



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 Π1.27

**Έκθεση αποτελεσμάτων σχετικά με τη μελέτη ορομετατροπής
οικόσιτων πτηνών**

Υπεύθυνος φορέας:

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Λάρισα, 2013



Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης





Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	3
Μεθοδολογία	5
Αποτελέσματα.....	7
Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	9
Βιβλιογραφία.....	12

Εισαγωγή

Έπειτα από την έναρξη των επιδημιών από τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV) στις ΗΠΑ, αναπτύχθηκαν διάφορα συστήματα επιτήρησης του ιού, τα οποία περιλαμβάνουν δειγματοληψίες πτηνών, κουνουπιών και διαφόρων θηλαστικών εκτός του ανθρώπου, στοχεύοντας στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την πρόβλεψη και την πρόληψη της λοίμωξης των ανθρώπων και των κατοικίδιων ζώων [1]. Παρόμοια συστήματα επιτήρησης αρμοϊών έχουν χρησιμοποιηθεί σποραδικά στην Ευρώπη, αλλά δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για την αξία τους ως δείκτες έγκαιρης προειδοποίησης για τη λοίμωξη [2-4]. Τέτοιου είδους συστήματα επιτήρησης αρμοϊών ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την καλύτερη εκτίμηση του κινδύνου για τη δημόσια υγεία, καθώς και για την ορθή καθοδήγηση όσον αφορά στην εφαρμογή πρακτικών καταπολέμησης των κουνουπιών.

Από την έναρξη της επιδημίας στην Ελλάδα το καλοκαίρι του 2010 μέχρι και σήμερα, αναπτύσσονται από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του ΑΠΘ, συστήματα για την επιτήρηση της διασποράς του WNV κυρίως στην κεντρική Μακεδονία, αλλά δευτερευόντως και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας. Τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν ενεργητική επιτήρηση της διασποράς του ιού, χρησιμοποιώντας οικόσιτα πτηνά, και συγκεκριμένα, περιστέρια και όρνιθες.

Ειδικότερα, το 2011, διενεργήθηκε ορολογική μελέτη σε ορνίθια-δείκτες (sentinels) σε κλωβούς, στο Νομό Θεσσαλονίκης με στόχο τη διαπίστωση της ενζωτικής μετάδοσης του WNV, καθώς και την άμεση λήψη μέτρων σε τοπικό επίπεδο, περιορίζοντας το κόστος και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της αντιμετώπισης πιθανής επιδημίας. Με την εφαρμογή του παραπάνω συστήματος, ήταν εφικτή η ανίχνευση ορομετατροπών σε ορνίθια περίπου ένα μήνα πριν την εμφάνιση του πρώτου ανθρώπινου κρούσματος στην περιοχή της μελέτης [5-6]. Η

αξιολόγηση των ορνιθίων σε κλωβούς επαναλήφθηκε και κατά τη διάρκεια της επιδημικής περιόδου του 2012 [7].

Η εφαρμογή του παραπάνω συστήματος, αν και προσδίδει τη δυνατότητα επαναλαμβανόμενων δειγματοληψιών, με στόχο όχι μόνο τη μελέτη της διασποράς του ιού ορολογικά, αλλά και την ανίχνευση, την απομόνωση και το μοριακό χαρακτηρισμό του ιού, είναι δαπανηρή καθώς προϋποθέτει έξοδα προμήθειας, στέγασης και διατροφής των πτηνών. Ως εκ τούτου, σε μια προσπάθεια περιορισμού του κόστους επιτήρησης, αξιολογήθηκαν συστήματα έγκαιρης προειδοποίησης τα οποία περιλάμβαναν περιστέρια, καθώς και ορνίθια ελευθέρως διαβίωσης. Τα συστήματα αυτά είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί με στόχο την ανίχνευση της διασποράς του WNV μετά το πέρας της επιδημίας του 2010 (περιστέρια) και του 2011 (περιστέρια, ορνίθια), στην Κεντρική Μακεδονία. Επιλέον, πριν από την έναρξη της επιδημίας του 2011 εξετάστηκαν νεαρά (κάτω των 5 μηνών) περιστέρια και ορνίθια, ως προς τη δυνατότητά τους να παρέχουν πληροφορίες για τη διασπορά του WNV πριν από την έναρξη των κρουσμάτων σε ανθρώπους, με ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

