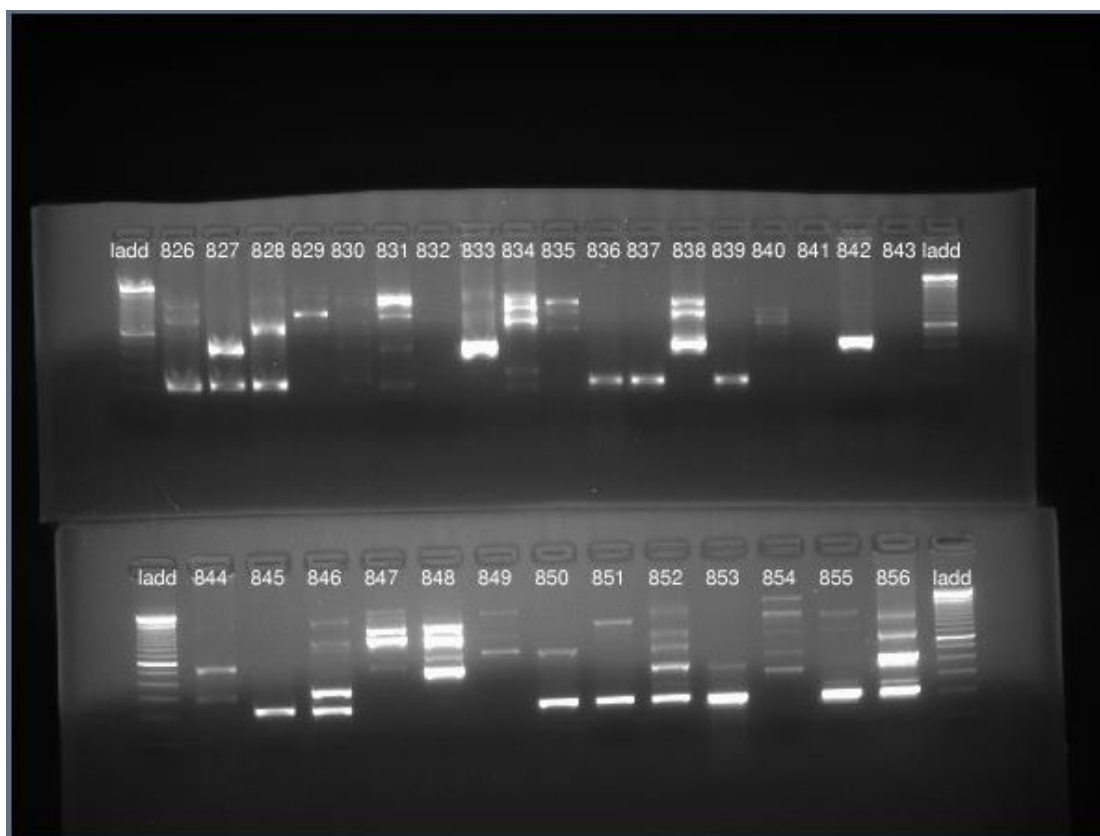
Θετικά δείγματα εντοπίστηκαν τόσο με τη real-time PCR όσο και με τη συμβατική RT-PCR, με τη πρώτη να αποδεικνύεται σημαντικά πιο ευαίσθητη (Εικόνα 2, 3 και 4).



Εικόνα 2. Απεικόνιση θετικού αποτελέσματος από άγριο πτηνό (Καρακάξα, Τρίλοφος Θεσσαλονίκης) με την εφαρμογή real-time PCR (LSI, TaqVet West Nile Virus Dual IPC).



