



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

Παραδοτέο Π1.26

**Έκθεση αποτελεσμάτων σχετικά με τη μελέτη της παθογόνου
δράσης του ιού του Δυτικού Νείλου σε άγρια και οικόσιτα
πτηνά καθώς και σε ιπποειδή**

Υπεύθυνοι φορείς:

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Λάρισα, 2013



www.ygeia-pronoia.gr

Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης



www.epanad.gov.gr



www.espa.gr



Περιεχόμενα

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εισαγωγή	Σελ. 4
Μεθοδολογία	Σελ. 7
Αποτελέσματα	Σελ. 8
Συμπεράσματα Συζήτηση	Σελ. 12
Βιβλιογραφία	Σελ. 13

Εργαστήριο παθολογικής ανατομικής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εισαγωγή	Σελ. 16
Αποτελέσματα	Σελ. 20
Βιβλιογραφία	Σελ. 22





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

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



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



www.ygeia-pronoia.gr

Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης



www.epanad.gov.gr



www.espa.gr

Εισαγωγή

Η παθογόνος δράση του ιού του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ) έχει μελετηθεί τόσο σε άγρια πτηνά όσο και στα ιπποειδή, κατά τη διάρκεια διαφόρων εξάρσεων της νόσου παγκόσμια.

Η εισαγωγή του ιού του ΔΝ στη βόρεια Αμερική το 1999 συνοδεύτηκε από θνησιμότητα σε πολλά είδη πτηνών. Στις ΗΠΑ ένας μεγάλος αριθμός πτηνών (περισσότερα από 300 είδη) έχουν αναγνωριστεί ως ευαίσθητα στον ιό του ΔΝ, με μεγάλα ποσοστά θνητότητας (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/west-nile/birdspecies.htm>). Ο ιός του ΔΝ θεωρείται υπεύθυνος για τη μείωση του πληθυσμού των κορακοειδών στην Αμερική κατά 45% από την είσοδο του [1]. Μελέτες σε φυσικά μολυσμένα πτηνά, καθώς και πειραματική μόλυνση με το παθογόνο στέλεχος NY99 (σε κορακοειδή στην Αμερική), έχουν αποδείξει εκτεταμένη κατανομή του ιού στο ΚΝΣ και σε περιφερικά όργανα, καθώς και πολύ υψηλούς τίτλους ιαμίας, που σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνούσαν και τα 10^{10} PFU/ml. Από την τέταρτη ημέρα μετά την πειραματική μόλυνση με το στέλεχος NY99, τα κορακοειδή παρουσίασαν συμπτώματα, όπως κατάπτωση, ανορεξία, μειωμένη αφόδευση, αδυναμία να πετάξουν, διαταραχές στη βάδιση και αιμορραγίες από το στόμα και την κλοάκη. Ο θάνατος επέρχονταν σε περίπου 24 ώρες [2, 3]. Παρόμοια συμπτώματα παρουσιάστηκαν και σε άλλα είδη (σπουργίτια, σπίνιοι κτλ.) με μόνη διαφορά το χρόνο εμφάνισης των συμπτωμάτων (5-10 ημέρες μετά τη μόλυνση). Αντίθετα, υπήρξαν πολλά είδη πτηνών που δεν παρουσίασαν κανένα σύμπτωμα, και ιδιαίτερα είδη των τάξεων των Δρυοκολαπτόμορφων (δρυοκολάπτες), των Περιστερόμορφων (περιστέρια, δεκοχτούρες κτλ.) και των Χηνόμορφων (αγριόπαπιες, χήνες κτλ.), αποδεικνύοντας ότι η παθογόνος δράση του ιού του ΔΝ είναι διαφορετική και εξαρτάται εκτός από το στέλεχος του ιού και από το είδος του πτηνού.

