



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 Π1.31

**Έκθεση δεδομένων διάγνωσης κρουσμάτων του ιού του
Δυτικού Νείλου και της ελονοσίας σε ανθρώπους και
ανάλυση αυτών**

Υπεύθυνοι φορείς:

Εργαστήριο Αναφοράς Αρμποϊών, Α' Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τομέας Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων, Εθνική Σχολή
Δημόσιας Υγείας

Λάρισα, 2013



Με τη
συγχρηματοδότηση
της Ευρωπαϊκής
Ένωσης



Περιεχόμενα

Έκθεση δεδομένων διάγνωσης κρουσμάτων του ιού του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους και ανάλυση αυτών 4

Εργαστήριο Αναφοράς Αρμποϊών, Α΄ Μικροβιολογικό Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Εισαγωγή..... 5

Μεθοδολογία 7

Αποτελέσματα..... 9

Συμπεράσματα – Συζήτηση..... 11

Βιβλιογραφία 13

Δημοσίευση 15

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών 17

Εισαγωγή..... 18

Μεθοδολογία 19

Αποτελέσματα 21

Συμπεράσματα – Συζήτηση 25

Βιβλιογραφία 26

Έκθεση δεδομένων διάγνωσης κρουσμάτων της ελονοσίας σε ανθρώπους και ανάλυση αυτών 27

Τομέας Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

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



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

Εισαγωγή.....	28
Μεθοδολογία	29
Αποτελέσματα	32
Συμπεράσματα – Συζήτηση	36
Βιβλιογραφία	39



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



Έκθεση δεδομένων διάγνωσης κρουσμάτων του ιού του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους και ανάλυση αυτών

Εργαστήριο Αναφοράς Αρμποϊών, Α΄ Μικροβιολογικό
Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης

Εισαγωγή

Το καλοκαίρι του 2010 έγινε από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Αρμποϊών (Α' Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης) η εργαστηριακή διάγνωση περιστατικών λοίμωξης από ιό του Δυτικού Νείλου (West Nile virus, WNV) για πρώτη φορά στην ελληνική επικράτεια (1). Ο αριθμός των περιστατικών αυξήθηκε τάχιστα, με αποτέλεσμα ο συνολικός αριθμός ειδικά των περιστατικών με νευροεισδυτική μορφή (West Nile neuroinvasive disease, WNND) για το 2010 να είναι 197, με θνητότητα 17%. Η επίπτωση της νόσου ήταν μεγαλύτερη σε ηλικιωμένα άτομα, ή σε άτομα με υποκείμενη νόσο (2). Πολύ σύντομα διαπιστώθηκε ότι η επιδημία οφείλονταν σε στέλεχος του ιού του Δ. Νείλου που ανήκει στην γενετική ομάδα 2 (WNV lineage 2). Το στέλεχος ονομάστηκε Nea Santa-Greece-2010, από την περιοχή όπου συλλέχθηκαν τα κουνούπια του γένους *Culex* που ήταν θετικά για τον ιό (3). Ο γενετικός χαρακτηρισμός ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους Nea Santa-Greece-2010 έδειξε ότι είναι γενετικά συγγενέστερο με το στέλεχος που απομονώθηκε στην Ουγγαρία από χρυσαετό στην Ουγγαρία, και μάλιστα φέρει μία μετάλλαξη στην περιοχή NS3 (H249P) που συνδέεται με αυξημένη παθογονικότητα (4). Το ίδιο στέλεχος του ιού απομονώθηκε σε κυτταροκαλλιέργεια από αιμοδότρια στη Βόρεια Ελλάδα, η οποία παρουσίασε ήπια συμπτώματα της νόσου μερικές μέρες μετά την αιμοδοσία (5). Η επιδημία επαναλήφθηκε το 2011 (6), καθώς και το 2012 και 2013. Σε όλες τις περιπτώσεις που ανιχνεύτηκαν θετικά για τον ιό κουνούπια, το στέλεχος ήταν παρόμοιο με αυτό του 2010, και πάντα έφερε τη συγκεκριμένη μετάλλαξη (7, 8). Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Αρμποϊών μελετήθηκαν με μοριακές τεχνικές κουνούπια που συλλέχθηκαν στη Μακεδονία και τη Θεσσαλία, και αποδείχτηκε ότι μεταξύ των κουνουπιών *Culex ripiens*, 71,3% ήταν *Culex ripiens ripiens*, 4,7% ήταν *Culex ripiens molestus*, και το σημαντικότερο ήταν

ότι μεγάλο ποσοστό (19%) ήταν υβριδικές μορφές των *Culex pipiens pipiens* και *Culex pipiens molestus* (9).

Το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Αρμποϊών χρηματοδοτείται από το ΚΕΕΛΠΝΟ και το Υπουργείο Υγείας και δέχεται δείγματα από ολόκληρη την Ελλάδα καλύπτοντας όλες τις διαγνωστικές εξετάσεις (ορολογικές, μοριακές, απομονώσεις ιών σε κυτταροκαλλιέργειες) που αφορούν τους αρμποϊούς. Κατά τη διετία 2012-2013 το Κέντρο συμμετείχε στο Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δ. Νείλου και την ελονοσία για την ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια, μέσω του οποίου προμηθεύτηκε διαγνωστικά κιτ για την ορολογική διάγνωση (ανίχνευση IgM και IgG αντισωμάτων) της λοίμωξης του ιού του Δ. Νείλου καθώς και για την ορολογική διάγνωση του ιού του Δάγγειου πυρετού. Με τις συγχρηματοδοτήσεις αυτές πραγματοποίησε όλες τις απαραίτητες εξετάσεις, όχι μόνο για την εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων του ιού του Δ. Νείλου, αλλά και για την επίλυση του προβλήματος πιθανής εμφάνισης περιστατικού Δάγγειου πυρετού στην Ελλάδα.

Μεθοδολογία

Α. Κατά τη διετία 2012-2013 εξετάστηκαν συνολικά 1085 δείγματα [ορού, εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), ούρων] προερχόμενα από 693 ασθενείς με υποψία λοίμωξης με ιό του Δ. Νείλου. Συγκεκριμένα το 2012 εξετάστηκαν 607 δείγματα από 365 ασθενείς και το 2013 εξετάστηκαν 478 δείγματα από 328 ασθενείς (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Αριθμός δειγμάτων από ασθενείς με πιθανή λοίμωξη με ιό του Δ. Νείλου που εξετάστηκαν κατά τα έτη 2012-2013 στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Αρμποϊών.

Έτος	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός ασθενών
2012	607	365
2013	478	328
Σύνολο	1085	693

Όλα τα δείγματα ορού και ENY εξετάστηκαν για την παρουσία IgM και IgG αντισωμάτων έναντι του ιού του Δ. Νείλου με εμπορικές σειρές αντιδραστηρίων της εταιρείας Focus (WNV IgM capture DxSelect and WNV IgG DxSelect, Focus Diagnostics Inc, Cypress, California). Σύμφωνα με τους κατασκευαστές, δείκτης >1.1 για τα IgM και >1.5 για τα IgG αντισώματα σημαίνει θετικό αποτέλεσμα.

Σε μερικές περιπτώσεις εφαρμόστηκε επιπλέον η μέθοδος συνάφειας (avidity) των IgG αντισωμάτων χρησιμοποιώντας το ίδιο κιτ ELISA και ουρία 6M. Συνάφεια >50% θεωρείται υψηλή και φανερώνει παλιά λοίμωξη (10).

Στους ασθενείς με πρόσφατη λοίμωξη με ιό του Δ. Νείλου εφαρμόστηκε σε δείγματα αίματος ή ούρων μία nested PCR (11) και μία Real Time PCR (12), και ακολούθησε αλληλούχιση νουκλεοτιδίων των προϊόντων της PCR (η προμήθεια αυτών των αντιδραστηρίων έγινε από τη χρηματοδότηση του ΚΕΕΛΠΝΟ).