Ως εκ τούτου, κατά τα έτη 2012-2013, συνεχίστηκε η εφαρμογή και η αξιολόγηση των παραπάνω συστημάτων επιτήρησης στην Κεντρική Μακεδονία, στοχεύοντας στην έγκαιρη προειδοποίηση, την ενημέρωση των εμπλεκόμενων κτηνιατρικών και ιατρικών αρχών για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Ειδικότερα, η έρευνα το 2012 αφορούσε στη μελέτη ορομετατροπής περιστεριών, ενώ το 2012 η έρευνα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ορνιθίων ελευθέρως διαβίωσης.

Μεθοδολογία

A) Πρώιμη διαπίστωση διασποράς του WNV με χρήση οικόσιτων περιστερών (2012)

Κατά το διάστημα 07 Ιουνίου – 09 Ιουλίου 2012, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία αίματος από 240 περιστέρια (ηλικίας 1-6 μηνών) σε 48 περιστέρωνες σε περιοχές των Περιφερειακών Ενοτήτων (Π.Ε.) Πέλλας, Ημαθίας, Κιλκίς και Θεσσαλονίκης. Η μελέτη έγινε με στόχο την πρώιμη διαπίστωση πιθανής διασποράς του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV) το 2012.

B) Πρώιμη διαπίστωση διασποράς του WNV με χρήση ορνιθίων ελευθέρως διαβίωσης (2013)

Κατά το διάστημα 13-28 Ιουνίου 2013, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ορού αίματος από 205 ορνίθια ελευθέρως διαβίωσης (ηλικίας 2-5 μηνών) σε 41 ορνιθώνες σε περιοχές των Περιφερειακών Ενοτήτων (Π.Ε.) Πέλλας, Ημαθίας, Κιλκίς και Θεσσαλονίκης. Η μελέτη έγινε με στόχο την πρώιμη διαπίστωση πιθανής διασποράς του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV) κατά το 2013.

Τα κριτήρια για την έναρξη των δειγματοληψιών στα ορνίθια ήταν τα εξής: α) η μέση ημερήσια θερμοκρασία περιβάλλοντος για χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων πριν την έναρξη των αιμοληψιών θα έπρεπε να κυμαίνεται μεταξύ 18.6 °C και 21.2 °C και β) θα έπρεπε να συλλέγονται πάνω από 200 ενήλικα άτομα κουνουπιών *Culex spp.* ανά νύχτα, με τη χρήση παγίδων διοξειδίου του άνθρακα. Η καταμέτρηση του πληθυσμού γινόταν σε ζώνες ακτίνας 5 χιλιομέτρων γύρω από τους περιστέρωνες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Εργαστηριακές εξετάσεις

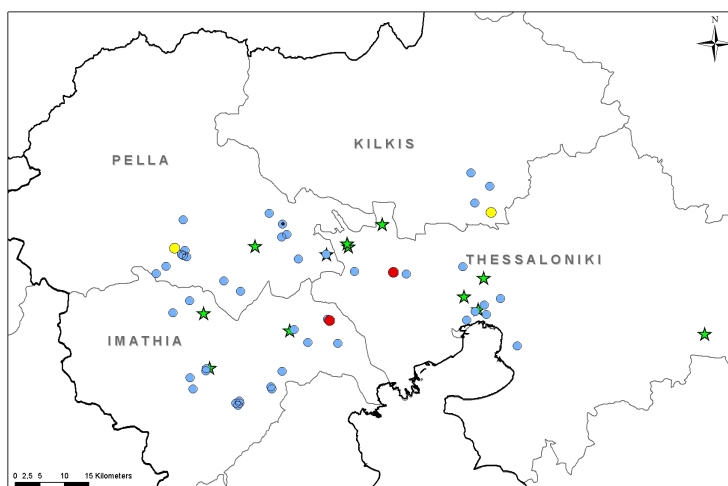
Τα δείγματα ορού αίματος που συλλέχθηκαν από τα περιστέρια και τα ορνίθια εξετάστηκαν με ανταγωνιστική ELISA (ID Screen West Nile Competition, IDVet, France) για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι του WNV. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με εφαρμογή της ανταγωνιστικής ELISA, επιβεβαιώθηκαν με δοκιμές οροεξουδετέρωσης.