Τα ευαίσθητα είδη πτηνών παρουσιάζουν μακροσκοπικές και μικροσκοπικές παθολογοανατομικές αλλοιώσεις, όπως συμφόρηση του εγκεφαλικού φλοιού, του σπλήνα (σε ορισμένες περιπτώσεις σπληνομεγαλία), της καρδιάς και των νεφρών,

στικτές αιμορραγίες στο στόμαχο, το ήπαρ και σε σκελετικούς μύες, διάταση της χοληδόχου κύστης, αδιαφανείς αεροφόρους σάκους. Ιστοπαθολογικά, παρατηρείται νέκρωση ηπατοκυττάρων με παρουσία κυτταροπλασματικών κενотоπίων, ρήξη του πυρήνα και έντονη παρουσία μονοπύρηνων φαγοκυττάρων. Η συμφύρση του σπλήνα συνοδεύεται από νέκρωση των λεμφοκυττάρων στα λεμφοειδή θυλάκια και αυξημένη παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων, και ιδιαίτερα μακροφάγων, σε όλο το σπληνικό παρέγχυμα. Οι μυϊκές ίνες παρουσιάζονται διογκωμένες με απώλεια της ράβδωσης και κατακερματισμό των σαρκομέριων, ενώ έχει παρατηρηθεί και νέκρωση του μυελού των οστών [4].

Ο ιός μπορεί να απομονωθεί από διάφορους ιστούς τόσο από πτηνά που εμφανίζουν συμπτώματα, όσο και από αυτά που δεν εμφανίζουν. Ο ιός έχει απομονωθεί από τον σπλήνα, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο, τη καρδιά, τους πνεύμονες και τη τραχεία σε διάφορα είδη πτηνών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχετικά εύκολη απομόνωσή του από δείγματα δέρματος και φτερών, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα μετάδοσής του στα κουνούπια, αλλά και η απομόνωσή του από τις ωοθήκες, υποδηλώνοντας πιθανή κάθετη μετάδοση [2].

Σε αντίθεση με τον Νέο Κόσμο, η θνησιμότητα των πτηνών στον Παλαιό Κόσμο φαίνεται να είναι περιορισμένη [5-7], αν και κατά την έξαρση κρουσμάτων στο Ισραήλ το 1997-2000 ένας μεγάλος αριθμός πελαργών και χηνών πέθαναν λόγω της μόλυνσής τους με στέλεχος του τύπου 1 του ιού [8]. Το 2003-2004 δύο διαφορετικά στελέχη του ιού του ΔΝ, τύπου 1 και 2, προκάλεσαν θανατηφόρο εγκεφαλίτιδα σε χήνες και γεράκια, αντίστοιχα, στην Ουγγαρία [9, 10]. Το 2008 ένα στέλεχος που ανήκε στο τύπο 2, γενετικά συγγενές με εκείνο της Ουγγαρίας, προκάλεσε το θάνατο σε έξι γεράκια στη νοτιοανατολική Αυστρία [11]. Από το 2001 έως το 2007 ο ιός του ΔΝ αναγνωρίστηκε ως το αίτιο θανάτου χρυσαετών (*Aquila chrysaetos*) και του ισπανικού αετού (*Aquila adalberti*) που παρουσίασαν νευρολογικά συμπτώματα στην Ισπανία. Μία πρόσφατη πειραματική μελέτη έδειξε τη κλινική ευαισθησία που εμφανίζουν οι ευρωπαϊκές πέρδικες στον ιό, παρουσιάζοντας μάλιστα αιμία μεγαλύτερη των 10^7 PFU/ml, ικανή να μεταδώσει τον ιό σε κουνούπι [12]. Αντίθετα, η πειραματική μόλυνση γερακιών (3/4 *Falco rusticolus* X 1/4 *Falco cherrug*) έδειξε



την ανθεκτικότητα των αρπακτικών. Τα γεράκια δεν εμφάνισαν συμπτώματα και η μέγιστη αιμία που παρουσίασαν ήταν της τάξης των $10^{3.8}$ PFU/ml, η οποία είναι ανεπαρκής για τη μετάδοση του ιού σε κουνούπι [13].

Γίνεται επομένως φανερό από τα έως τώρα δεδομένα, ότι παρατηρείται μεγάλη ποικιλομορφία στη παθογόνο δράση του ιού η οποία οφείλεται τόσο στο στέλεχος και τον τύπο του ιού, όσο και στο είδος του πτηνού. Επιπρόσθετα και μεταξύ πτηνών του ίδιου είδους μπορούν να παρατηρηθούν διαφορές στην παθογόνο δράση του ιού, οι οποίες πιθανότατα να σχετίζεται με το ιστορικό έκθεσής των πτηνών στον ιό και το επίπεδο ανοσίας το οποίο αναπτύχθηκε σε μία γεωγραφική περιοχή.