Β. Κατά τη διάρκεια του 2012 ανιχνεύτηκαν IgM αντισώματα έναντι του ιού του Δάγκειου πυρετού (DENV) σε ένα θανατηφόρο περιστατικό από την περιοχή του Αγρινίου. Στο δείγμα του ασθενούς ανιχνεύτηκε επίσης NS1 αντιγόνο του DENV, αποτελέσματα που συνηγορούσαν για πρόσφατη λοίμωξη με τον ιό. Περαιτέρω μελέτη με αντιδραστήρια άλλης εταιρείας έδειξε αρνητικά αποτελέσματα, και τα προηγούμενα θετικά αποτελέσματα αποδόθηκαν σε μη ειδικά αντισώματα και μη καλή ειδικότητα του αρχικού κιτ. Για περαιτέρω έλεγχο της κατάστασης, συλλέχθηκαν από το ΚΕΕΛΠΝΟ δείγματα από 131 κατοίκους της περιοχής Αγρινίου τα οποία ελέγχθηκαν για την παρουσία IgM και IgG αντισωμάτων έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου και του ιού του Δάγκειου πυρετού. Χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της εταιρείας Focus (Focus Diagnostics Inc, Cypress, California): (WNV IgM capture DxSelect and WNV IgG DxSelect, DENV IgM capture DxSelect and DENV IgG DxSelect). Σε όλα τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά για DENV IgM αντισώματα εφαρμόστηκε η μέθοδος subtraction, για την αφαίρεση των μη ειδικών αντισωμάτων. Μεταξύ των 131 ατόμων, 10 παρουσίασαν ήπια συμπτώματα (πυρετό, αρθραλγίες, ρίγος) κατά το τελευταίο 15ήμερο πριν την αιμοληψία. Αυτά τα δείγματα εξετάστηκαν περαιτέρω για παρουσία αντισωμάτων έναντι άλλων αρμποϊών, και συγκεκριμένα έναντι φλεβοϊών και έναντι του ιού Chikungunya.

Αποτελέσματα

Α. Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Αρμποϊών, κατά τη διετία 2012-2013 εργαστηριακή διάγνωση οξείας λοίμωξης με ιό του Δ. Νείλου έγινε σε 139 ασθενείς, 94 το 2012 και 45 το 2013. Από τους 139 ασθενείς, οι 86 παρουσίαζαν νευροεισβολική μορφή της νόσου (WNND), ενώ οι 53 δεν παρουσίασαν νευρολογική συμπτωματολογία. Τα αποτελέσματα ανά έτος φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Εργαστηριακή διάγνωση περιστατικών λοίμωξης με ιό του Δ. Νείλου στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Αρμποϊών (ΑΠΘ) κατά τη διετία 2012-2013.

Έτος	Αριθμός ασθενών με πιθανή λοίμωξη WNV (ΑΠΘ)	Αριθμός ασθενών με λοίμωξη WNV	WNND - WNF
2012	365	94	62 - 32
2013	328	45	24 - 21
Σύνολο	693	139	86 - 53

WNND: West Nile neuroinvasive disease. WNF: West Nile fever.

Συνολικά, 48 δείγματα από τους 45 ασθενείς του 2013 εξετάστηκαν με PCR και 15 βρέθηκαν θετικά, ποσοστό εξαιρετικά ικανοποιητικό δεδομένης της σύντομης και χαμηλής ιαιμίας που παρατηρείται στις λοιμώξεις με ιό του Δ. Νείλου.

Ειδικά το 2013, το πρώτο περιστατικό λοίμωξης με ιό του Δ. Νείλου που παρατηρήθηκε στη Βόρεια Ελλάδα, εξετάστηκε με όλες τις δυνατές εργαστηριακές μεθόδους, οπότε εκτός από την ανίχνευση των IgM και IgG αντισωμάτων, τα οποία επιβεβαιώθηκαν και με την παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων, βρέθηκε θετικό αποτέλεσμα στη nested PCR και τη Real-Time PCR, έγινε αλληλούχιση νουκλεοτιδίων, καθώς και απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια, και αυτή η περιγραφή δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *New Microbes and New Infections* (13).

Στην παράγραφο των Acknowledgements αναφέρεται ότι η χρηματοδότηση της μελέτης έγινε από το συγκεκριμένο πρόγραμμα και από το ΚΕΕΛΠΝΟ - Υπουργείο Υγείας.

Β. Από τα 131 άτομα -κατοίκους της περιοχής Αγρινίου, κανένα δεν βρέθηκε να φέρει IgM αντισώματα για τον ιό του Δάγκκειου πυρετού ή για τον ιό του Δ. Νείλου, επομένως κανένα άτομο δεν είχε οξεία λοίμωξη από αυτούς τους δύο ιούς. IgG αντισώματα έναντι του ιού του Δ. Νείλου ανευρέθηκαν σε 8 άτομα (6,1%). Διασταυρούμενες αντιδράσεις στα IgG αντισώματα με τον ιό του Δάγκκειου πυρετού παρατηρήθηκε σε 6 από τα 8 άτομα, με πολύ χαμηλότερο τίτλο από ότι αυτός του ιού του Δ. Νείλου. Ένα επιπλέον άτομο έφερε αντισώματα μόνο για τον ιό του Δάγκκειου πυρετού.

Δέκα από τα 131 άτομα ανέφεραν συμπτώματα (πυρετό, ρίγος, κεφαλαλγία, αρθραλγίες) κατά το διάστημα 15 ημερών πριν την αιμοληψία, ενώ 3 από αυτά είχαν ήπιο πυρετό (37,2-37,5°C) κατά τη στιγμή της αιμοληψίας. Όλα αυτά τα άτομα ήταν αρνητικά για IgM και IgG αντισώματα για τους ιούς του Δ. Νείλου και του Δάγκκειου πυρετού, όπως επίσης και για τον ιό Chikungunya. Σε δύο όμως από τα 3 εμπύρετα άτομα, 12 και 24 ετών, ανιχνεύτηκαν IgM αντισώματα έναντι φλεβοϊών, γεγονός που εξηγεί το εμπύρετο νόσημα σε αυτά τα άτομα (ετοιμάζεται σχετική δημοσίευση).

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Από το 2010 επιδημίες Δ. Νείλου παρατηρούνται κάθε χρόνο στην Ελλάδα. Τα περιστατικά αρχίζουν κατά το μέσον του Ιουλίου και σταματούν στις αρχές του Οκτωβρίου. Μετά τη διάγνωση του πρώτου περιστατικού στην Ελλάδα το 2010 και την ανίχνευση της γενετικής ομάδας 2 του ιού, πολλές άλλες ευρωπαϊκές χώρες ανέφεραν περιστατικά αυτής της γενετικής ομάδας, γεγονός που φανερώνει ότι αυτό το στέλεχος εξαπλώνεται και το πλέον πιθανό θα απασχολήσει τη Δημόσια Υγεία και τα επόμενα χρόνια. Όσον αφορά την Ελλάδα, παρατηρείται σχετική μείωση των περιστατικών το 2012 και ιδιαίτερα το 2013, σε σχέση με το 2010, οφειλόμενη πιθανώς στην αποκτηθείσα ανοσία του πληθυσμού των ανθρώπων και των πτηνών.

Το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Αρμποϊών από το 2010 έως σήμερα έχει πραγματοποιήσει πολλές μελέτες για τον ιό του Δ. Νείλου, και έχει μεγάλη εμπειρία στην εργαστηριακή διάγνωση της νόσου, ενώ ταυτόχρονα η αυξανόμενη διεθνώς γνώση για τον ιό έχει διευκολύνει τα μέγιστα την εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων αυτών, η οποία είναι εξαιρετικά δύσκολη λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων μεταξύ των φλαβιϊών. Είναι τώρα πλέον γνωστό ότι η ανίχνευση των IgM αντισωμάτων καθυστερεί σε μη νευροεισβολικές μορφές της νόσου (14) (άρα πρέπει να εξετάζεται και δεύτερο δείγμα ορού αίματος σε περίπτωση αρχικού αρνητικού αποτελέσματος), ενώ τα IgM αντισώματα είναι δυνατόν να είναι ανιχνεύσιμα και μετά από ένα χρόνο από την οξεία λοίμωξη (15), επομένως προσοχή απαιτείται κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Κατά τη διάρκεια της διετίας 2012-2013 εξετάστηκαν πολλά δείγματα για τον ιό του Δ. Νείλου από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, και φάνηκε ότι η επιδημιολογία του ιού είναι απρόβλεπτη, δηλαδή δεν είναι δυνατή καμία πρόβλεψη όσον αφορά τη γεωγραφική διασπορά του ιού, καθιστώντας τα μοντέλα της νόσου μη εφαρμόσιμα. Γεγονός είναι ότι ειδικά στη Βόρεια Ελλάδα, τα περισσότερα περιστατικά παρατηρήθηκαν σε ορισμένες εστίες, όπως π.χ. η περιοχή κοντά στις εκβολές του

Νέστου ποταμού κατά τη διετία 2012-2013. Όσον αφορά τις ομάδες που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο, αυτές ακολουθούν το ήδη γνωστό πρότυπο, δηλαδή ευάλωτα είναι τα ηλικιωμένα άτομα και άτομα με υποκείμενη νόσο. Η θνητότητα επίσης κυμαίνεται στα διεθνή δεδομένα (περίπου 10% των περιστατικών με WNNND).

