



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 Π1.30

**Έκθεση παρουσίασης των αποτελεσμάτων της
οροεπιδημιολογικής μελέτης για την ανίχνευση ειδών
Plasmodium σε μετανάστες και πρόσφυγες από ενδημικές
για την ελονοσία περιοχές, που ζητούν άσυλο ή ζουν στην
Ελλάδα**

Υπεύθυνοι φορείς:

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2013



Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης





Περιεχόμενα

Εισαγωγή	3
Μεθοδολογία	4
Αποτελέσματα	6
Συμπεράσματα – Συζήτηση	8
Βιβλιογραφία	10

Εισαγωγή

Η ελονοσία προκαλείται από τα ενδοερυθροκυτταρικά παρασιτικά πρωτόζωα του γένους *Plasmodium* και μεταδίδεται με το δήγμα του θηλυκού κουνουπιού *Anopheles*. Ελονοσία στον άνθρωπο προκαλούν τα *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* και το ζωνοτικό *P. knowlesi*. Εξ αυτών το *P. vivax* εμφανίζει την ευρύτερη γεωγραφική κατανομή με 2.5 δις άτομα να διαβιούν σε περιοχές κινδύνου, κε των οποίων η πλειοψηφία εκτός Αφρικής.

Η Ελλάδα θεωρείται ελεύθερη ελονοσίας από το 1974. Έκτοτε, στη χώρα καταγράφονται εισαγόμενα κρούσματα αν και σποραδικά έχουν αναφερθεί και περιστατικά αυτόχθονης μετάδοσης. Στην Ελλάδα παρατηρείται μεγάλη εισροή συχνά παράνομων μεταναστών από περιοχές ενδημίας της ελονοσίας, οι οποίοι ως επί το πλείστον εργάζονται ως εποχικοί εργάτες σε αγροτικές περιοχές της χώρας. Από το 2009 ως το 2012 καταγράφηκαν 62 κρούσματα ελονοσίας αυτόχθονης μετάδοσης, σε διάφορες περιοχές, όπως η Νότια Πελοπόννησος, η Ανατολική Στερεά Ελλάδα, η Αττική, η Εύβοια, η Καρδίτσα, η Θράκη κλπ.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η παραγωγή ανθελονοσιακών αντισωμάτων σε Έλληνες και μετανάστες με εργαστηριακά τεκμηριωμένη ελονοσία από *P. vivax* τους προηγούμενους 5-7 μήνες. Επιπλέον, εξετάστηκε η πιθανή παρουσία ανθελονοσιακών αντισωμάτων στον ορό ασυμπτωματικών Ελλήνων και μεταναστών, που διαβιούν σε περιοχές όπου παρατηρήθηκε ελονοσία αυτόχθονης μετάδοσης τα τελευταία χρόνια, με σκοπό τη διαπίστωση της πιθανής ύπαρξης οροθετικών ατόμων που ενδέχεται να λειτουργήσουν ως ασυμπτωματικοί φορείς του παρασίτου.

Μεθοδολογία

Ομάδες μελέτης

Πιλοτική μελέτη

Αρχικά το Μάρτιο 2012 πραγματοποιήθηκε συλλογή ενός δείγματος ορού από καθένα από 38 άτομα που είχαν διαγνωσθεί με ελονοσία από *P. vivax* χρησιμοποιώντας μικροσκοπική εξέταση αίματος ή μοριακές μεθόδους, 5-7 μετά την οξεία φάση της λοίμωξης. Διακρίθηκαν 2 ομάδες: i) Έλληνες πολίτες, χωρίς ταξιδιωτικό ιστορικό σε περιοχές ενδημικές της ελονοσίας (n=19) και ii) μετανάστες από το Πακιστάν και το Αφγανιστάν (n=19). Από όλους τους εξεταζόμενους ελήφθη γραπτή δήλωση συναίνεσης.