Μεθοδολογία

Η δειγματοληψία των άγριων πτηνών πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένες γεωγραφικές περιοχές. Τα δείγματα προέρχονταν 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. 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 καθορισμένες απαιτήσεις για τη μεταφορά του ιού σε μεγάλες αποστάσεις κατά τη μετανάστευσή τους, όντας σε αιμική φάση. Παράλληλα, έγινε ενημέρωση των μελών των κυνηγετικών ομοσπονδιών για τα συμπτώματα από το νευρικό σύστημα, τα οποία δύναται να παρατηρηθούν σε πτηνά που νοσούν από τον ιό του ΔΝ και τους ζητήθηκε να αναφερθεί η οποιαδήποτε παρουσία συμβατής κλινικής εικόνας αλλά και να επιδιωχθεί η συλλογή δειγμάτων από τέτοια περιστατικά.

Για τη μελέτη της παθογόνου δράσης του ιού του ΔΝ σε πτηνά, εφαρμόστηκε η ακόλουθη διαδικασία από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας:

Από κάθε πτηνό το οποίο παραλήφθηκε από το εργαστήριο εντός του πρώτου 24ώρου από τη συλλογή του, λήφθηκαν τμήματα 50-100 mg από εγκέφαλο, πνεύμονα, καρδιά, ήπαρ, σπλήνα και νεφρό. Μέρος των παραπάνω ιστών χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός μείγματος ιστών για την ανίχνευση του ιού του ΔΝ με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Οι υπόλοιποι ιστοί διατηρήθηκαν χωριστά, ώστε να υπάρξει δυνατότητα διερεύνησης της παρουσίας του ιού σε κάθε ιστό χωριστά. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι σε πολλά πτηνά ιδιαίτερα των εδώδιμων ειδών, δεν υπήρξε διαθεσιμότητα όλων των ιστών, καθώς στο εργαστήριο στάλθηκαν συγκεκριμένοι ιστοί. Αντίθετα στα μη εδώδιμα πτηνά (π.χ. κορακοειδή) στη πλειονότητα των περιπτώσεων ήταν διαθέσιμο όλο το σώμα του πτηνού, καθιστώντας δυνατή τη συλλογή και των 6 διαφορετικών ιστών.

Αποτελέσματα

Κατά τη πορεία του προγράμματος, από συνολικά 332 πτηνά, συλλέχθηκαν τα ακόλουθα δείγματα ιστών για την ανίχνευση του ιού του ΔΝ.

Όργανο	Ήπαρ	Καρδιά	Εγκέφαλος	Πνεύμονας	Σπλήνας	Νεφροί
N	287	264	253	240	234	206

Τα ακόλουθα 39 πτηνά ανευρέθηκαν θετικά (μοριακά σε μείγμα ιστών ή/και ορολογικά) κατά τη πορεία του προγράμματος:

Είδος	Περιοχή	Ημ. Δειγματοληψίας
Κουρούνα (<i>Corvus cornix</i>)	Γαλλικός ποταμός	Α' Εξάμηνο 2012
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
Σπυργίτι (<i>Passer domesticus</i>)	Αθήνα	Β' Εξάμηνο 2013
Σταυλοχελίδονο (<i>Hirundo rustica</i>)	Αταλάντη	Β' Εξάμηνο 2013
Κότσυφας (<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
Κότσυφας	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Κότσυφας	Ξάνθη	Β' Εξάμηνο 2012
Χωραφοσπούργιτο	Καρδίτσα	Β' Εξάμηνο 2013

Καρακάξα (<i>Pica pica</i>)	Τρίλοφος	Β' Εξάμηνο 2013
ΣΥΝΟΛΟ	39	

Κανένα περιστατικό άγριου πτηνού που να εμφάνιζε νευρικά συμπτώματα δεν αναφέρθηκε από τα μέλη των κυνηγετικών Ομοσπονδιών. Επίσης δεν αναφέρθηκε αυξημένο ποσοστό νεκρών πτηνών, καθώς και αλλαγές που να αφορούσαν την πυκνότητα των πληθυσμών των εντοπιζόμενων πτηνών. Το γεγονός αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τη τυπική εικόνα προσβολής των άγριων πτηνών στην Αμερική από ιό τύπου 1, που συνοδεύτηκε από μαζικούς θανάτους πτηνών με χαρακτηριστική συμπτωματολογία από το ΚΝΣ.