Ο έλεγχος της περιοχής του Αγρινίου έδωσε πολλά χρήσιμα συμπεράσματα: α) το γεγονός ότι 6,1% του πληθυσμού έφερε IgG αντισώματα έναντι του ιού του Δ. Νείλου σημαίνει ότι συνέβησαν τα τελευταία χρόνια αρκετά περιστατικά λοίμωξης του ιού του Δ. Νείλου στην περιοχή τα οποία, το πλέον πιθανό, παρέμειναν αδιάγνωστα (ελάχιστες είναι οι αναφορές από το νομό Αιτωλοακαρνανίας), β) η ανίχνευση ενός ατόμου με αντισώματα έναντι του Δάγκειου πυρετού σημαίνει ότι χρειάζεται αυξημένη επαγρύπνηση στην περιοχή, δεδομένου ότι και το κουνούπι φορέας του ιού είναι παρόν τόσο στην περιοχή αυτή όσο και σε άλλες γειτονικές περιοχές και στην Αλβανία, γ) η διάγνωση λοίμωξης με φλεβοϊό σε δύο από τα τρία άτομα που είχαν πυρετό κατά τη στιγμή της αιμοληψίας σημαίνει ότι οι λοιμώξεις αυτές είναι αρκετά συχνές στην περιοχή, και δεν διαγιγνώσκονται, πολύ πιθανώς διότι τα συμπτώματα είναι ήπια και δεν διαρκούν πολύ, αλλά και διότι οι κλινικοί γιατροί δεν ζητούν τη συγκεκριμένη εξέταση ώστε να γίνει εργαστηριακή διάγνωση και επιβεβαίωση.

Γενικά, το συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την ορθή επιτήρηση των λοιμώξεων με τον ιό του Δ. Νείλου. Καθ' όσον τα Κέντρα Αναφοράς είναι τα πλέον ειδικά για την επιβεβαίωση των πιθανών περιστατικών και για τον περαιτέρω έλεγχο των στελεχών του ιού, αλλά και για τη διαφορική διάγνωση με άλλα νοσήματα με παρόμοια συμπτωματολογία, θα πρέπει να υποστηρίζονται από την πολιτεία ώστε να είναι σε θέση να επιτελούν το έργο τους. Ο ιός του Δ. Νείλου φαίνεται ότι θα απασχολήσει στο άμεσο μέλλον τις Ευρωπαϊκές χώρες του Νότου, και όχι μόνο, ενώ είναι ορατός ο κίνδυνος αυτοχθόνων περιστατικών δάγκειου πυρετού, επομένως η αυξημένη επαγρύπνηση και η συνεργασία μεταξύ επιστημόνων διαφόρων ειδικοτήτων είναι απαραίτητη.

Βιβλιογραφία

1. Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Dougas G, Lytras T, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July - August 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(34):pii: 19644
2. Danis K, Papa A, Theocharopoulos G, Dougas G, Athanasiou M, Detsis M, et al. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1868-72.
3. Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Aug;17(8):1176-80.
4. Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vazquez A, Tenorio A, Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011 May;17(5):920-2.
5. Papa A, Politis C, Tsoukala A, Eglezou A, Bakaloudi V, Hatzitaki M, et al. West Nile virus lineage 2 from blood donor, Greece. *Emerg Infect Dis.* 2012 Apr;18(4):688-9.
6. Danis K, Papa A, Papanikolaou E, Dougas G, Terzaki I, Baka A, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Euro Surveill.* 2011;16(34).
7. Papa A, Papadopoulou E, Gavana E, Kalaitzopoulou S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in *Culex* mosquitoes, Greece, 2012. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013.
8. Papa A. West Nile virus infections in Greece: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Jul;10(7):743-50.
9. Papa A, Xanthopoulou K, Tsioka A, Kalaitzopoulou S, Mourelatos S. West Nile virus in mosquitoes in Greece. *Parasitol Res.* 2013 Apr;112(4):1551-5.

10. Prince HE, Lape-Nixon M, Busch MP, Tobler LH, Foster GA, Stramer SL. Utilization of follow-up specimens from viremic blood donors to assess the value of west nile virus immunoglobulin G avidity as an indicator of recent infection. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Sep;12(9):1123-6.
11. Sanchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernandez L, Valdes K, Guzman MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. J Virol Methods. 2005 Jun;126(1-2):101-9.
12. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. J Virol Methods. 2007 Dec;146(1-2):355-8.
13. Papa A, Tsimitri T, Papadopoulou E, Testa T, Adamidis A, Gavana E, et al. Molecular detection and isolation of West Nile virus from a human case in northern Greece, 2013. New Microbe New Infect. 2013;1(2):30-1.
14. Papa A, Danis K, Tsergouli K, Tsioka K, Gavana E. Development time of IgG antibodies to West Nile virus. Arch Virol. 2011 Sep;156(9):1661-3.
15. Papa A, Danis K, Athanasiadou A, Delianidou M, Panagiotopoulos T. Persistence of West Nile virus immunoglobulin M antibodies, Greece. J Med Virol. 2011 Oct;83(10):1857-60.

Molecular detection and isolation of West Nile virus from a human case in northern Greece, 2013

A. Papa¹, T. Tsimitri², E. Papadopoulou¹, T. Testa¹,
A. Adamidis², E. Gavana¹ and S. Aspragathou²

1) Department of Microbiology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki and 2) Department of Internal Medicine, Agios Demetrios General Hospital, Thessaloniki, Greece

Abstract

In order to laboratory confirm the first suspected West Nile fever case in 2013 in northern Greece, a combination of serological molecular and culture methods were applied. It was shown that the causative West Nile virus strain belonged to lineage 2, and possessed the amino acid substitution H249P in the NS3 protein, as in previous years. The significance of this specific strain in Europe remains to be elucidated.

Keywords: 2013, Greece, lineage 2, West Nile fever, West Nile virus

Original Submission: 23 August 2013; **Accepted:** 30 September 2013

Article published online: 21 November 2013
New Microbe New Infect 2013; 1: 30–31

Corresponding author: A. Papa, Department of Microbiology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece.
E-mail: annap@med.auth.gr

Introduction

West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne flavivirus (genus *Flavivirus*, family *Bunyviridae*) causing an asymptomatic or mild infection (West Nile fever) in humans, while in less than 1% of infections there are symptoms from the nervous system (West Nile neuroinvasive disease). Most WNV strains cluster into two major genetic lineages 1 and 2. Lineage 1, is responsible for sporadic cases and outbreaks in Africa, Asia, Australia and the Americas. Lineage 2, initially restricted to sub-Saharan Africa and Madagascar, emerged in 2004 in Europe, and caused a large outbreak of WNV infections in 2010 in Greece (WNV strain Nea Santa-Greece-2010) [1,2].

Genetic characterization of the strain showed that its closest genetic relationship was to the lineage 2 strain that had emerged in Hungary in 2004, and it was suggested that the increased virulence might be associated with the amino acid substitution H249P in the NS3 protein [3]. Since then, Greece has experienced outbreaks for three consecutive years (2010–2012) with 381 cases of West Nile neuroinvasive disease [4]. The geographical range of WNV in Europe is expanding and the virus is causing increasing numbers of epidemics/outbreaks associated with human morbidity and mortality [5]. Here, we report the laboratory-confirmed diagnosis of the first West Nile fever case observed in 2013 in northern Greece.

In mid-July 2013 a 73-year-old male resident of Thessaloniki, northern Greece, with a history of diabetes mellitus, coronary disease and dementia, was admitted to Agios Demetrios General Hospital in Thessaloniki, because of 4-day high fever (39.7°C), chills, severe headache, cough, nausea and vomiting. Upon admission the patient was disorientated. His blood pressure was 140/80 mmHg with a heart rate of 70 beats per minute. Main laboratory findings were: white blood cell count 14 000 cells/mL (neutrophils 72.6%, lymphocytes 17%, monocytes 9.9%); haematocrit 38.7%; platelets 108 000/mL; erythrocyte sedimentation rate 66 mm/h; C-reactive protein 3.2 mg/L (normal <3 mg/L); hyponatraemia 126 mmol/L (normal range 135–145 mmol/L); alanine transaminase 54 U/L; aspartate transaminase 65 U/L (normal range for both transaminases up to 35 U/L); and lactate dehydrogenase 409 U/L (normal range 140–280 U/L). No lumbar puncture was performed. The physical and neurological examination did not show any abnormalities, apart from reduced visual acuity due to cataract. Results of the chest radiography and electrocardiogram were normal, while a computed tomography scan of the brain showed generalized atrophy. The patient was started on antimicrobial drug therapy (intravenous ceftriaxone and azithromycin) for potential bacterial infection. Blood and urine cultures were negative. He continued to be febrile up to day 5 of hospitalization.

