

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

'ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ'

ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:

**«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΣΕ ΑΓΡΙΑ ΠΤΗΝΑ
ΣΤΗ ΘΕΣΣΑΛΙΑ»**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ ΤΣΟΚΑΝΑ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

'ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ'

ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:

**«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΣΕ ΑΓΡΙΑ ΠΤΗΝΑ
ΣΤΗ ΘΕΣΣΑΛΙΑ»**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ ΤΣΟΚΑΝΑ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

| | | |
|---------------------|---------------------------|-----------------------|
| Καθηγητής Π.Θ. | Μπιλλίνης Χαράλαμπος | Επιβλέπων |
| Καθηγητής Π.Θ. | Χατζηχριστοδούλου Χρήστος | Μέλος Συμβ. Επιτροπής |
| Επ. Καθηγήτρια Π.Θ. | Αθανασίου Λαμπρινή | Μέλος Συμβ. Επιτροπής |

Στους γονείς μου Νίκο και Άννα
και στα αδέρφια μου Δημήτρη, Φάνη και Κατερίνα

«ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΣΕ ΑΓΡΙΑ ΠΤΗΝΑ ΣΤΗ ΘΕΣΣΑΛΙΑ»

Σημαντικοί Όροι: άγρια πτηνά, ιός της γρίπης των πτηνών, Θεσσαλία, Ελλάδα

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας του ιού της γρίπης Α σε άγρια πτηνά στην περιοχή της Θεσσαλίας.

Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν ιστοτεμάχια από 40 υδρόβια άγρια πτηνά που θηρεύτηκαν στην περιοχή της Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια των κυνηγετικών περιόδων 2012-2013 και 2013-2014. Τα ιστοτεμάχια που συλλέχθηκαν από τα άγρια πτηνά, υποβλήθηκαν σε εκχύλιση RNA και στη συνέχεια εξετάστηκαν με Αντίστροφη μεταγραφή-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) για την ανίχνευση μιας περιοχής του γονιδίου Matrix (M). Σε τέσσερα (δύο πτηνά του είδους *Anas platyrhynchos* και δύο του είδους *Anas crecca*) από τα 40 δείγματα άγριων πτηνών που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε η παρουσία του ιού της γρίπης τύπου Α.

Η παρουσία του ιού της γρίπης σε άγρια πτηνά στη Θεσσαλία υπογραμμίζει την ανάγκη για διερεύνηση της κατανομής του ιού της γρίπης Α σε άγρια πτηνά στην Ελλάδα. Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός των υπότυπων του ιού της γρίπης που κυκλοφορούν στη χώρα μας και ο προσδιορισμός της κατανομής του ιού σε γεωγραφικό επίπεδο και επίπεδο ξενιστών, θα προσέφερε σημαντικές πληροφορίες για τη λήψη μέτρων πρόληψης με απώτερο στόχο την αποφυγή της μόλυνσης των οικόσιτων ζώων και την προστασία της Δημόσιας Υγείας.

“INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS IN WILD BIRDS IN THESSALY”

Important terms: wild birds, avian influenza virus, Thessaly, Greece

Abstract

This study aimed to investigate the presence of *Influenza A* virus in wild birds in the region of Thessaly.

For this purpose, 40 tissue samples were collected from wild aquatic birds being hunter-harvested in Thessaly, during the 2012-2013 and 2013-2014 hunting seasons. RNA extraction was performed in tissue samples collected from wild birds, followed by RT-PCR for the detection of the Matrix (M) gene. Four (two *Anas platyrhynchos* and two *Anas crecca* species) out of the 40 samples of wild birds examined, were found positive for the presence of *Influenza A* virus.