Από τα 39 πτηνά που ανευρέθηκαν θετικά (μοριακά σε μείγμα ιστών η/και ορολογικά), πραγματοποιήθηκε προσπάθεια ανίχνευσης του ιού στους ιστούς χωριστά, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, ώστε να διαπιστωθούν οι ιστοί εκλογής του συγκεκριμένου τύπου του ιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία του ιού μόνο στο νεφρό σε 10 πτηνά, μόνο στο ήπαρ σε 8 πτηνά, στο νεφρό και στο ήπαρ σε 4 πτηνά, στο νεφρό και στον σπλήνα σε 4 πτηνά και μόνο στον σπλήνα σε 4 πτηνά. Η απουσία ανίχνευσης του ιού στο ΚΝΣ, επιβεβαίωσε την παρατήρηση των μελών των κυνηγετικών ομοσπονδιών για απουσία εμφάνισης νευρικών συμπτωμάτων στα άγρια πτηνά.

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η απουσία αναφοράς άγριων πτηνών με νευρικά συμπτώματα καθώς και ανεύρεσης νεκρών άγριων πτηνών επιβεβαιώνει την άποψη της μικρής σχετικά παθογόνου δράσης των ιών ΔΝ του τύπου 2 σε άγρια πτηνά του Παλαιού Κόσμου. Η μικρή παθογόνος δράση μπορεί να οφείλεται, σε μια επίκτητη ανοσία η οποία αναπτύχθηκε κατά την έκθεσή των πτηνών της Ευρωπαϊκής Ηπείρου σε διάφορους φλαβιούς, μέσα στους αιώνες. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι βιβλιογραφικές αναφορές που εμφανίζουν υψηλή παθογόνο δράση του ιού τύπου 2, περιορίζεται σε λιγοστά πτηνά της τάξης Falconiformes στη κεντρική Ευρώπη και σε μία περίπτωση δεκαοχτούρας στην Ιταλία [14 – 16]. Επομένως, είναι πιθανό ότι τα περισσότερα είδη πτηνών ανταποκρίνονται έγκαιρα και έντονα στη μόλυνση οδηγώντας στη γρήγορη εκκαθάριση του ιού από τον οργανισμό, προτού δημιουργήσει αλλοιώσεις και προκαλέσει νόσο. Σε αυτό συνηγορεί και ο εντοπισμός του ιικού γενώματος κατά κύριο λόγο στο νεφρικό ιστό, προφανώς κατά το στάδιο απομάκρυνσης του ιού από τον οργανισμό.

Βέβαια θα πρέπει να τονιστεί, ότι η μη παρουσία συμπτωμάτων σε ένα μολυσμένο πτηνό δε μειώνει τον επιδημιολογικό ρόλο του στη μετάδοση του ιού, αφού τα πρώτα 24ωρα της μόλυνσης η αύξηση του αριθμού των ιικών σωματιδίων του ιού (στάδιο της αιμίας) μπορεί να οδηγήσει στη περαιτέρω μετάδοση του ιού μέσω νυγμάτων κουνουπιών. Απαιτείται η πειραματική μόλυνση του κάθε είδους πτηνού και η μελέτη του αναπτυσσόμενου τίτλου του ιού, για την εξαγωγή βέβαιων και ασφαλών συμπερασμάτων. Εναλλακτικά, απαιτείται η επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν περισσότερα είδη πτηνών και μεγαλύτερο αριθμό εξεταζόμενων δειγμάτων, έτσι ώστε να μελετηθεί η παθογόνος δράση του ιού στα διάφορα είδη πτηνών της άγριας πανίδας. Τέλος, θα πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι ανά πάσα στιγμή, μέσα από κάποια μετάλλαξη του γενετικού υλικού του ιού να προκύψει αλλαγή της παθογενετικότητας του. Γι' αυτό και απαιτείται η διαρκής παρακολούθηση της παθογόνου δράσης του ιού σε διάφορα είδη ζώων, παράλληλα με τη δράση του στον άνθρωπο.