On the basis of the patient's clinical symptoms, and the several cases of WNV infection in northern Greece during the last 3 years, WNV infection was suspected. A serum sample from the patient was sent to the Hellenic Reference Centre for Arboviruses in Aristotle University of Thessaloniki for the detection of WNV IgM and IgG antibodies. Using commercial ELISA kits (WNV IgM capture DxSelect™ and WNV IgG DxSelect; Focus Diagnostics Inc., Cypress, CA, USA), WNV IgM antibodies were detected, but IgG antibodies were not detectable. A second serum sample, together with blood and urine samples, was taken on day 7 after admission (11th day of illness). High levels of both IgM and IgG antibodies were detected in the second sample, which was also tested by

plaque reduction neutralization test and >90% reduction was observed (PRNT₅₀).

A real-time RT-PCR [6] was applied on genetic material extracted from the plasma and urine samples of the patient (taken on the 11th day of illness), which gave negative results for the plasma sample but positive for the urine sample, with Ct value of 26.95. WNV RNA detection in urine has been proposed as a diagnostic method for WNV infection, because it is detectable at a higher viral load and for longer time in urine than in plasma and it has been successfully followed as routine testing for the diagnosis and follow-up of patients with WNV infection [7,8].

Upon receipt of the urine sample, 1 mL of 1 : 10 urine dilution was inoculated in Vero E6 cells, and flasks were observed daily for the presence of cytopathic effects, which were seen on day 3 after inoculation. Real-time PCR on the genetic material extracted from the cell supernatant gave positive results with Ct 19.60. We continued the propagation of the virus up to the sixth passage. Spot-slides prepared with the infected cells gave strong immunofluorescence with a known WNV IgG-positive serum. Hence, although the patient had already high titres of IgG and IgM antibodies, he continued to have viraemia. To check whether the WNV strain of 2013 (North Greece-2013) possesses the H249P substitution in the NS3 protein, we applied an RT-nested PCR, with previously designed primers specific for this genome region [9]. Nucleotide sequencing analysis showed 100% identity with the Nea Santa-Greece-2010 strain, suggesting that the WNV strain of 2013 possess the H249P substitution (GenBank accession number KF537659).

The condition of the patient improved on day 7 of hospitalization, however, he was still complaining of headache. The haematological and biochemical parameters returned to normal and the patient was discharged on day 11 of hospitalization without any sequelae.

In the present study we report all the laboratory methods applied at a reference centre to three types of samples taken from the first suspected WNV case in northern Greece in 2013 in order first to confirm the diagnosis and then to gain an insight into the WNV strain that is causing clinical cases at the

start of the WNV season. Although a lot of laboratory effort is needed to complete the procedure in the required time, it provides useful data for the WNV epidemiology in the country. For cases that might follow, serology and real-time RT-PCR are sufficient for WNV diagnostics, while PRNT₅₀ could be applied on batches of samples once or twice per month as a confirmatory test of the probable cases.

Acknowledgements

The present study was financially supported by the Hellenic Ministry for Health and Social Solidarity, the Hellenic Centre for Disease Control and Prevention, and the 'Integrated surveillance and control programme for West Nile virus and malaria in Greece' funded by the National Strategic Reference Framework 2007–2013.

References

1. Papa A, Danis K, Baka A, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July–August 2010. *Euro Surveill* 2010; 15: 19644.
2. Papa A, Papadopoulou E, Gavara E, Kalaitzopoulou S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in *Culex* mosquitoes, Greece, 2012. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013; 13: 682–684.
3. Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulos K, Vazquez A, Tenorio A, Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 920–922.
4. Papa A. West Nile virus infections in humans—focus on Greece. *J Clin Virol* 2013; 58: 351–353.
5. Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, et al. West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 699–704.
6. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods* 2007; 146: 355–358.
7. Tonry JH, Brown CB, Cropp CB, et al. West Nile virus detection in urine. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1294–1296.
8. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis* 2013; 208: 1086–1092.
9. Papa A, Politis C, Tsoukala A, et al. West Nile virus lineage 2 from blood donor, Greece. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 688–689.

Έκθεση δεδομένων διάγνωσης κρουσμάτων του ιού του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους και ανάλυση αυτών

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εισαγωγή

Μετά την πρώτη επιδημία λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα (κυρίως στην Κεντρική Μακεδονία) το καλοκαίρι του 2010 και την εξάπλωσή της στη Νότια Ελλάδα και ιδιαίτερα σε περιοχές της Ανατολικής Αττικής το 2011, ήταν αναμενόμενη η συνέχιση της εμφάνισης σε περιοχές που δεν είχαν αναφέρει κρούσματα κατά την περίοδο 2010-2011.

Κατά το καλοκαίρι - φθινόπωρο 2012 και 2013, πραγματοποιήθηκε περιπτωσιολογική μελέτη με σκοπό την ανάλυση της εργαστηριακής διάγνωσης, της γεωγραφικής κατανομής και των κλινικών χαρακτηριστικών των κρουσμάτων λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου στη Νότια Ελλάδα.

Μεθοδολογία

1. Υλικό

Τα δείγματα που απεστάλησαν ήταν ορός, πλήρες αίμα ή / και ENY, από ασθενείς από τη Νότια Ελλάδα με υποψία λοίμωξης από WNV. Οι ασθενείς παρουσίαζαν εμπύρετη νόσο με ή χωρίς νευρολογικές εκδηλώσεις, όπως πονοκέφαλο - άσηπτη μηνιγγίτιδα ή / και εγκεφαλίτιδα. Οι ασθενείς δεν ανέφεραν ιστορικό εμβολιασμού για κίτρινο πυρετό ή ταξίδια σε ενδημικές περιοχές

2. Ορισμός Κρούσματος λοίμωξης από WNV

Επιβεβαιωμένο κρούσμα αν:

1. Κλινικά κριτήρια: μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, πυρετός $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ χωρίς συγκεκριμένη διάγνωση και 2. Εργαστηριακά κριτήρια: ανίχνευση WNV RNA σε ολικό αίμα ή / και ENY, παρουσία αντι-WNV IgM Abs στο ENY, με ή χωρίς αντι-WNV IgG Abs, ή ανίχνευση αύξησης επιπέδων αντι-WNV IgM και IgG Abs σε διαδοχικά δείγματα ορού.

Πιθανό κρούσμα αν:

1. Κλινικά κριτήρια: μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα πυρετός $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ χωρίς συγκεκριμένη διάγνωση και 2. Εργαστηριακά κριτήρια: ανίχνευση αντι-WNV IgM Abs, με ή χωρίς αντι-WNV IgG Abs σε ορό

Τα επιβεβαιωμένα και πιθανά κρούσματα κοινοποιήθηκαν στο Ελληνικό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ)

3. Μέθοδος

Έλεγχος για ανίχνευση αντι-WNV IgM & αντι-WNV IgG Abs με ELISA σε ορό και ENY.

♦ Για ανίχνευση IgG αντισωμάτων: WNV IgG DxSelect Elisa Kit (Focus Diagnostics Inc, Cypress, CA, USA) ($\text{index} \geq 1.50$ θετικό, $1.50 < \text{index} \geq 1.30$ αμφίβολο, $\text{index} < 1.30$ αρνητικό)

♦ Για ανίχνευση IgM αντισωμάτων: WNV IgM capture DxSelect ELISA kit (Focus Diagnostics Inc, Cypress, CA, USA) ($\text{index} > 1.10$ θετικό, $1.10 \leq \text{index} \leq 0.90$ αμφίβολο, $\text{index} < 0.90$ αρνητικό)

Έλεγχος για ανίχνευση WNV RNA με μοριακή τεχνική σε γενική αίματος και ENY με τα εξής στάδια:

- ♦ απομόνωση ολικού RNA (high Pure RNA isolation kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- ♦ αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)
- ♦ πολλαπλασιασμός και ανίχνευση με Real-time RT-PCR με τη χρήση hybridization probes (LightMix[®] kit West Nile Virus, TIBMolBiol, Germany)

Αποτελέσματα

1. Για το χρονικό διάστημα καλοκαίρι - φθινόπωρο 2012

Συνολικά βρέθηκαν 61 εργαστηριακά διαγνωσμένα κρούσματα WNV λοίμωξης από 328 ασθενείς (18.6%). Από αυτά 16 άτομα (16/61, 26.2%) παρουσίαζαν πυρετός του Δυτικού Νείλου (WNV) με κλινική εικόνα: πυρετό με μυαλγίες, κεφαλαλγία, αρθραλγίες, εξάνθημα και διάρροια (ναυτία ή έμετο). Στα άτομα αυτά η διάμεση τιμή του index των αντι-WNV IgM και IgG Abs - δείγματα ορών ήταν 3.21 (εύρος 1.56 - 4.78) και 1.4 (εύρος 0.30 - 2.84), αντίστοιχα.