The presence of *Influenza A* virus in wild birds in Thessaly, highlights the need for investigation of the *Influenza A* virus distribution in Greece. Furthermore, the characterization of *Influenza A* virus subtypes circulating in our country and the determination of the virus distribution in geographical and host level, would provide

important information for the establishment of prevention measures in order to avoid the virus transmission to domestic animals and for the Public Health protection.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|------------------------|---------|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ..... | σελ.Ι |
| ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ..... | σελ.ΙΙΙ |
| ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ..... | σελ.ΙV |

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

- i. Ταξινόμησησελ.1
- ii. Μορφολογία του Ιού της Γρίπης Ασελ.2

II. Η ΓΡΙΠΗ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

- i. Ιστορική Αναδρομή.....σελ.3
- ii. Παθογένεια του Ιού της Γρίπης.....σελ.5
- iii. Κλινική εικόνα.....σελ.6
- iv. Μετανάστευση και Ιός της Γρίπης των πτηνών.....σελ.7
- v. Επιζωοτιολογία.....σελ.9
- vi. Εξάρσεις των Ιών της Γρίπης των Πτηνών (AIV).....σελ.14
- vii. Εργαστηριακή Διάγνωση.....σελ.17
- viii. Η Νόσος στην Ελλάδα.....σελ.18

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....σελ.21

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- i. Δείγματα άγριων πτηνών.....σελ.21
- ii. Αντίστροφη μεταγραφή-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμέρασης
(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction- RT-PCR).....σελ.22

- 1. Εκχύλιση του νουκλεϊκού οξέος (RNA) του ιού από ιστοτεμάχια άγριων πτηνών.....σελ.22
- 2. Εκκινητές.....σελ.23
- 3. Διαδικασία σύνθεσης cDNA και PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου σε ένα βήμα.....σελ.24

- iii. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....σελ.27

| | |
|------|--|
| iv. | Χαρτογραφική απόδοση δακτυλιώσεων.....σελ.29 |
| III. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....σελ.29 |
| IV. | ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....σελ.34 |
| | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.42 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο 2012-2014, στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εκπονήθηκε υπό την εποπτεία του Καθηγητή Ιολογίας-Ιογενών Νοσημάτων του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Χαράλαμπου Μπιλλίνη.

Θερμά ευχαριστώ τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Χαράλαμπο Μπιλλίνη που με τίμησε με την εμπιστοσύνη του και με επέβλεψε μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης μου, υποστηρίζοντάς με ουσιαστικά και αδιάλειπτα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ. κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο και την Επίκουρη Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Γενικής Παθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., κα Αθανασίου Λαμπρινή, για τις σημαντικές υποδείξεις και παρατηρήσεις τους.

Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας Άγριας Πανίδας του Τμήματος Δασοπονίας & Διαχείρισης Φυσικού Περιβάλλοντος του ΤΕΙ Λάρισας, κ. Μπίρτσα Περικλή και το μέλος ΕΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ. κ. Γιαννακόπουλο Αλέξιο, για τη συλλογή των δειγμάτων και τις πολύτιμες πληροφορίες που μου παρείχαν σχετικά με την οικολογία των άγριων πτηνών που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο συνάδελφο και Υποψήφιο Διδάκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Βαλιάκο Γεώργιο, για τη σημαντική του συμβολή στην

ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της μελέτης μου και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επίσης ευχαριστώ το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την οικονομική στήριξη που μου προσέφερε κάνοντας πραγματικότητα τη βαθιά μου επιθυμία για μεταπτυχιακές σπουδές.

Τέλος, το μεγαλύτερο και βαθύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το εκφράσω στους γονείς μου Νίκο και Άννα, στα αδέρφια μου Δημήτρη, Φάνη και Κατερίνα και στο φίλο μου Κώστα που με την πίστη τους και την πολυδιάστατη υποστήριξή τους με βοήθησαν να πετύχω αυτό που επιθυμούσα.