Επιπλέον, επιχειρήθηκε ανίχνευση του WNV στα δείγματα ορού αίματος που συλλέχθηκαν από τα περιστέρια και τα ορνίθια, εφαρμόζοντας τη μέθοδο real-time RT-PCR.

Αποτελέσματα

Α) Πρώιμη διαπίστωση διασποράς του WNV με χρήση οικόσιτων περιστεριών (2012)

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για το 2012 κατέδειξαν την παρουσία συνολικά δώδεκα (12) οροθετικών περιστεριών: στο Πλατύ της Π.Ε. Ημαθίας (4 οροθετικά πτηνά, ημερομηνία δειγματοληψίας: 13/06/2012), στη Σκύδρα της Π.Ε. Πέλλας (2 οροθετικά πτηνά, ημερομηνία δειγματοληψίας: 20/06/2012) και στη Νέα Σάντα της Π.Ε. Κιλκίς (2 οροθετικά πτηνά, ημερομηνία δειγματοληψίας: 07/06/2012), καθώς και στη Γέφυρα της Π.Ε. Θεσσαλονίκης (4 οροθετικά πτηνά, ημερομηνία δειγματοληψίας: 22/06/2012). Η γεωγραφική κατανομή των περιστερώνων, καθώς και οι περιστερώνες όπου σημειώθηκαν ορομετατροπές φαίνονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Περιστερώνες που συμπεριλήφθηκαν στη δειγματοληψία του 2012. Η κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα περιστερώνα. Μπλέ: 0/5 οροθετικά πτηνά ανά περιστερώνα. κίτρινο: 1/5 – 2/5 οροθετικά πτηνά ανά περιστερώνα. κόκκινο: 3/5 – 5/5 οροθετικά πτηνά ανά περιστερώνα. Με αστέρι σημειώνονται τα ανθρώπινα περιστατικά νευροδισδυτικής νόσου οφειλόμενης σε προσβολή από WNV.

B) Πρώιμη διαπίστωση διασποράς του WNV με χρήση ορνιθίων ελευθέρως διαβίωσης (2013)

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για το 2013 κατέδειξαν την παρουσία συνολικά οκτώ (8) οροθετικών ορνιθίων: στην Αγ. Μαρίνα της Π.Ε. Ημαθίας (2 οροθετικά πτηνά, ημερομηνία δειγματοληψίας: 14/06/2013), στο Σταυρό της Π.Ε. Ημαθίας (1 οροθετικό πτηνό, ημερομηνία δειγματοληψίας: 14/06/2013) στη Μελίκη της Π.Ε. Ημαθίας (1 οροθετικό πτηνό, ημερομηνία δειγματοληψίας: 17/06/2013), στην Επισκοπή της Π.Ε. Ημαθίας (1 οροθετικό πτηνό, ημερομηνία δειγματοληψίας: 28/6/2013), στην Πατρίδα της Π.Ε. Ημαθίας (2 οροθετικά πτηνά, ημερομηνία δειγματοληψίας: 28/6/2013), καθώς και στη Σκύδρα της Π.Ε. Πέλλας (1 οροθετικό πτηνό, ημερομηνία δειγματοληψίας: 28/06/2013).

Η ειδικότητα των αντισωμάτων στο σύνολο των 20 θετικών ορών (12 και 8) επιβεβαιώθηκε με τις δοκιμές της οροεξουδετέρωσης. Δυστυχώς, τα αποτελέσματα μοριακής ανίχνευσης & ταυτοποίησης του ιού ήταν αρνητικά, πιθανότατα διότι κατά την αιμοληψία είχε παρέλθει το στάδιο της αιμίας στα πτηνά.