Τα υπόλοιπα 45 άτομα (45/61, 73.8%) είχαν νευροδισδυτική νόσος από WNV λοίμωξη (WNND). Συγκεκριμένα 6 ασθενείς είχαν μηνιγγίτιδα, 9 εγκεφαλίτιδα και 30 μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Οι κλινικές εκδηλώσεις ήταν οξεία εκδήλωση πυρετού με δυσκαμψία αυχένα, μεταβολή νοητικής κατάστασης, επιληπτικές κρίσεις, αδυναμία άκρων, πλειοκύτωση ENY και / ή μη φυσιολογική νευροαπεικόνιση. Για τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών η διάμεση τιμή του δείκτη (index) των αντι-WNV IgM και IgG Abs – σε δείγματα ορών ήταν 4.1 (εύρος 0.11 - 5.01) και 3.52 (εύρος 1.12 - 4.97), αντίστοιχα. Η διάμεση τιμή του δείκτη (index) των αντι-WNV IgM και IgG Abs – στα δείγματα ENY ήταν 3.52 (εύρος 1.12 - 4.97) και 0.57 (εύρος 0.26 - 4.26), αντίστοιχα .

Σε κανένα δείγμα ENY και αίματος δεν ανιχνεύτηκε WNV RNA.

Ανίχνευση μόνο αντι-WNV IgG Abs σε ορούς 20 ασθενών από τις πρόσφατα πληγείσες περιοχές (διάμεση τιμή index των IgG Abs σε ορούς: 2.71, εύρος 1.81 - 3.98).

1.1. Υποκείμενες παθήσεις και παράγοντες κινδύνου στις WNND περιπτώσεις

Υποκείμενες παθήσεις: υπέρταση (n=13), σακχαρώδης διαβήτης (n=7), οξεία μυελογενής λευχαιμία (n=1), λεμφοκυτταρικό λέμφωμα (n=1), καρκίνος παχέος

εντέρου (n=1), χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (n=1), εγκεφαλική αγγειακή νόσος (n=1)

Η διάμεση ηλικία WNNΔ ασθενών: 67 χρόνια (εύρος 19 - 95 χρόνια) και υψηλότερη συχνότητα στους άνδρες (αναλογία ανδρών-γυναικών = 2.5:1). Όλες οι WNNΔ περιπτώσεις εισήχθησαν στο νοσοκομείο, όπου σημειώθηκαν 5 θάνατοι σε ηλικιωμένοι ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα.

1.2. Γεωγραφική κατανομή των WNV κρουσμάτων

Αττική: Π. Φάληρο 14, Ελληνικό 7, Άλιμος 5, Καλλιθέα 3, Πειραιάς 2, Γλυφάδα 2 και από 1 Ν. Σμύρνη, Άγιος Δημήτριος, Ηλιούπολη, Μαρούσι και Βριλήσσια
Στερεά Ελλάδα: από 1 περιστατικό σε Κύμη, Παραλία Αυλίδας και Ωρωπό
Δυτική Ελλάδα: Λευκάδα 2 και από 1 περιστατικό σε Μεγανήσι, Στάμνα, Μεσολόγγι και Αγρίνιο
Νησιά Αιγαίου: Σάμος 2 περιστατικά

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ασθενών με νευροδισδυτική νόσος από WNV λοίμωξη (WNNΔ)

WNNΔ cases 1 - 23						WNNΔ cases 24 - 45					
Case	Ηλικία	Φύλο	Διάγνωση	ορός (Abs) IgM - IgG	ENY (Abs) IgM - IgG	Case	Ηλικία	Φύλο	Διάγνωση	ορός (Abs) IgM - IgG	ENY (Abs) IgM - IgG
C1	67	f	M	M(+), G(+)		C24	70	m	ME	M(+)	M(+)
C2	80	m	ME	M(+)	M(+)	C25	63	f	ME	M(+), G(+)	M(+), G(+)
C3	65	f	M		M(+)	C26	82	m	E	M(+)	M(+)
C4	19	m	ME	M(+), G(+)		C27	60	m	ME		M(+)
C5	19	m	ME	M(+), G(+)		C28	84	f	ME		M(+), G(+)
C6	84	m	E	M(+), G(+)	M(+), G(+)	C29	78	m	E	M(+), G(+)	M(+), G(+)
C7	75	m	M	M(+)		C30	63	m	E	M(+), G(+)	M(+), G(+)
C8	68	m	ME	M(+)		C31	80	f	ME	M(+)	
C9	63	m	M	M(+)	M(+)	C32	42	f	E	M(+)	
C10	67	f	ME		M(+)	C33	45	f	ME	M(+)	M(+), G(+)
C11	65	m	ME	M(+)	M(+)	C34	55	m	ME	M(+)	M(+)
C12	54	m	ME	M(+)		C35	95	f	E	M(+)	
C13	23	f	ME	M(+), G(+)	M(+), G(+)	C36	75	f	M	M(+)	M(+)
C14	84	m	ME	M(+), G(+)	M(+)	C37	19	m	M	M(+)	
C15	84	f	ME	M(+), G(+)	M(+)	C38	84	m	ME	M(+)	M(+)
C16	79	m	ME		M(+)	C39	62	m	ME	M(+), G(+)	
C17	64	m	ME	M(+)	M(+)	C40	85	f	ME	M(+)	
C18	66	f	ME	M(+)	M(+)	C41	57	m	ME	M(+)	
C19	38	f	ME	M(+)		C42	41	f	ME		M(+), G(+)
C20	83	f	ME	M(+)	M(+)	C43	70	f	ME	M(+)	M(+)
C21	84	m	E		M(+)	C44	58	m	ME	M(+)	M(+)
C22	86	m	E		M(+)	C45	64	m	ME	M(+)	M(+)
C23	77	m	E	M(+)							

2. Για το χρονικό διάστημα καλοκαίρι - φθινόπωρο 2013

Συνολικά βρέθηκαν 28 εργαστηριακά διαγνωσμένα κρούσματα WNV λοίμωξης από 258 ασθενείς (10.8%). Από αυτά 15 άτομα (15/28, 53.6%) παρουσίαζαν πυρετός του Δυτικού Νείλου (WNV). Στα άτομα αυτά η διάμεση τιμή του index των αντι-WNV IgM και IgG Abs - δείγματα ορών ήταν 3.60 (εύρος 2.49 – 4.01) και 1.01 (εύρος 0.27 – 3.74), αντίστοιχα.

Τα υπόλοιπα 13 άτομα (13/28, 46.4%) είχαν νευροδισδυτική νόσος από WNV λοίμωξη (WNNND). Συγκεκριμένα 2 ασθενείς είχαν μηνιγγίτιδα, 2 εγκεφαλίτιδα και 9 μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Για τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών η διάμεση τιμή του δείκτη (index) των αντι-WNV IgM και IgG Abs – σε δείγματα ορών ήταν 3.78 (εύρος 3.43 - 5.20) και 0.93 (εύρος 0.18 – 2.57), αντίστοιχα. Η διάμεση τιμή του δείκτη (index) των αντι-WNV IgM και IgG Abs – στα δείγματα ENY ήταν 3.6 (εύρος 2.67 – 3.84) και 0.92 (εύρος 0.23 – 2.98), αντίστοιχα .

Σε κανένα δείγμα ENY και αίματος δεν ανιχνεύτηκε WNV RNA.

Βρέθηκαν 6 ασθενείς με εμπύρετη λοίμωξη αλλά μόνο WNV IgG Abs θετικά σε δείγμα ορού. Στα άτομα αυτά η διάμεση τιμή του index των αντι-WNV IgG Abs ήταν 2.17 (εύρος 1.62 – 3.02).

2.1. Υποκείμενες παθήσεις και παράγοντες κινδύνου στις WNNND περιπτώσεις

Υποκείμενες παθήσεις: υπέρταση (n=5), σακχαρώδης διαβήτης (n=5), στεφανιαία νόσος (n=2), καρκίνος προστάτου (n=1), καρκίνος παχέος εντέρου (n=1) και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (n=1).

Η διάμεση ηλικία WNNND ασθενών: 79 χρόνια (εύρος 17 - 95 χρόνια) και υψηλότερη συχνότητα στους άνδρες (αναλογία ανδρών-γυναικών = 1.3:1). Όλες οι WNNND περιπτώσεις εισήχθησαν στο νοσοκομείο, όπου σημειώθηκαν 1 θάνατος σε ηλικιωμένο ασθενή με υποκείμενα νοσήματα.

2.2. Γεωγραφική κατανομή των WNV κρουσμάτων

Αττική: Παλλήνη 5, Αγ. Παρασκευή 3, από 2 περιστατικά Πόρτο Πάφτη και Γαλάτσι Σπάτα, και από 1 περιστατικό Ν. Ηράκλειο, Αθήνα, Πικέρμι, Βριλήσσια, Αρτέμιδα, Ν. Ψυχικό, Βουλιαγμένη, Μαρούσι, Χαλάνδρι.