Ομάδες πληθυσμού στη μελέτη διαλογής

Από τον Απρίλιο ως το Νοέμβριο του 2012 πραγματοποιήθηκε μελέτη διαλογής σε μετανάστες από ενδημικές περιοχές της ελονοσίας και σε Έλληνες από περιοχές υψηλού κινδύνου για αυτόχθονη μετάδοση ελονοσίας. Συνελέγησαν 988 δείγματα από 969 άτομα, εκ των οποίων 253 δείγματα από 248 ασυμπτωματικούς Έλληνες και 735 δείγματα από 721 ασυμπτωματικούς μετανάστες. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 50 υγιείς Έλληνες αιμοδότες. Από όλους τους εξεταζόμενους ελήφθη γραπτή δήλωση συναίνεσης.

ELISA

Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των ειδών *Plasmodium* σε δείγματα ορού της πιλοτικής μελέτης και της μελέτης διαλογής έγινε με μέθοδο ELISA που περιέχει ανασυνδυασμένα αντιγόνα των *P. vivax* και *P. falciparum* (Malaria-Ab ELISA, IBL International GMBH, Hamburg, Germany). Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η μέθοδος ανιχνεύει και αντισώματα έναντι των *P. ovale* και *P. malariae*, λόγω αντιγονικών ομοιοτήτων μεταξύ των διαφόρων ειδών πλασμοδίου.

Η δοκιμασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα 100 μL ορού σε αραιώση 1:100) επωάζονται αρχικά για 1 h στους 37°C. Ακολουθεί πλύση και προσθήκη 100 μL anti-human IgG και IgM αντισωμάτων σεσημασμένων με horseradish peroxidase για 30 min. Ακολουθεί πλύση και προσθήκη 100 μL υποστρώματος tetramethylbenzidine (TMB) και εμφάνιση χρώματος. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 100 μL 0.2 M θειικού οξέος. Οι OD ποσοτικοποιούνται φωτομετρικά στα 450 nm στο Chromate® Microplate Reader (Awareness Technology, FL, USA) και μετατρέπονται σε μονάδες (U) χρησιμοποιώντας τύπο που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Οι τελικές τιμές των δειγμάτων υπολογίζονται μετά από σύγκριση με το cut-off.

Σε όλες τις μετρήσεις περιλήφθησαν θετικός μάρτυρας από άτομο με τεκμηριωμένη ελονοσία και αρνητικός μάρτυρας από υγιές άτομο, χωρίς ιστορικό ελονοσίας. OD μεγαλύτερες από 11 U θεωρούνται θετικές, 9-11 U οριακές και OD μικρότερες από 9 U αρνητικές.

Η δοκιμασία δεν διακρίνει μεταξύ αντισωμάτων τάξης IgG και IgM, ούτε μεταξύ αντισωμάτων έναντι του *P. falciparum* και των *P. vivax*, *P. ovale* και *P. malariae*.

Αποτελέσματα

Κατανομή ηλικίας και φύλων

Στην πιλοτική μελέτη, εκ των 19 Ελλήνων που είχαν νοσήσει, 9 (47%) ήταν άνδρες και 10 (53%) γυναίκες. Η ηλικία τους κυμαινόταν από 17 μήνες ως 80 έτη, με διάμεση τιμή 46 έτη. Όλοι οι μετανάστες ήταν άνδρες ηλικίας από 19 ως 55 ετών, με διάμεση τιμή 25 έτη.

Στη μελέτη διαλογής, 106 εκ των Ελλήνων (43%) ήταν άνδρες και οι υπόλοιπες 142 (57%) γυναίκες. Η ηλικία τους κυμαινόταν από 17 μήνες ως 94 έτη με διάμεση τιμή 53 έτη. Οι 721 ασυμπτωματικοί μετανάστες ήταν όλοι άνδρες ηλικίας 15 ως 65 ετών (διάμεση 27 έτη).

Χώρα καταγωγής και τόπος διαμονής

Πληροφορίες ήταν διαθέσιμες για 685 (95%) εκ των 721 μεταναστών. Εξ αυτών, 627 (91.5%) ήταν από το Πακιστάν, 24 (3.5%) από την Ινδία, 24 (3.5%) από το Αφγανιστάν, 3 (0.44 %) από το Μπαγκλαντές, 2 (0.30%) από το Μαρόκο και 5 (0.73%) από τη Ρουμανία. 582 μετανάστες διέμεναν στη Λακωνία, 124 στην Ανατολική Αττική, κυρίως Μαραθώνα και 15 στην Καρδίτσα.