Τα παραπάνω αποτελέσματα κοινοποιήθηκαν άμεσα στις αρμόδιες αρχές (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων), ούτως ώστε να βρίσκονται σε επαγρύπνηση για τη λήψη όλων των απαραίτητων μέτρων για την πρόληψη και την αντιμετώπιση ενδεχόμενης νόσου στον άνθρωπο, καθώς και στους ίππους.

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Τα περιστέρια και τα ορνίθια ελευθέρως διαβίωσης αποτελούν αξιόπιστα και χαμηλού κόστους συστήματα έγκαιρης ανίχνευσης της ενζωτικής μετάδοσης του ιού. Ειδικότερα, με τη χρήση των περιστεριών, το 2012, κατέστη δυνατός ο εντοπισμός των πρώτων οροθετικών πτηνών ενάμιση μήνα πριν το πρώτο ανθρώπινο περιστατικό και ενημερώθηκαν έγκαιρα οι αρμόδιες αρχές για τη λήψη μέτρων προστασίας του ανθρώπου. Αντίστοιχα ευρήματα (δηλαδή, ανίχνευση ορομετατροπών ενάμιση μήνα πριν την εκδήλωση κρουσμάτων σε ανθρώπους) λήφθηκαν από τη μελέτη που διενεργήθηκε το 2013 σε ορνίθια ελευθέρως διαβίωσης στην περιοχή της κεντρικής Μακεδονίας. Ίδια αποτελέσματα είχαν ληφθεί και από ανάλογη έρευνα η οποία αφορούσε στην επιτήρηση της διασποράς του ιού κατά το 2011 στην Κεντρική Μακεδονία με τη χρήση περιστεριών και ορνιθίων ελευθέρως διαβίωσης. Και σε εκείνες τις περιπτώσεις, είχε ανιχνευθεί κυκλοφορία του ιού στα πτηνά ενάμιση μήνα πριν την εκδήλωση κρουσμάτων σε ανθρώπους. Με βάση την εμπειρία τριών ετών, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο ιός διαχειμάζει και κάθε χρόνο παρατηρούνται αρχικές εστίες διασποράς του στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας. Τα οικόσιτα πτηνά (περιστέρια, ορνίθια ελευθέρως διαβίωσης) αποτελούν αξιόπιστα συστήματα ανίχνευσης της διασποράς του ιού και έγκαιρης προειδοποίησης των αρχών για τη λήψη κατάλληλων μέτρων (έγκαιρη καταπολέμηση κουνουπιών, κ.λπ.), ώστε να μειωθεί η επίπτωση του ιού στους ανθρώπους. Πέρα από αυτό, η χρήση συστημάτων επιτήρησης με πτηνά θα μπορούσε να συμβάλλει ουσιαστικά στην αποφυγή μετάδοσης WNV μέσω μεταγγιζόμενου αίματος, εφιστώντας την προσοχή στις περιοχές όπου ανιχνεύεται διασπορά του ιού, ώστε να λαμβάνεται μέριμνα για τον έλεγχο του αίματος που λαμβάνεται από κατοίκους της περιοχής, ή προσωρινή παύση της αιμοδοσίας.

Με τα συγκεκριμένα συστήματα, είναι δυσχερής η διενέργεια πολλαπλών δειγματοληψιών με στόχο τη μελέτη της εξέλιξης της επιδημίας. Έναντι όμως άλλων

συστημάτων (π.χ. ορνίθια-δείκτες σε κλωβούς) υπερτερούν, καθώς δεν απαιτείται να πραγματοποιηθεί αγορά, συντήρηση και φροντίδα των πτηνών (τα οποία πραγματοποιούνται από τους ιδιοκτήτες) γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα πρακτικά και ιδιαίτερα χαμηλού κόστους μέσα για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τις αρχικές εστίες διασποράς του ιού.