Εκτός Αττικής ήταν ένα περιστατικό από Αμαλιάδα.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των ασθενών με νευροδισδυτική νόσο από WNV
λοίμωξη (WNND)

WNND cases 1-13					
Case	Ηλικία	Φύλο	Διάγνωση	Ορός (Abs) IgM - IgG	ENY (Abs) IgM - IgG
C1	78	m	E	M(+) G(+)	M(+) G(+)
C2	83	m	M	M(+)	M(+)
C3	95	f	ME	M(+) G(+)	M(+) G(+)
C4	75	m	ME	M(+)	M(+) G(+)
C5	76	m	ME	M(+)	M(+)
C6		f	ME	M(+)	M(+)
C7	17	m	ME	M(+) G(+)	M(+)
C8	53	f	M	M(+) G(+)	M(+) G(+)
C9	81	m	E	M(+) G(+)	M(+) G(+)
C10	79	m	ME	M(+) G(+)	M(+) G(+)
C11	83	m	ME	M(+) G(+)	M(+) G(+)
C12		f	ME	M(+)	M(+)
C13	81	m	ME	M(+)	M(+)

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η εξάπλωση του ιού και η καταγραφή κρουσμάτων σε περιοχές που δεν είχαν προσβληθεί κατά το 2010-2011 υποδηλώνει ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου παραμένει στην Ελλάδα και η μετάδοση της νόσου μπορεί να συνεχιστεί στο μέλλον.

Η ανίχνευση μόνο αντι-WNV IgG Abs σε ορούς συνολικά 26 ασθενών από τις πρόσφατα πληγείσες περιοχές δείχνει την προηγούμενη κυκλοφορία του ιού σε αυτές τις περιοχές.

Μη ανίχνευση με μοριακές τεχνικές του ιού λόγω αποστολής του δείγματος αφού είχε γίνει έναρξη των συμπτωμάτων και υπήρχαν αντισώματα έναντι του ιού σε ανιχνεύσιμο τίτλο. Η ιαμμία διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα και πριν την έναρξη των συμπτωμάτων (Lanciotti et al., 2000)

Εμφάνιση νευροδεδισδυτική νόσος από WNV λοίμωξη σε άτομα μεγάλης ηλικίας, συνήθως άνδρες, όπως συνέβη και στη δική μας μελέτη (O'Leary et al., 2004). Ύπαρξη παραγόντων κινδύνου, όπως υπέρταση και σακχαρώδης διαβήτης (Jean et al., 2007)

Βιβλιογραφία

Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT. 2000. Rapid detection of west Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. J Clin Microbiol 38:4066-4071.

O'Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, Elko VL, Collins PD, Jones JE, Campbell GL. 2004. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. Vector Borne Zoonotic Dis 4:61-70.

Jean CM, Honarmand S, Louie JK, Glaser CA. 2007. Risk factors for West Nile virus neuroinvasive disease, California, 2005. Emerg Infect Dis 13:1918-1920.

Έκθεση δεδομένων διάγνωσης κρουσμάτων της ελονοσίας σε ανθρώπους και ανάλυση αυτών

Τομέας Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών
Νοσημάτων, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εισαγωγή

Στο παραδοτέο αυτό παρουσιάζονται όλες οι δράσεις που πραγματοποιήθηκαν από την 1^η Ιανουαρίου 2012 έως την 31^η Δεκεμβρίου 2013, όσον αφορά στην εργαστηριακή διάγνωση της ελονοσίας στο εργαστήριο του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας, την συνεχιζόμενη εκπαίδευση του προσωπικού των ιατρικών εργαστηρίων και το σύστημα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου για τη ελονοσία, καθώς και την γονοτύπηση των στελεχών πλασμοδίων από τα περιστατικά του Ελλαδικού χώρου κατά τα έτη 2011 και 2012 (κατά το 2013 δεν παρατηρήθηκε συρροή αυτόχθονων κρουσμάτων), στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο: «Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία – Ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια» με κωδικό MIS365280 από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού» του ΕΣΠΑ 2007-2013 που χρηματοδοτείται μέσω του Υπουργείου Υγείας.

Μεθοδολογία

1. Εργαστηριακή διάγνωση της ελονοσίας στο εργαστήριο του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας

Στο Εργαστήριο έρχονταν δείγματα αίματος. Τα δείγματα προέρχονταν από Νοσοκομεία, Αιμοδοσίες και από το πρόγραμμα ενεργητικής αναζήτησης κρουσμάτων και ελέγχου επαφών σε: α) περιοχές όπου είχε παρατηρηθεί ύπαρξη κρουσμάτων με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης και β) σε στρατόπεδα προσφύγων.

Τα δείγματα καταγράφονταν, έπαιρναν κωδικό και κατόπιν προχωρούσε η διαδικασία της εργαστηριακής διάγνωσης.

- I. Χρώση : από κάθε δείγμα αίματος έγινε ένα επίχρισμα λεπτής στιβάδας και μια παχεία σταγόνα. Η παχεία σταγόνα αιμολύθηκε με νερό, τα παρασκευάσματα σταθεροποιήθηκαν με μεθανόλη και έγινε χρώση με Giemsa 10%. Οι αντικειμενοφόροι στέγνωσαν στον αέρα και ακολούθησε μικροσκόπηση με καταδυτικό φακό X100.
- II. Μέθοδος ταχείας διάγνωσης: χρησιμοποιήθηκαν το κιτ Malaria Ag P.f/ Pan της εταιρείας SD-Bioline . Το συγκεκριμένο κιτ ανιχνεύει το Plasmodium falciparum μέσω της ειδικής histidine-rich protein II (P.f, HRP-II) και το διαφοροδιαγιγνώσκει από τα λοιπά πλασμώδια που έχουν μόνο την πλασμοδιακή γαλακτική αφυδρογονάση (Pan, pLDH). Κατά τη εργαστηριακή διάγνωση ακολουθήθηκε η προτεινόμενη από την εταιρεία διαδικασία. Το 2012 το εργαστήριο είχε μόνο 100 τεστ που τα εξάντλησε, ενώ τον Απρίλιο 2013 παρέλαβε 500 RTDs από το ΚΕΕΛΠΝΟ.
- III. Μοριακές τεχνικές : Η απομόνωση DNA από τα δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις αυτόματες συσκευές Maxwell 16 με το κιτ Maxwell 16 – Blood DNA Purification kit και Invitrogen iPrep με το κιτ iPrep PureLink gDNA Blood kit, σύμφωνα με τις οδηγίες των προμηθευτών.

Η ανίχνευση των πλασμοδίων πραγματοποιήθηκε με multiplex PCR όπως αναπτύχθηκε στο Εργαστήριό μας (Patsoula et al, 2003). Το 2013 εφαρμόστηκε παράλληλα και πρωτόκολλο real-time PCR (Rougemont et al, 2004) που στοχεύει στη διάγνωση όλων των ειδών Plasmodium.

2. Πρόγραμμα εκπαίδευσης προσωπικού ιατρικών εργαστηρίων:

A. 2012: Εκπαιδευτικές ημερίδες για την εργαστηριακή διάγνωση της ελονοσίας. Έγιναν εκπαιδευτικές ημερίδες σε νοσοκομεία και πανεπιστημιακά εργαστήρια. Την εκπαιδευτική ομάδα αποτελούσαν η υπεύθυνη και η τεχνολόγος του εργαστηρίου του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας. Το πρώτο μέρος ήταν εισαγωγικό και είχε διαλέξεις που αναφέρονταν στην ιστορία της ελονοσίας στην Ελλάδα, τον βιολογικό κύκλο του παράσιτου καθώς και την εργαστηριακή διάγνωση της ελονοσίας. Το δεύτερο μέρος είχε άσκηση στο εργαστήριο, όπου οι συμμετέχοντες εκπαιδεύονταν στην προετοιμασία παχείας σταγόνας και λεπτής στιβάδας αίματος, τη χρώση των παρασκευασμάτων, τη μικροσκόπηση θετικών παρασκευασμάτων αίματος με γνωστό παρασιτισμό, τη μέτρηση της παρασιταιμίας, τη μικροσκόπηση τυχαίων παρασκευασμάτων, καθώς και στη χρήση των RTDs στη διάγνωση.