Βιβλιογραφία

1. LaDeau SL, Kilpatrick AM, Marra PP. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature*. 2007;447(7145):710-713
2. Komar N, Langevin S, Hinten S, et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2003;9(3):311-322
3. Weingartl HM, Neufeld JL, Copps J, et al. Experimental West Nile Virus Infection in Blue Jays (*Cyanocitta cristata*) and Crows (*Corvus brachyrhynchos*). *Veterinary Pathology*. 2004;41(4):362-370
4. Wunschmann A, Shivers J, Carroll L, et al. Pathological and immunohistochemical findings in American crows (*Corvus brachyrhynchos*) naturally infected with West Nile virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2004;16(4):329-333
5. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, et al. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;27(5):343-355
6. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;23(3):147-156
7. Jourdain E, Schuffenecker I, Korimbocus J, et al. West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2007;7(3):448-452
8. Malkinson M, Banet C. The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2002;267:309-322

9. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2006;12(4):618-623
10. Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, et al. Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2007;7(2):181-188
11. Wodak E, Richter S, Bago Z, et al. Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Veterinary Microbiology*. 2011;149(3-4):358-366
12. Sotelo E, Gutierrez-Guzman AV, Del Amo J, et al. Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. *Veterinary Research*. 2011;42(1):11
13. Busquets N, Bertran K, Costa TP, et al. Experimental west nile virus infection in gyr-saker hybrid falcons. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2012;12(6):482-489
14. Savini G, Capelli G, Monaco F, Polci A, Russo F, Di Gennaro A, Marini V, Teodori L, Montarsi F, Pinoni C, Piscicella M, Terregino C, Marangon S, Capua I, Lelli R. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet Microbiol*. 2012;44:267–273. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.018.
15. Wodak E, Richter S, Bago Z, Revilla-Fernandez S, Weissenboeck H, Nowotny N, Winter P. Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet Microbiol*. 2011;44:358–366. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.12.012.
16. Department for Environment Food and Rural Affairs (Defra) [<http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/monitoring/documents/wnv-austria.pdf>] [PubMed]



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



Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



www.ygeia-pronoia.gr

Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης



www.epanad.gov.gr



www.espa.gr

Εισαγωγή

Ο παθογενετικός μηχανισμός της νόσου του ιού του Δυτικού Νείλου (ΔΝ) στα υποειδή δεν έχει καταστεί ακόμη πλήρως κατανοητός [1, 2]. Η μόλυνση ενός αλόγου ξεκινά μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού στο δέρμα μέσω νύγματος μολυσμένου κουνουπιού. Όπως έχουν δείξει μελέτες σε ποντίκια, τα κύτταρα Langerhans του δέρματος μεταφέρουν τον ιό του ΔΝ στους επιχώριους λεμφαδένες, όπου πολλαπλασιάζεται και διαμέσω των λεμφαγγείων εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος προκαλώντας αιμία με χαμηλό τίτλο ιού. Στη φάση αυτή ο ιός μπορεί να μολύνει αρχικά εξωνευρικούς ιστούς και τελικά αποικίζει επιλεκτικά το νευρικό σύστημα [2].

Ο τρόπος εισόδου του ιού του ΔΝ στις δομές του νευρικού συστήματος των αλόγων δεν έχει αποσαφηνισθεί. Η είσοδος πιθανόν να γίνεται αιματογενώς και μπορεί να περιλαμβάνει την παθητική διάχυση του ιού διαμέσω του ενδοθηλίου των τριχοειδών αγγείων ή τον πολλαπλασιασμό του ιού στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την επέκταση στο παρέγχυμα του κεντρικού νευρικού συστήματος [1, 2]. Εναλλακτικά, η είσοδος του ιού στο κεντρικό νευρικό σύστημα μπορεί να επιτυγχάνεται με οπισθοαξονική μεταφορά του ιού από τους μολυσμένους νευρώνες του οσφρητικού επιθηλίου. Ο χαμηλός τίτλος του ιού και η σύντομη διάρκεια της αιμίας στα άλογα (σε αντίθεση με τα πτηνά), σε συνδυασμό με την αποτυχία ανίχνευσης του ιού του ΔΝ στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων καθιστούν λιγότερο πιθανούς για τα άλογα τους δύο πρώτους τρόπους εισόδου στις δομές του νευρικού συστήματος [2 - 4].