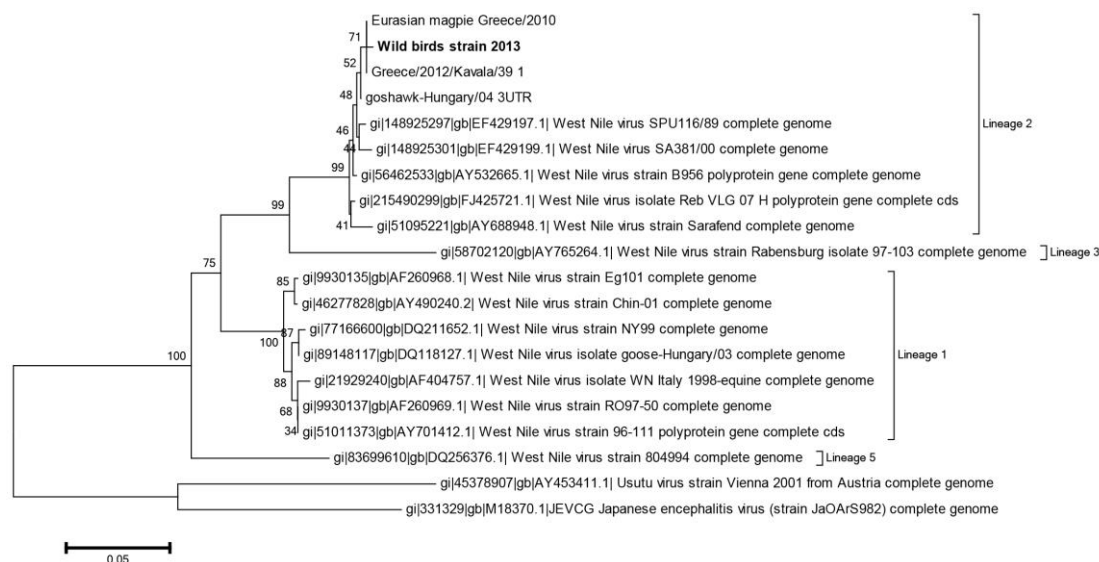
Εικόνα 3. Παράδειγμα εύρεσης δύο ελαφρά θετικών δειγμάτων άγριων πτηνών, τα οποία δε μπορούσαν να ανευρεθούν θετικά με τη συμβατική RT-PCR.



Εικόνα 4. Παράδειγμα αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης, κατά τη μοριακή διερεύνηση δειγμάτων άγριων πτηνών. Χρησιμοποιήθηκαν degenerate εκκινήτες που μπορούν να ανιχνεύσουν διάφορους φλαβοϊούς. Το αναμενόμενο προϊόν έχει μέγεθος 400 βάσεων (φθορίζουσα μπάντα του ladder μεγέθους 600 βάσεων). Σε περίπτωση παρουσίας περισσότερων μπαντών σε ένα δείγμα, ακολουθεί εκχύλιση της μπάντας του αναμενόμενου μεγέθους από τη γέλη, με τη χρήση ειδικών kit.

Η φυλογενετική ανάλυση των θετικών μοριακά δειγμάτων αποδεικνύει την έκθεση των άγριων πτηνών στον ιό του ΔΝ τύπου 2, παράλληλα με τη παρουσία του ιού στον άνθρωπο και στα κουνούπια. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν συνώνυμες μεταλλάξεις του γενώματος του ιού στη περιοχή NS5 (εικόνα 5), οι οποίες δημιουργούν ανησυχίες ως προς την μεταλλακτική ικανότητα του ιού, η

οποία μπορεί να οδηγήσει σε μη συνώνυμες αλλαγές στο γένωμα, με τις εκφραζόμενες πρωτεΐνες πιθανότατα να αυξάνουν την παθογενετικότητα του κυκλοφορούντος στελέχους. Παρ' όλα αυτά, μέχρι στιγμής δεν εντοπίστηκε καμία μη συνώνυμη μεταλλαγή του ιού.



Εικόνα 5. Φυλογενετική ανάλυση γενωμικής περιοχής NS5 μεγέθους 361 βάσεων όπως εντοπίστηκε σε δείγματα άγριων πτηνών συλλεχθέντα το 2013 (έντονα γράμματα). Το φυλογενετικό δέντρο δημιουργήθηκε με στατιστική ανάλυση Neighbor-joining, χρησιμοποιώντας το μοντέλο Kimura 2, και ελεγχόμενο με bootstrap 1000.

Αποτελέσματα επιτήρησης υποειδών

Ενεργητική επιτήρηση στα υποειδή λίμνης Κάρλας (2012-2013)

Κατά το χρονικό διάστημα 5-19 Ιουλίου 2012 πραγματοποιήθηκε αιμοληψία σε 47 άλογα διαφόρων εκτροφών περιμετρικά της Λίμνης Κάρλας (Καλαμάκι Λάρισας, Στεφανοβίκειο Μαγνησίας, Ριζόμυλος Μαγνησίας και Βελεστίνο Μαγνησίας) και στη συνέχεια εφαρμόστηκε εργαστηριακή εξέταση των ορών του αίματος με την ορολογική μέθοδο ELISA για ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι του WNV, με στόχο

να αποκλειστούν από τη μελέτη τα οροθετικά άλογα και να χρησιμοποιηθούν μόνο τα οροαρνητικά άλογα

Σύνολο αλόγων από τα οποία πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες: 47