B. 2013 :Εγκαθίδρυση συστήματος εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου για την ελονοσία. Την ευθύνη είχε το εργαστήριο του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας. Ετοιμάστηκαν κασετίνες με βαμμένα επιχρίσματα για το external quality assessment των εργαστηρίων που ασχολούνται με την ελονοσία. Τα πρώτα νοσοκομεία που ενεπλάκησαν ήταν το Γ. Νοσοκομείο Σπάρτης και το Γ. Νοσοκομείο- ΚΥ Μολάων. Στη πρώτη φάση στάλθηκε, μέσω του ΚΕΕΛΠΝΟ, στο Γ. Νοσοκομείο- ΚΥ Μολάων τον Αύγουστο 2013 κασετίνα με 20 δείγματα

(*P.vivax*- διαφορετικές παρασιταίμιες-, *P.falciparum* και αρνητικά) μαζί με τις SOPs (Standard Operating Procedures). Στη δεύτερη φάση ήρθαν στο εργαστήριο του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας, σε δύο παρτίδες, επιχρίσματα που στα νοσοκομεία είχαν βρεθεί αρνητικά, για να ελεγχθεί τόσο η ποιότητα της χρώσης, όσο και η διαγνωστική ευχέρεια των εργαστηρίων.

3. Γονοτυπικός χαρακτηρισμός στελεχών Plasmodium.

Πραγματοποιήθηκε τυποποίηση των στελεχών των ετών 2011 και 2012 με PCR-RFLP τμήματος του γονιδίου MSP-3α βάσει δημοσιευμένου πρωτοκόλλου (Bruce et al, 1999). Λόγω των απεργιών στα Ανώτατα Εκπαιδευτικά Ιδρύματα, αλλά και λόγω γραφειοκρατικών κωλυμάτων, καθυστέρησε η παραγγελία των αναλωσίμων για την ανάλυση 6 θέσεων μικροδορυφορικού DNA στο σύνολο σχεδόν των δειγμάτων, και ανάγνωσης του μιτοχονδριακού DNA σε ένα μικρό αριθμό επιλεγμένων δειγμάτων. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται τώρα χρησιμοποιώντας δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Karunaweera et al, 2008, Iwagami et al, 2010) και ήδη υπάρχουν τα πρώτα αποτελέσματα.

Αποτελέσματα

1. Εργαστηριακή διάγνωση της ελονοσίας στο εργαστήριο του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας :

A. Το 2012 ελέγχθηκαν συνολικά 2496 δείγματα αίματος από Λακωνία, Μαραθώνα, Μαρκόπουλο, Αθήνα, Καρδίτσα, Θήβα, Τρίκαλα, Χαλκίδα, Ξάνθη, Κόρινθο, Θεσσαλονίκη και Λάρισα. Τα περισσότερα δείγματα (1272) ήταν από την Λακωνία.

α. Ενεργητική αναζήτηση κρουσμάτων – έλεγχος επαφών: 1661

β. Αιμοδοσίες: 716

γ. Νοσοκομεία/ Ιδιώτες: 119

- Σε όλα (2496) εξετάσθηκαν τα βαμμένα επιχρίσματα (λεπτή στιβάδα- παχεία σταγόνα)
- Στα 1725 έγινε PCR
- Στα 100 έγινε RDT

Θετικά για *P. νίναχ* βρέθηκαν τα 76

B. Το 2013 ελέγχθηκαν 440 δείγματα αίματος από Λακωνία, Αθήνα, Αττική, Θήβα, Καρδίτσα, Λάρισα και Έβρο.

α. Ενεργητική αναζήτηση κρουσμάτων – έλεγχος επαφών: 87

β. Αιμοδοσίες: 272

γ. Νοσοκομεία/ Ιδιώτες: 81

- Σε όλα (443) εξετάσθηκαν τα βαμμένα επιχρίσματα (λεπτή στιβάδα- παχεία σταγόνα)
- Στα 442 έγινε PCR
- Σε όλα έγινε RDT

Θετικά για *P. νίναχ* βρέθηκαν τα 10

Αποτελέσματα από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών:

Από τον Απρίλιο του 2012 ως και τον Ιούλιο 2012 εξετάσθηκαν με PCR για την ανίχνευση των πλασμοδίων της ελονοσίας *P.falciparum* και *P.vivax* συνολικά 254 δείγματα αίματος που συνελέγησαν από την περιοχή Σκάλα Λακωνίας και από την περιοχή Μαραθώνα Αττικής, από Έλληνες και αλλοδαπούς.

Συγκεκριμένα, αρχικά ελέγχθηκαν 38 δείγματα αίματος από Έλληνες και μετανάστες, στα πλαίσια της πιλοτικής μελέτης στη Σκάλα Λακωνίας.

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν 93 δείγματα αίματος από μετανάστες στην περιοχή της Λακωνίας και 123 δείγματα από μετανάστες στην περιοχή του Μαραθώνα Αττικής.

Όλα τα δείγματα αίματος που ελέγχθηκαν έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα στην PCR τόσο για το *P.falciparum* όσο και για το *P.vivax*.

2. Πρόγραμμα εκπαίδευσης προσωπικού ιατρικών εργαστηρίων:

A. Μέσα στο 2012 έγιναν 10 εκπαιδευτικές ημερίδες για την εργαστηριακή διάγνωση της ελονοσίας σε Καλαμάτα (1/3/2012), Κυπαρισσία (2/3/2012), Αθήνα (30/3/2012), Αθήνα (5/4/2012), Αθήνα (6/4/2012), Θεσσαλονίκη (3/5/2012), Θεσσαλονίκη (4/5/2012), Λάρισα (20/6/2012), Αλεξανδρούπολη (5/7/2012), Λαμία (18/7/2012). Εκπαιδεύτηκαν συνολικά 140 Βιοπαθολόγοι και 25 Τεχνολόγοι Ιατρικών Εργαστηρίων, στους οποίους χορηγήθηκε πιστοποιητικό παρακολούθησης.

B. Στα πλαίσια του συστήματος εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου ήρθαν στο εργαστήριο του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας 22 βαμμένα επιχρίσματα από το ΓΝ-ΚΥ Μολάων και 21 από το ΓΝ Σπάρτης. Η ποιότητα της χρώσης ήταν ικανοποιητική και επιβεβαιώθηκε το αρνητικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα από την κασετίνα με τα θετικά-αρνητικά δείγματα αναμένονται.

3. Γονοτυπικός χαρακτηρισμός στελεχών Plasmodium

Έχουν χαρακτηριστεί γονοτυπικά με PCR-RFLP του MSP-3α γονιδίου όλα τα διαθέσιμα στελέχη από τα έτη 2011 (n=40) και 2012 (n=70), εκτός τριών, που φαίνεται να έχουν μικτή μόλυνση και υπάρχουν δυσχέρειες στην παραγωγή και των δύο RFLP προτύπων. Η ολοκλήρωση της γονοτύπησης και με την χρησιμοποίηση και των υπόλοιπων δεικτών αναμένεται να διευκρινίσει και αυτά τα στελέχη.

Τα αναλυτικά αποτελέσματα είναι διαθέσιμα.

4. Παρουσιάσεις αποτελεσμάτων

- A. Spanakos G, Alifrangis M, Schousboe ML, Patsoula E, Tegos N, Hansson HH, Bygbjerg IC, Vakalis NC, Tseroni M, Kremastinou J and Hadjichristodoulou C. **Genotyping Plasmodium vivax isolates from the 2011 outbreak in Greece.** Malaria Journal (approved 12/17/2013)

Το άρθρο αναφέρεται στη γονοτύπηση των στελεχών του 2011. Με την συνδρομή του εργαστηρίου Center for Medical Parasitology, University of Copenhagen, τα στελέχη του 2011 γονοτυπήθηκαν σε δύο επιπλέον μικροδορυφορικές ακολουθίες, τις m1501 και m3502. Τα ευρήματα δείχνουν την διασπορά δύο στελεχών με όμοιους γονότυπους μεταξύ των αυτόχθονων περιστατικών στην περιοχή της Λακωνίας, αλλά επίσης την ύπαρξη αυτών των στελεχών και μεταξύ μεταναστών από ενδημικές για την ελονοσία χώρες. Αυτό είναι ενδεικτικό της μόλυνσης κάποιων εκ των μεταναστών στην περιοχή της Λακωνίας. Περαιτέρω τίθεται και ένα ερώτημα για την διασπορά στελέχους με γονότυπο που χαρακτηρίστηκε C3 στην περιοχή της Ανατολικής Αττικής, καθώς παρατηρήθηκε σε άτομα που μένουν σε απόσταση μεγαλύτερη των 30 χιλιομέτρων.

- B. Η υπεύθυνη του εργαστηρίου του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας μετείχε στο meeting του ECDC με θέμα «Consultation on laboratory capacity building for malaria diagnosis in the EU/EEA» Stockholm, 12 – 13 February 2013 και



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



παρουσίασε το θέμα «**Malaria Laboratory Testing in Different Epidemiological Settings: the example of Greece**»

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Οι απαντήσεις δίνονταν σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και διευκόλυναν αφενός τη ταχεία χορήγηση θεραπευτικής αγωγής στους νοσούντες και αφετέρου το προγραμματισμό δράσεων για τη καταπολέμηση της νόσου.