Πλεονεκτήματα των οικόσιτων πτηνών ως δείκτες επιτήρησης του WNV

- Τα κουνούπια μεταδότες τρέφονται στα πτηνά αυτά με αποτέλεσμα υψηλά ποσοστά μόλυνσης σε εκτροφές.
- Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία το ύψος της αιμίας στα περιστέρια και στα κοτόπουλα δεν είναι επαρκές ώστε να μολυνθούν τα κουνούπια (συμπεριφέρονται ως αδιέξοδοι ξενιστές).
- Η γεωγραφική περιοχή της διασποράς του ιού προσδιορίζεται με ακρίβεια καθώς τα πτηνά αυτά δεν μετακινούνται σε μεγάλες αποστάσεις.
- Μπορούν πραγματοποιούνται περιορισμένες διαδοχικές αιμοληψίες αν κρίνεται απαραίτητο, ώστε να συνεχιστεί η επιτήρηση και κατά τους θερινούς μήνες.
- Το κόστος επιτήρησης είναι πολύ μικρό σε σχέση με την αντίστοιχη σύλληψη και τον έλεγχο άγριων πτηνών
- Τα οικόσιτα περιστέρια και κοτόπουλα αποδείχθηκαν χρήσιμα ως αξιόπιστο και χαμηλού κόστους σύστημα έγκαιρης ανίχνευσης της ενζωτικής μετάδοσης του WNV στην Ελλάδα.

Σε ότι αφορά την περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας, με βάση την εμπειρία μας καταδεικνύεται ότι η διασπορά του ιού είναι ανιχνεύσιμη 1.5 τουλάχιστον μήνες πριν τα πρώτα ανθρώπινα κρούσματα. Εάν θέλουμε να μειωθεί η επίπτωση στον άνθρωπο απαιτείται έγκαιρη και αποτελεσματική μείωση των πληθυσμών των κουνουπιών στα πλαίσια ολοκληρωμένων προγραμμάτων διαχείρισης πριν το διάστημα αυτό. Οι στόχοι είναι προφανείς καθώς η μείωση της έντασης της



επιζωotίας στα πτηνά αναμένεται να μειώσει και τον αριθμό των μολυσμένων από τον ιό κουνουπιών και να συμβάλει στην αποτελεσματικότερη πρόληψη της νόσου στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα και με βάση τα τρία έτη παρατηρήσεων που έχουμε σε ότι αφορά την περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας προτείνουμε έγκαιρη και αποτελεσματική καταπολέμηση των κουνουπιών η οποία θα πρέπει να έχει διενεργηθεί δύο μήνες πριν την εμφάνιση των ανθρώπινων κρουσμάτων. Η ένταση της καταπολέμησης μπορεί επίσης να προσδιορίζεται σε τοπικό επίπεδο με βάση τις περιοχές στις οποίες εντοπίστηκε η διασπορά του ιού κατά την έναρξη της επιδημικής περιόδου.

Βιβλιογραφία

1. CDC. Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention and Control. 2003. Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/resources/wnv-guidelines-aug-2003.pdf>
2. Rizzoli A, Rosa R, Rosso F, et al. West Nile virus circulation detected in Northern Italy in sentinel chickens. Vector Borne and Zoonotic Diseases. 2007;7(3):411-17
3. Cernescu C, Nedelcu N, Tardei G, et al. Continued transmission of West Nile virus to humans in Southeastern Romania, 1997-1998. Journal of Infectious Diseases. 2000;181(2):710-2
4. Calistri P, Giovannini A, Savini G, et al. West Nile virus transmission in 2008 in North-Eastern Italy. Zoonoses and Public Health. 2010;57(3):211-19
5. Chaskopoulou A, Dovas CI, Chaintoutis SC, et al. Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. Euro Surveillance. 2011;16(31) pii:19963
6. Chaskopoulou A, Dovas CI, Chaintoutis SC, et al. Detection and early warning of West Nile virus circulation in Central Macedonia, Greece, using sentinel chickens and mosquitoes. Vector Borne and Zoonotic Diseases 2013;13(10):723-32
7. Chaintoutis SC, Chaskopoulou A, Chassalevris T, et al. West Nile virus lineage 2 strain in Greece, 2012. Emerging Infectious Diseases 2013;19(5):827-9