Πιλοτική μελέτη

Από το σύνολο των ατόμων που νόσησαν από ελονοσία (n=38), 13.1% (n=5) ήταν θετικοί για ανθελονοσιακά αντισώματα. Συγκεκριμένα 2 εκ των 19 Ελλήνων (10.5%), ένας άνδρας και μία γυναίκα, και 3 εκ των 19 μεταναστών (15.7%), 2 Πακιστανοί και 1 Αφγανός έδωσαν θετική τη δοκιμασία ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι των *Plasmodium* spp.

Μελέτη διαλογής

Κανένας από τους 248 Έλληνες δεν βρέθηκε θετικός για ανθελονοσιακά αντισώματα. Όσον αφορά στους μετανάστες, εκ των 735 δειγμάτων που ελέγχθηκαν, 12 μετρήθηκαν περισσότερες από μία φορές με σταθερά θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα. Από τα υπόλοιπα 721 δείγματα, 85 (11.78%) ήταν θετικά και 636 (88.22%) αρνητικά για ανθελονοσιακά αντισώματα.

Εβδομήντα εκ των 582 μεταναστών από τη Λακωνία ήταν θετικοί, 14 εκ των 124 που διαμένουν στην Ανατολική Αττική ήταν θετικοί και όλοι οι 15 ιμετανάστες που διαμένουν στην Καρδίτσα αρνητικοί για ανθελονοσιακά αντισώματα.

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Τα αντισώματα αποτελούν βασικό στοιχείο της φυσικής επίκτητης ανοσίας στην ελονοσία. Ανεξαρτήτως της χρησιμοποιούμενης διαγνωστικής δοκιμασίας, υπάρχει συμφωνία ότι τα αντισώματα εμφανίζονται στον ορό σχετικά σύντομα, συνήθως εντός 2 εβδομάδων από την έναρξη της νόσου. Δεν υπάρχει ομοφωνία όσον αφορά στο χρόνο που αρχίζουν να εξαφανίζονται από τον ορό. Γενικά σε άτομα που δεν εκτίθενται επανειλημμένα στη νόσο, και συνεπώς δεν διαθέτουν ικανοποιητικού βαθμού «ανοσίας» σε αυτήν, θεωρείται ότι συνήθως εξαφανίζονται εντός 3-6 μηνών από την οξεία λοίμωξη.

Οι Έλληνες που περιλήφθησαν στην πιλοτική μελέτη εξετάστηκαν μόνο μία φορά σε 5-7 μήνες απ'όταν νόσησαν από ελονοσία, για πρώτη φορά στη ζωή τους. Αντιμετωπίστηκαν άμεσα με τα κατάλληλα σχιζοκτόνα φάρμακα αίματος και ιστών. Εξ αυτών 10.5% βρέθηκε ότι διέθετε ανιχνεύσιμο τίτλο ανθελονοσιακών αντισωμάτων στον ορό.

Οι μετανάστες που περιλήφθηκαν στην πιλοτική μελέτη, εξετάστηκαν στο ίδιο χρονικό πλαίσιο και όπως και οι Έλληνες αντιμετωπίστηκαν ταχύτατα και αποτελεσματικά με ανθελονοσιακά φάρμακα. Αντίθετα από τους Έλληνες, ωστόσο, δεδομένου ότι προέρχονταν από περιοχές ενδημικές της ελονοσίας, δεν ήταν η πρώτη φορά που νοσούσαν. Εξ αυτών 15.7% βρέθηκε με ανιχνεύσιμο τίτλο ανθελονοσιακών αντισωμάτων στον ορό. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αντίστοιχες παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε περιοχές με ασταθή μετάδοση της ελονοσίας. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι εξαφάνιση των ανθελονοσιακών αντισωμάτων μέσα σε λίγους μήνες, υποδεικνύοντας πλήρη εξάλειψη της λοίμωξης, σε άτομα χωρίς προϋπάρχουσα ανοσία, που αντιμετωπίστηκαν άμεσα με την κατάλληλη ανθελονοσιακή αγωγή.