Σύνολο οροθετικών αλόγων: 13

Σύνολο οροαρνητικών αλόγων: 34

Η συστηματική κτηνιατρική κλινική επιτήρηση των 34 οροαρνητικών αλόγων (με στόχο να απομονωθεί και να ελεγχθεί κάθε νέο κλινικό κρούσμα της νόσου και σε περίπτωση θανάτου να γίνει νεκροψία για απομόνωση του ιού από του ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος) έδειξε απουσία οποιασδήποτε κλινικής εκδήλωσης της νόσου. Επίσης, στα συγκεκριμένα οροαρνητικά άλογα πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες ανά τακτά διαστήματα από τα τέλη Ιουλίου 2012 μέχρι τον Οκτώβριο 2013. Οι οροί εξετάστηκαν με χρήση ορολογικής μεθόδου ELISA για αντισώματα IgM έναντι του WNV.

Ενεργητική επιτήρηση στα ιπποειδή περιοχής Μαραθώνα (2013)

Την 10^η Ιουνίου 2013 πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες σε 23 άλογα ιππικού ομίλου της περιοχής Μαραθώνα Αττικής και στη συνέχεια εφαρμόστηκε εργαστηριακή εξέταση των ορών του αίματος με την ορολογική μέθοδο ELISA για ανίχνευση αντισωμάτων IgG έναντι του WNV, με στόχο να αποκλειστούν από τη μελέτη τα οροθετικά άλογα και να χρησιμοποιηθούν μόνο τα οροαρνητικά άλογα.

Σύνολο αλόγων από τα οποία πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες: 23

Σύνολο οροθετικών αλόγων: 0

Σύνολο οροαρνητικών αλόγων: 23

Η συστηματική κτηνιατρική κλινική επιτήρηση των 23 οροαρνητικών αλόγων (με στόχο να απομονωθεί και να ελεγχθεί κάθε νέο κλινικό κρούσμα της νόσου και σε περίπτωση θανάτου να γίνει νεκροψία για απομόνωση του ιού από του ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος) έδειξε απουσία οποιασδήποτε κλινικής εκδήλωσης της νόσου. Επίσης, στα συγκεκριμένα οροαρνητικά άλογα

22



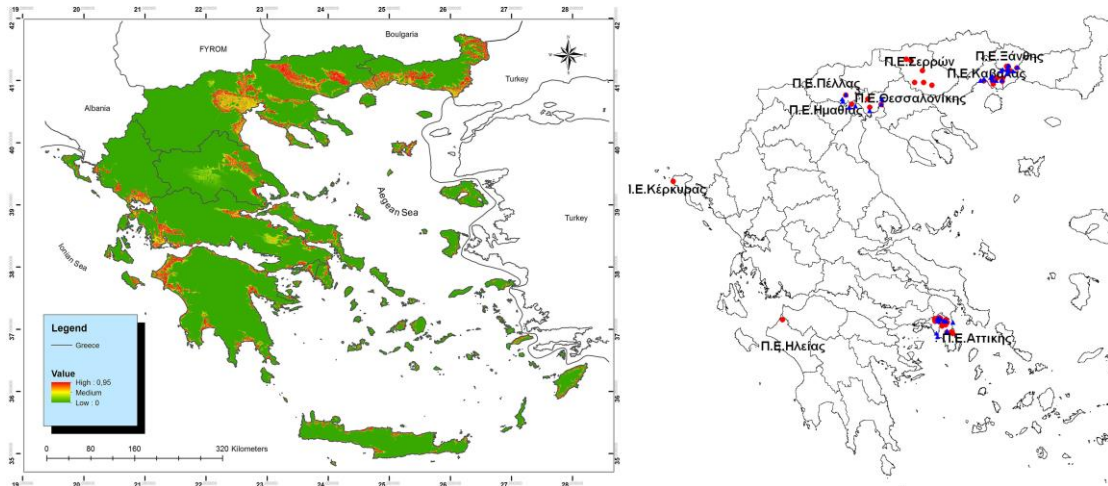
πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες ανά τακτά διαστήματα από τα τέλη Ιουλίου 2013 μέχρι τον Οκτώβρη 2013. Οι οροί εξετάστηκαν με χρήση ορολογικής μεθόδου ELISA για αντισώματα IgM έναντι του WNV.