Ανάλογα δυσδιάκριτος είναι και ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλούνται οι βλάβες στις δομές του νευρικού συστήματος των υποειδών μετά την είσοδο του ιού του ΔΝ. Σε πειραματικό μοντέλο λοίμωξης από ιό του ΔΝ σε κρικητούς (χάμστερ) παρατηρήθηκε ότι πολλοί νευρώνες υφίστανται εκφύλιση και κυτταρικό θάνατο, χωρίς αυτό το φαινόμενο να συνοδεύεται με συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οπότε προτάθηκε ότι οι βλάβες στους νευρώνες είναι αποτέλεσμα του αποικισμού τους από τον ιό του ΔΝ. Σε αντίθεση με τον παραπάνω μηχανισμό, προτάθηκε ότι οι βλάβες στο νευρικό σύστημα των αλόγων σε φυσικά

περιστατικά Πυρετού του ΔΝ έχουν ανοσοπαθολογοανατομικό υπόβαθρο, υπόθεση που ενισχύεται από την παρουσία φλεγμονωδών αλλοιώσεων ακόμη και σε περίπτωση μη ανιχνεύσιμων αντιγόνων του ιού *in situ* σε δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος, παρόλο που τα άλογα αναπτύσσουν κλινικά συμπτώματα και ανιχνεύονται αντισώματα έναντι του ιού του ΔΝ στην αιματική κυκλοφορία [2, 4].

Κατά κανόνα στα περισσότερα περιστατικά των αλόγων που καταλήγουν από τη νόσο ή στα οποία γίνεται ευθανασία για λόγους ευζωίας δεν παρατηρούνται πρωτογενείς μακροσκοπικές αλλοιώσεις στις ανατομικές δομές του νευρικού συστήματος [1, 4, 5]. Σε μεμονωμένα περιστατικά έχει αναφερθεί η παρουσία πετεχειών και εστιών μαλάκυνσης με διάσπαρτη κατανομή σε ολόκληρο το ρομβοειδή εγκέφαλο, που επεκτείνονται πολυεστιακά σε ολόκληρο το νωτιαίο μυελό. Οι πετέχειες ήταν ιδιαίτερα εμφανείς στο θάλαμο, τη γέφυρα και τον προμήκη μυελό, καθώς και στα κοιλιακά κέρατα του νωτιαίου μυελού [4, 6]. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι εξαιτίας της παρατεταμένης κατάκλισης και άλλων επιπλοκών είναι δυνατό να ανευρεθούν στα άλογα, που κατέληξαν με φυσικό τρόπο ή μετά από ευθανασία, ποικίλες αλλοιώσεις στα εσωτερικά όργανα και τους σκελετικούς μυς, οι οποίες ως αποτέλεσμα των δευτερογενών επιπλοκών δεν έχουν διαγνωστική αξία για τον Πυρετό του ΔΝ [7].

Οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις που χαρακτηρίζουν τον Πυρετό του ΔΝ στα άλογα εντοπίζονται αποκλειστικά στο ΚΝΣ [1]. Η σοβαρότητα των αλλοιώσεων ποικίλει μεταξύ των διάφορων περιστατικών κάθε φορά που ξεσπά επιζωοτία του νοσήματος, χωρίς να είναι πάντοτε ευθέως ανάλογη με τη σοβαρότητα των κλινικών συμπτωμάτων. Επιπλέον, άλογα που έχουν υποστεί προγενέστερο εμβολιασμό και παρόλα αυτά εμφανίζουν ήπια κλινική νόσο αναπτύσσουν πολύ ήπιες και περιορισμένες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις [1, 8].

Οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις του Πυρετού του ΔΝ στα άλογα αφορούν κυρίως το στέλεχος του εγκεφάλου και τη θωρακοσφυική μοίρα του νωτιαίου μυελού με εκτεταμένη εντόπιση κυρίως στη φαιά ουσία και λιγότερο στη λευκή ουσία. Κύρια ιστοπαθολογικά ευρήματα είναι η ελαφρά έως μέτρια μη πυώδης εγκεφαλομυελίτιδα που συνοδεύεται από γλοίωση. Μικροσκοπικές αλλοιώσεις σε εξωνευρικούς ιστούς

είναι εξαιρετικά σπάνιο να ανευρεθούν στα άλογα, σε αντίθεση με τα πτηνά, όπου εντοπίζονται σε πολλά εσωτερικά όργανα [4, 5].