Τα άτομα που βρέθηκαν οροαρνητικά πιθανόν να είχαν παράγει αντισώματα που είχαν ήδη εξαφανισθεί τη στιγμή της μέτρησης. Εναλλακτικά πιθανόν να παρήγαν αντισώματα έναντι πολυμορφικών επιτόπων που δεν αντιδρούσαν με τα αντιγόνα

που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο, ή αντισώματα που δεν αντιδρούσαν το ίδιο αποτελεσματικά με τα ανασυνδυασμένα αντιγόνα της χρησιμοποιούμενης μεθόδου όσο με τα φυσικά αντιγόνα.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα σε περιοχή πολύ χαμηλής ενδημικότητας της ελονοσίας, όπου εξετάστηκαν άτομα με επιβεβαιωμένη νόσο από *P. falciparum* ή/και *P. vivax* αλλά και άτομα χωρίς ανοσία, διαπιστώθηκε ότι ούτε τα επίπεδα αντισωμάτων στον ορό, ούτε οι σχετικές συγκεντρώσεις των ειδικών Β λεμφοκυττάρων μνήμης αρκούν για τον πλήρη χαρακτηρισμό της χυμικής ανοσίας στην ελονοσία.

Στον ορολογικό έλεγχο του αυτόχθονου πληθυσμού και των μεταναστών στην περιοχή της Λακωνίας, μια περιοχή με τεκμηριωμένη αυτόχθονη μετάδοση της νόσου τα τελευταία 3 χρόνια, διαπιστώθηκε μικρό ποσό οροθετικών μεταναστών και καθόλου οροθετικοί Έλληνες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με ανίσοιχες παρατηρήσεις σε περιοχές μη ενδημίας της ελονοσίας και επίσης υποδεικνύουν ότι ο Ελληνικός πληθυσμός των περιοχών αυτών δεν έχει εκτεθεί στην ελονοσία και δεν υπάρχουν σε αυτόν ασυμπτωματικοί φορείς του πλασμοδίου που μπορούν να λειτουργήσουν ως δεξαμενές μόλυνσης των κουνουπιών. Η πιθανότητα αυτή μειώνεται επιπλέον δεδομένου ότι τα τελευταία χρόνια, στις περιοχές αυτές υπάρχει αυξημένη επαγρύπνηση τόσο των επαγγελματιών υγείας όσο και του γενικού πληθυσμού σχετικά με τη νόσο, με αποτέλεσμα την άμεση αναζήτηση ιατρικής βοήθειας με την εμφάνιση συμπτωμάτων ενδεικτικών της λοίμωξης.

Βιβλιογραφία

Bruce-Chwatt L, de Zulueta J. The rise and fall of malaria in Europe: a historico-epidemiological study. Oxford: Oxford University Press; 1980, P. 18-25.

Drakeley C, Cook J. Chapter 5. Potential contribution of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination: historical and current perspectives. *Adv Parasitol.* 2009;69:299-352.

Cavanagh DR, Elhassan IM, Roper C, Robinson VJ, Giha H, et al. (1998) A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *J Immunol* 161: 347–359.

Asito AS, Moormann AM, Kiprotich C, Ng'ang'a ZW, Ploutz-Snyder R, et al. (2008) Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. *Malar J* 7: 238.

Kinyanjui SM, Bull P, Newbold CI, Marsh K (2003) Kinetics of antibody responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte variant surface antigens. *J Infect Dis* 187: 667–674.

Pihlgren M, Friedli M, Tougne C, Rochat AF, Lambert PH, et al. (2006) Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. *J Immunol* 176: 165–172.

Pihlgren M, Schallert N, Tougne C, Bozzotti P, Kovarik J, et al. (2001) Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. *Eur J Immunol* 31: 939–946.

Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KK, Dunyo S, Lanar DE, et al. (2008) Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect Immun* 76: 1748–1755.

Stephens R, Ndungu FM, Langhorne J. Germinal centre and marginal zone B cells expand quickly in a second *Plasmodium chabaudi* malaria infection producing mature plasma cells. *Parasite Immunol.* 2009 Jan;31(1):20-31.



Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, Liewsaree W, Riley EM, Hafalla JC. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. PLoS Pathog. 2010 19;6(2):e1000770.