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Συμπεράσματα επιτήρησης άγριων πτηνών

Ο εντοπισμός της έκθεσης διαφόρων ειδών άγριων πτηνών στον ιό του ΔΝ, αποτελεί σημαντική ένδειξη για τον επιδημιολογικό ρόλο που αυτά μπορούν να διαδραματίσουν στη διατήρηση και την περαιτέρω εξάπλωση του ιού. Η δειγματοληψία και ο εντοπισμός θετικών νεαρών πτηνών (<1 έτους) αποδεικνύει την πρόσφατη έκθεση αυτών στον ιό. Μάλιστα, ο εντοπισμός σημαντικού αριθμού οροθετικών άγριων ενδημικών πτηνών (κορακοειδή) με ήδη αποδεδειγμένο τον ρόλο που διαδραματίζουν στην επιδημιολογία της νόσου, αποδεικνύει έναν πιθανό μηχανισμό διατήρησης του ιού τοπικά όσο και εξάπλωσης του ιού σε γειτονικές περιοχές.

Τα δεδομένα παρουσίας οροθετικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτισή τους με πιθανούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν να επιτρέψουν τον καθορισμό και την πρόβλεψη νέων περιοχών υψηλού κινδύνου για τη περαιτέρω εξάπλωση του ιού. Δύο περιβαλλοντικοί παράγοντες αναγνωρίστηκαν (χαμηλό υψόμετρο και απόσταση από νερό) για τους οποίους καθορίστηκαν οι μέσες τιμές υψηλού κινδύνου. Το αποτέλεσμα της μελέτης υπήρξε ικανοποιητικό αφού υπήρξε η δυνατότητα επαλήθευσης της γεωχωρικής ανάλυσης με τα ανθρώπινα περιστατικά τόσο του 2012 όσο και του 2013, επιτρέποντας την πρόβλεψη νέων περιοχών εξάπλωσης του ιού (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Χάρτης απεικόνισης των περιοχών υψηλού κινδύνου όπως προέκυψε από την ανάλυση των γεωχωρικών δεδομένων παρουσίας οροθετικών πτηνών (αριστερά). Χάρτης με τα δηλωμένα ανθρώπινα περιστατικά νόσου του ΔΝ, έως 6 Νοεμβρίου 2013 (πηγή: ΚΕΕΛΠΝΟ). Επιδεικνύεται η απόλυτη συσχέτιση των προβλεπόμενων περιοχών με παλαιότερες αλλά και νεοεμφανιζόμενες περιοχές εξάπλωσης της νόσου.

Ενδιαφέρουσα είναι η παρατηρούμενη συσχέτιση μεταξύ των περιοχών με ανθρώπινα κρούσματα και οροθετικότητας ενδημικών πτηνών. Οροθετικά πτηνά βρέθηκαν μόνο σε περιοχές στις οποίες υπήρξαν κρούσματα της νόσου σε ανθρώπους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή της Αττικής: δείγματα που ελέγχθηκαν και τα οποία προήλθαν από περίοδο προγενέστερη της εμφάνισης κρουσμάτων σε ανθρώπους, ήταν και αυτά οροαρνητικά, υποδηλώνοντας μια πιθανή μεταγενέστερη εισαγωγή του ιού στη περιοχή, και επομένως εκφράστηκαν ανησυχίες ως προς ότι ο πολλαπλασιαστικός κύκλος του ιού (πουλιά-κουνούπια-πουλιά) βρίσκεται στην έναρξή του, αναμένοντας επομένως σημαντική αύξηση των ανθρώπινων κρουσμάτων, κάτι που δυστυχώς επιβεβαιώθηκε για την περιοχή.

Η συσχέτιση οροθετικότητας άγριων πτηνών και αναφερόμενων ανθρώπινων περιστατικών, επιδεικνύει τη σημαντικότητα της χρήσης των προγραμμάτων

επιτήρησης δειγμάτων άγριων πτηνών σε απρόσβλητες από τον ιό περιοχές, για τον έγκαιρο εντοπισμό εισόδου του ιού και παράλληλα έγκαιρη λήψη των απαραίτητων υγειονομικών μέτρων. Παράλληλα, η ανεύρεση μεταλλάξεων στα εντοπισμένα στελέχη τα κυκλοφορούντα στην άγρια φύση, δημιουργεί σημαντικές ανησυχίες για τη μελλοντική πορεία της νόσου, και καθιστά επιτακτική τη συνέχιση του γενετικού ελέγχου αυτών ώστε να εντοπιστούν έγκαιρα πιθανές αλλαγές που θα μπορούσαν να αυξήσουν τη παθογενετική δράση του ιού και αυξήσουν τις δυσμενείς επιπτώσεις στη δημόσια υγεία.

Τα αποτελέσματα της μελέτης βρίσκονται υπό δημοσίευση στη σημαντική επιστημονική επιθεώρηση PLOS One:

Use of wild bird surveillance, human case data and GIS spatial analysis for predicting spatial distributions of West Nile virus in Greece.