Πιο αναλυτικά, οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εντοπίζονται στους πυρήνες του τελικού εγκεφάλου (βασικά γάγγλια), στη φαιά ουσία του θαλάμου, στο μεσεγκέφαλο, στη γέφυρα και τον προμήκη μυελό, καθώς και στα κοιλιακά και πλάγια κέρατα του νωτιαίου μυελού (κυρίως στη θωρακική και οσφυϊκή χώρα). Σε λίγα περιστατικά είναι δυνατό να ανευρεθούν αλλοιώσεις στο φλοιό των ημισφαιρίων και ακόμη σπανιότερα στο φλοιό της παρεγκεφαλίδας [1, 4, 15, 8, 9]. Κύριο ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό είναι η πολυεστιακή, ήπια έως σοβαρή περιαγγειακή συσσώρευση λεμφοκυττάρων και λίγων μακροφάγων, καθώς και γλοίωση του γειτονικού νευροπιλήματος με ήπια διήθηση λεμφοκυττάρων [4, 5, 8 - 10]. Στις πιο σοβαρά προσβεβλημένες περιοχές είναι εμφανής η εκφύλιση των νευρώνων, η οποία χαρακτηρίζεται από χρωματόλυση, κυτταροπλασματική διόγκωση ή συρρίκνωση των κυττάρων. Επίσης, είναι δυνατό να παρατηρηθούν μικρά, διάσπαρτα οζίδια μικρογλοίας, περιστασιακή νευρωνοφαγία και παρουσία περιορισμένων νεκρωτικών περιοχών αποτελούμενων από ουδετερόφιλα, μακροφάγα και κυτταρικά ράκη. Συχνή είναι και η εξοίδηση των νευραξόνων, συνοδευόμενη από το σχηματισμό σφαιροειδών.

Τέλος, σε ορισμένα σοβαρά περιστατικά συνυπάρχει ήπια έως σοβαρή περιαγγειακή αιμορραγία με εκφυλιστικές αλλοιώσεις, κατά τόπους νέκρωση στο τοίχωμα των αγγείων και παρουσία μικρού αριθμού ουδετερόφιλων. Περιστασιακά, παρατηρείται ήπια λεπτομηνιγγίτιδα που μπορεί να επεκταθεί ως ήπια εστιακή φλεγμονή στις υποκείμενες περιοχές των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και της παρεγκεφαλίδας [1, 4, 5].

Η εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων σε ιστούς από το νευρικό σύστημα για την ανεύρεση της εντόπισης και της κατανομής των αντιγόνων του ιού του ΔΝ, αλλά και για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό του ανοσοφαινότυπου του φλεγμονώδους διηθήματος αποκάλυψε αξιόλογα χαρακτηριστικά ευρήματα στα άλογα [4].

Στις περιοχές με ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, τα αντιγόνα του ιού εντοπίζονται κυρίως στη φαιά ουσία. Φαίνονται ως μικρά κοκκία μέσα στο κυτταρόπλασμα των



νευρώνων που έχουν υποστεί εκφύλιση, αλλά και σε λίγους μορφολογικά φυσιολογικούς νευρώνες. Τα αντιγόνα του ιού είναι επίσης παρόντα σε μεγάλο αριθμό μορφολογικά φυσιολογικών νευραξόνων και εκφυτικών κώνων, σε νευρογλοιακά κύτταρα και σε σφαιροειδή στον προμήκη μυελό και το νωτιαίο μυελό. Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν έχουν ανιχνευθεί αντιγόνα του ιού σε δομές του περιφερικού νευρικού συστήματος, καθώς και σε εξωνευρικούς ιστούς ασθενών αλόγων, χαρακτηριστικό που έρχεται σε άμεση αντίθεση με τα δεδομένα που έχουν προκύψει από ανάλογες μελέτες στα πτηνά.

Η περιαγγειακή και λεπτομηνιγγική φλεγμονώδης διήθηση στο ΚΝΣ των αλόγων αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από T-λεμφοκύτταρα (CD3+) με εξαίρεση μεμονωμένα περιστατικά όπου κυριαρχούν τα μακροφάγα (MAC387+), ορισμένα από τα οποία φέρουν ενδοκυτταρικά αντιγόνα του ιού του ΔΝ. Αντιθέτως, στο φλεγμονώδες διήθημα δεν εντοπίζονται Β-λεμφοκύτταρα (BLA36) [4].