Παρόλο που γινόταν πάντα έλεγχος επιχρίσματος και παχείας σταγόνας για όλους τους ασκούς των αιμοδοσιών, ειδικά σε Λακωνία και Α. Αττική, φάνηκε τελικά ότι οι μοριακοί έλεγχοι ήταν οι μόνοι κατάλληλοι να δώσουν αξιόπιστη απάντηση σε τυχόν περιπτώσεις πολύ μικρής παρασιταμίας.

Επιπρόσθετα το 2013 εφαρμόσθηκε και πρωτόκολλο real-time PCR που στοχεύει στη διάγνωση της ελονοσίας και τα αποτελέσματα σε όλα τα δείγματα ήταν σε πλήρη συμφωνία με το πρωτόκολλο της συμβατικής multiplex PCR. Η real-time PCR φάνηκε να υπερτερεί όσον αφορά στο μικρότερο χρόνο ολοκλήρωσης του εργαστηριακού ελέγχου και στην ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Τα RTDs αποδείχθηκαν πολύ αποτελεσματικό εργαλείο για την μελέτη πεδίου. Όλα τα θετικά *P. vivax* που ανιχνεύτηκαν το 2012 με RTDs στην ενεργητικά αναζήτηση κρουσμάτων και τον έλεγχο επαφών επιβεβαιώθηκαν στο εργαστήριο, τόσο μικροσκοπικά, όσο και μοριακά. Το 2013 χρησιμοποιήθηκαν και στο εργαστήριο σαν συμπληρωματική εξέταση σε όλα τα δείγματα και έδωσε επίσης απολύτως αξιόπιστα αποτελέσματα.

Εξ άλλου, το πρόγραμμα εκπαίδευσης του προσωπικού των ιατρικών εργαστηρίων απάντησε σε μια ανάγκη, γιατί δεδομένου ότι η Ελλάδα ήταν μια χώρα ελεύθερη ελονοσίας από το 1974, οι γιατροί και τεχνολόγοι είχαν πολύ μικρή εμπειρία στη διάγνωση, μέσα από τα σπάνια εισαγόμενα περιστατικά για 30 και πλέον χρόνια. Από την άλλη, ελάχιστα Εργαστήρια νοσοκομείων έχουν εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο για παράσιτα του αίματος, κυρίως λόγω κόστους. Η τράπεζα επιχρισμάτων του εργαστήριου του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας θα μπορούσε να βοηθήσει στην

οργάνωση ενός ελληνικού συστήματος εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου για την ελονοσία.

Όσον αφορά στην γονοτύπηση, τα αποτελέσματα δείχνουν μία ποικιλία προτύπων RFLP μεταξύ των στελεχών που έφερε η πλειοψηφία των μεταναστών από ενδημικές περιοχές και ταξιδιώτες. Τα πρότυπα που παρουσίαζαν δεν συμπίπτουν με τα πρότυπα των αυτόχθονων δειγμάτων. Αυτό είναι ενδεικτικό του μεγάλου αριθμού διαφορετικών στελεχών που εισάγονται στην Ελλάδα κυρίως μέσω των μεταναστών, αφού σε αυτούς ανήκει η πλειονότητα των περιστατικών.

Σημαντικός αριθμός στελεχών από την περιοχή της Λακωνίας κατά τα έτη 2011 και 2012, έφερε όμοιο πρότυπο RFLP του MSP-3α γονιδίου (που χαρακτηρίστηκε A10). Με δεδομένο ότι το πρότυπο A10 έχει ανιχνευτεί μόνο σε δείγματα που αποδίδονται σε μόλυνση από την περιοχή της Λακωνίας, είναι αυξημένη η πιθανότητα ότι τουλάχιστον ένα στέλεχος Plasmodium, διαβιβάστηκε στην περιοχή και κατά τις δύο περιόδους μετάδοσης. Το γεγονός καθιστά την περιοχή επίφοβη για την εγκατάσταση της ελονοσίας. Είναι σημαντικό, αυτά τα δεδομένα να ληφθούν υπ' όψιν για την αυξημένη επιτήρηση της περιοχής.

Στην περιοχή της Ανατολικής Αττικής επίσης, κατά το 2012 παρατηρήθηκαν τέσσερα αυτόχθονα περιστατικά με κοινό πρότυπο RFLP (χαρακτηρίστηκε σαν C3), που παρουσιάστηκε και σε δύο δείγματα του 2011. Καθώς είναι μικρή η ποικιλομορφία των προϊόντων PCR του τύπου C λόγω του μικρού μεγέθους παραμένει σε εκκρεμότητα η αξιολόγηση του φαινομένου. Αναμένεται ότι η οριστική απάντηση θα προκύψει μετά την εξέταση και των υπόλοιπων δεικτών, που είναι σε εξέλιξη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η περιοχή της Καρδίτσας, στην οποία παρατηρήθηκε συρροή κρουσμάτων μεταξύ μεταναστών από ενδημικές αλλά και μη ενδημικές χώρες. Παρατηρήθηκαν δύο διαφορετικά πρότυπα RFLP, σε οκτώ περιστατικά, που είναι ενδεικτικό της αυξημένης, σε σχέση με άλλες περιοχές της Ελλάδας, τοπικής μετάδοσης του πλασμοδίου.

Το εργαστήριο του Κέντρου Αναφοράς Ελονοσίας, μέσα από την εμπειρία και την τεχνογνωσία του, μπόρεσε να απαντήσει γρήγορα και αποτελεσματικά στην επείγουσα κατάσταση που δημιουργήθηκε με την εμφάνιση κρουσμάτων ελονοσίας με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης. Το εργαστήριο μπόρεσε επίσης να απαντήσει αξιόπιστα και στο πρόβλημα της ασφάλειας του αίματος.

Η χρησιμότητα της γονοτύπησης στην επιδημιολογική διερεύνηση των επιδημικών εξάρσεων της ελονοσίας στην χώρα μας, εντοπίζεται με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, στην διευκρίνηση της προέλευσης περιστατικών σε μετανάστες προερχόμενους από ενδημικές για την ελονοσία χώρες για τους οποίους δεν υπήρχε αξιόπιστο ιατρικό και ταξιδιωτικό ιστορικό κυρίως κατά το έτος 2011.

Περαιτέρω εντοπίστηκαν οι περιοχές που λόγω ιδιαιτέρων συνθηκών, εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα εγκατάστασης της ελονοσίας, αφού εκεί παρατηρείται συνεχής μετάδοση ενός στελέχους πλασμοδίου, και πιθανώς και η μετάδοση του για δεύτερη συνεχή χρονιά. Συνεπώς οι περιοχές της Λακωνίας, Ανατολικής Αττικής και Καρδίτσας, είναι χρήσιμο να επιτηρούνται, όταν υπάρχουν στις περιοχές αυτές πιθανοί φορείς ελονοσίας και να ενημερώνονται οι υγειονομικές υπηρεσίες ώστε να είναι σε εγρήγορση για την πρόληψη μετάδοσης του νοσήματος.

Βιβλιογραφία

1. Βακάλης Ν (2003). *Ιατρική Παρασιτολογία*. Αθήνα, Εκδόσεις Ζήτα
2. WHO. *Basic Malaria Microscopy. Part I. Learner's guide*. 2nd Edition. 2010
3. Médecins Sans Frontières. *Malaria Diagnostics. Blood film preparation for malaria diagnosis*. Version: Draft 1 / 7-2012
4. Research Institute for Tropical Medicine, Philippines/ WHO Western Pacific. *Malaria Slide Bank. Standard Operating Procedures*. Version 4. July 2012
5. Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, Day KP. **Polymorphism at the merozoite surface protein-3α locus of Plasmodium vivax: Global and local diversity**. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61:518–525).
6. Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell LW, Collins WE, King CL, Kawamoto F, Hartl DL, Wirth DF. **Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite Plasmodium vivax**. *Gene* 2008, 410:105-112
7. Iwagami M, Hwang SY, Fukumoto M, Hayakawa T, Tanabe K, Kim SY, Kho WG, Kano S. **Geographical origin of Plasmodium vivax in the Republic of Korea: haplotype network analysis based on the parasite's mitochondrial genome**. *Malaria Journal* 2010, 9:184).
8. Patsoula E, Spanakos G, Sofianatou D, Parara M, Vakalis N. **A single step, PCR-based method for the detection and differentiation of Plasmodium vivax and P. falciparum**. *Annals Trop Med Parasitol* 2003, 97:15-21)
9. Mathieu Rougemont, Madeleine Van Saanen, Roland Sahli, Hans Peter Hinrikson, Jacques Bille and Katia Jaton. **Detection of Four Plasmodium Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays**. *Journal of Clinical Microbiology* 2004 42:12 5636-5643).