George Valiakos, Konstantinos Papaspyropoulos, Alexios Giannakopoulos, Periklis Birtsas, Sotirios Tsiodras, Michael R. Hutchings, Vassiliki Spyrou, Danai Pervanidou, Labrini V. Athanasiou, Nikolaos Papadopoulos, Christos Hadjichristodoulou, Constantina Tsokana, Agoritsa Baka, Katerina Manolakou, Dimitrios Chatzopoulos, Marc Artois, Lisa Yon, Duncan Hannant, Liljana Petrovska, Charalambos Billinis

Συμπεράσματα επιτήρησης ιπποειδών

Ενεργητική επιτήρηση στα ιπποειδή λίμνης Κάρλας (2012-2013)

Η ανίχνευση των 13 οροθετικών αλόγων είναι δηλωτική προγενέστερης μόλυνσης των ζώων αυτών (προφανώς κατά το έτος 2011, όταν στην ίδια περιοχή είχαν εκδηλωθεί κλινικά κρούσματα του Πυρετού του Δυτικού Νείλου στον ανθρώπινο πληθυσμό της περιοχής, για τα οποία υπήρξε εργαστηριακή επιβεβαίωση). Μέχρι τη δική μας μελέτη, η παρουσία του ΙΔΝ στον πληθυσμό των ιπποειδών περιμετρικά της Κάρλας δεν είχε καταγραφεί από τις κτηνιατρικές υπηρεσίες του

Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, οπότε το εύρημα αυτό συνιστά πρώτη αναφορά.

Τα αποτελέσματα της ορολογικής μεθόδου ELISA έδειξαν ότι δεν εκδηλώθηκε ορομετατροπή με ανίχνευση αντισωμάτων IgM σε κανένα από τα επιτηρούμενα άλογα, (στοιχείο που θα αποτελούσε δηλωτικό υποκλινικής μόλυνσης μέσα στη συγκεκριμένη περίοδο επιτήρησης), οπότε δεν κατέστη δυνατή απομόνωση του ιού του ΔΝ από το αίμα των ζώων, αφού δεν υπήρξε καν φάση ιαιμίας (έστω και υποκλινικής).

Ενεργητική επιτήρηση στα ιπποειδή περιοχής Μαραθώνα (2013)

Τα αποτελέσματα της ορολογικής μεθόδου ELISA έδειξαν ότι δεν εκδηλώθηκε ορομετατροπή με ανίχνευση αντισωμάτων IgM σε κανένα από τα επιτηρούμενα άλογα, (στοιχείο που θα αποτελούσε δηλωτικό υποκλινικής μόλυνσης μέσα στη συγκεκριμένη περίοδο επιτήρησης), οπότε δεν κατέστη δυνατή απομόνωση του ιού του ΔΝ από το αίμα των ζώων, αφού δεν υπήρξε καν φάση ιαιμίας (έστω και υποκλινικής).

Βιβλιογραφία

- Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, et al. (2002) Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 8: 380-386.
- Castillo-Olivares J, Wood J (2004) West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 35: 467-483.
- Epp T, Waldner C, West K, Townsend H (2007) Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *Can Vet J* 48: 1137-1145.
- Hartemink NA, Davis SA, Reiter P, Hubalek Z, Heesterbeek JA (2007) Importance of bird-to-bird transmission for the establishment of West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 575-584.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, et al. (2003) Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 9: 311-322.
- Meece JK, Henkel JS, Glaser L, Reed KD (2003) Mosquito surveillance for West Nile virus in southeastern Wisconsin--2002. *Clin Med Res* 1: 37-42.
- Nielsen CF, Reisen WK, Armijos MV, Maclachlan NJ, Scott TW (2008) High subclinical West Nile virus incidence among nonvaccinated horses in northern California associated with low vector abundance and infection. *Am J Trop Med Hyg* 78:45-52.
- Reiter P (2010) West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill* 15(10):pii=19508.
- Sebastian MM, Stewart I, Williams NM, Poonacha KB, Sells SF, et al. (2008) Pathological, entomological, avian and meteorological investigation of a West Nile virus epidemic in a horse farm. *Transbound Emerg Dis* 55: 134-139.
- Venter M, Steyl J, Human S, Weyer J, Zaayman D, et al. (2010) Transmission of West Nile virus during horse autopsy. *Emerg Infect Dis* 16: 573-575.



Ward MP, Schuermann JA, Highfield LD, Murray KO (2006) Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet Microbiol* 118: 255-259.