Αποτελέσματα

Α) ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΣΤΑ ΙΠΠΟΕΙΔΗ ΛΙΜΝΗΣ ΚΑΡΛΑΣ (2012-2013).

Στο πλαίσιο της ενεργητικής επιτήρησης στον πληθυσμό των ιπποειδών περιμετρικά της Λίμνης Κάρλας για ανεύρεση περιστατικού ασθενούς αλόγου με νευρολογικά συμπτώματα /θάνατο, ώστε να πραγματοποιηθεί νεκροψία, λήψη ιστών, ιστοπαθολογική και ειδική ανοσοϊστοχημική εξέταση για παρουσία του ιού του ΔΝ και μελέτη της παθογένειας του νοσήματος, **δεν παρατηρήθηκε κανένα κλινικό κρούσμα της νόσου.**

Β) ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΣΤΑ ΙΠΠΟΕΙΔΗ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΜΑΡΑΘΩΝΑ (2013).

Στο πλαίσιο της ενεργητικής επιτήρησης στον επιλεγμένο πληθυσμό ιπποειδών περιοχής Μαραθώνα για ανεύρεση περιστατικού ασθενούς αλόγου με νευρολογικά συμπτώματα /θάνατο, ώστε να πραγματοποιηθεί νεκροψία, λήψη ιστών, ιστοπαθολογική και ειδική ανοσοϊστοχημική εξέταση για παρουσία του ιού του ΔΝ και μελέτη της παθογένειας του νοσήματος, **δεν παρατηρήθηκε κανένα κλινικό κρούσμα της νόσου.**

Γ) ΠΑΘΗΤΙΚΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΣΤΑ ΙΠΠΟΕΙΔΗ ΤΗΣ ΗΠΕΙΡΩΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (2012 -2013).

Στο πλαίσιο της παθητικής επιτήρησης (σε συνεργασία με τις κατά τόπους κτηνιατρικές αρχές και κτηνιατρικά εργαστήρια του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων) στον πληθυσμό των ιπποειδών της ηπειρωτικής Ελλάδας για ανεύρεση περιστατικού ασθενούς αλόγου με νευρολογικά συμπτώματα /θάνατο, ώστε να πραγματοποιηθεί επίσκεψη στην περιοχή του περιστατικού και νεκροψία επιτόπου, λήψη ιστών, ιστοπαθολογική και ειδική ανοσοϊστοχημική εξέταση για



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



παρουσία του ιού του ΔΝ και μελέτη της παθογένειας του νοσήματος, **δεν υπήρξε καμία ενημέρωση – ειδοποίηση για ανεύρεση κλινικού κρούσματος από τους φορείς του ΥΠΑΑΤ.**



www.ygeia-pronoia.gr

Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης



www.epanad.gov.gr



www.espa.gr

Βιβλιογραφία

1. Grant Maxie M, Youssef S. Nervous system. In: Grant Maxie M, ed. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5th ed. Edinburgh, UK: Saunders Elsevier; 2007
2. Castillo-Olivares J, Wood J. West Nile virus infection of horses. Veterinary Research. 2004;35(4):467-483
3. Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, et al. Experimental infection of horses with West Nile virus. Emerging Infectious Diseases. 2002;8(4):380-386
4. Cantile C, Del Piero F, Di Guardo G, et al. Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses. Veterinary Pathology. 2001;38(4):414-421
5. Cantile C, Di Guardo G, Eleni C, et al. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. Equine Veterinary Journal. 2000;32(1):31-35
6. Steinman A, Banet C, Sutton GA, et al. Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000. Veterinary Record. 2002;151(2):47-49
7. Venter M, Steyl J, Human S, et al. Transmission of West Nile virus during horse autopsy. Emerging Infectious Diseases. 2010;16(3):573-575
8. Bourgeois MA, Denslow ND, Seino KS, et al. Gene expression analysis in the thalamus and cerebrum of horses experimentally infected with West Nile virus. PLoS One. 2011;6(10):e24371
9. Sebastian MM, Stewart I, Williams NM, et al. Pathological, entomological, avian and meteorological investigation of a West Nile virus epidemic in a horse farm. Transboundary and Emerging Diseases. 2008;55(2):134-139
10. Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, et al. Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2011;25(3):586-591