Η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής έγινε στο πλαίσιο της υλοποίησης του μεταπτυχιακού προγράμματος το οποίο συγχρηματοδοτήθηκε μέσω της Πράξης «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ με διαδικασία εξατομικευμένης αξιολόγησης ακαδ. έτους 2012-2013» από πόρους του Ε.Π. «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) και του ΕΣΠΑ (2007-2013)»



ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|---|--|
| Εικόνα 1. Οι υπότυποι HA (H1-H16) και NA (N1-N9) των ιών του γένους Influenza A που έχουν απομονωθεί από πτηνά, χοίρους και ανθρώπους.....σελ.2 | |
| Εικόνα 2. Το σωματίδιο του ιού της γρίπης τύπου A.....σελ.3 | |
| Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της μετάδοσης του ιού της γρίπης A μεταξύ διαφορετικών ειδών (A) και ειδικά ο τρόπος μετάδοσης του HPAI H5N1 (B)..σελ.13 | |
| Εικόνα 4. Χάρτης γεωγραφικής κατανομής πτηνών που βρέθηκαν θετικά στον ιό της γρίπης H5N1 στην Ελλάδα.....σελ.19 | |
| Εικόνα 5. Χάρτης απεικόνισης των μεταναστευτικών διαδρομών των μεταναστευτικών πτηνών στην Ελλάδα.....σελ.20 | |
| Εικόνα 6. Απεικόνιση της διαδικασίας σύνθεσης του cDNA με αντίστροφη μεταγραφή..σελ.24 | |
| Εικόνα 7. Η διαδικασία της PCR.....σελ.25 | |
| Εικόνα 8. Απεικόνιση των κύκλων ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου με την τεχνική της PCR.....σελ.26 | |
| Εικόνα 9. Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων RT-PCR από τα δείγματα άγριων πτηνών της παρούσας μελέτης.....σελ.32 | |
| Εικόνα 10. Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων RT-PCR από τα δείγματα άγριων πτηνών της παρούσας μελέτης.....σελ.32 | |
| Εικόνα 11. Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων RT-PCR από τα δείγματα άγριων πτηνών της παρούσας μελέτης.....σελ.33 | |
| Εικόνα 12. Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων RT-PCR από τα δείγματα άγριων πτηνών της παρούσας μελέτης.....σελ.33 | |
| Εικόνα 13. Χάρτης εξάπλωσης του είδους <i>Anas crecca</i> στην Ελλάδα.....σελ.36 | |
| Εικόνα 14. Χάρτης εξάπλωσης του είδους <i>Anas platyrhynchos</i> στην Ελλάδα...σελ.37 | |
| Εικόνα 15. Θέσεις επανεύρεσης δυο πτηνών του είδους <i>Anas platyrhynchos</i> στο Δέλτα Έβρου.....σελ.38 | |
| Εικόνα 16. Χάρτης απεικόνισης των περιοχών δακτυλίωσης και επανεύρεσης των ειδών <i>Anas crecca</i>σελ.39 | |
| Εικόνα 17. Χάρτης απεικόνισης των περιοχών δακτυλίωσης και επανεύρεσης των ειδών <i>Anas platyrhynchos</i>σελ.39 | |

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Οι Τάξεις, οι Οικογένειες, τα είδη και ο αριθμός των άγριων πτηνών που εξετάστηκαν για την παρουσία του ιού της γρίπης και η χρονική περίοδος που επιτρέπεται η θήρα για το κάθε είδος άγριου πτηνού.....σελ.21

Πίνακας 2. Αλληλουχία των εκκινητών που είναι ειδικοί για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου Matrix (M) του ιού της γρίπης A.....σελ.24

Πίνακας 3. Τα αντιδραστήρια και ο όγκος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μίγματος αντίδρασης της RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου M της γρίπης τύπου A με το kit OneStep RT-PCR (Qiagen).....σελ.26

Πίνακας 4. Συνθήκες της RT-PCR για τους ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο M του ιού της γρίπης A.....σελ.27

Πίνακας 5. Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων εξέτασης των δειγμάτων άγριων πτηνών με RT-PCR, των περιοχών της Θεσσαλίας και των περιόδων θήρας που συλλέχθηκαν τα άγρια πτηνά που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.....σελ.29

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΙΟΙ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

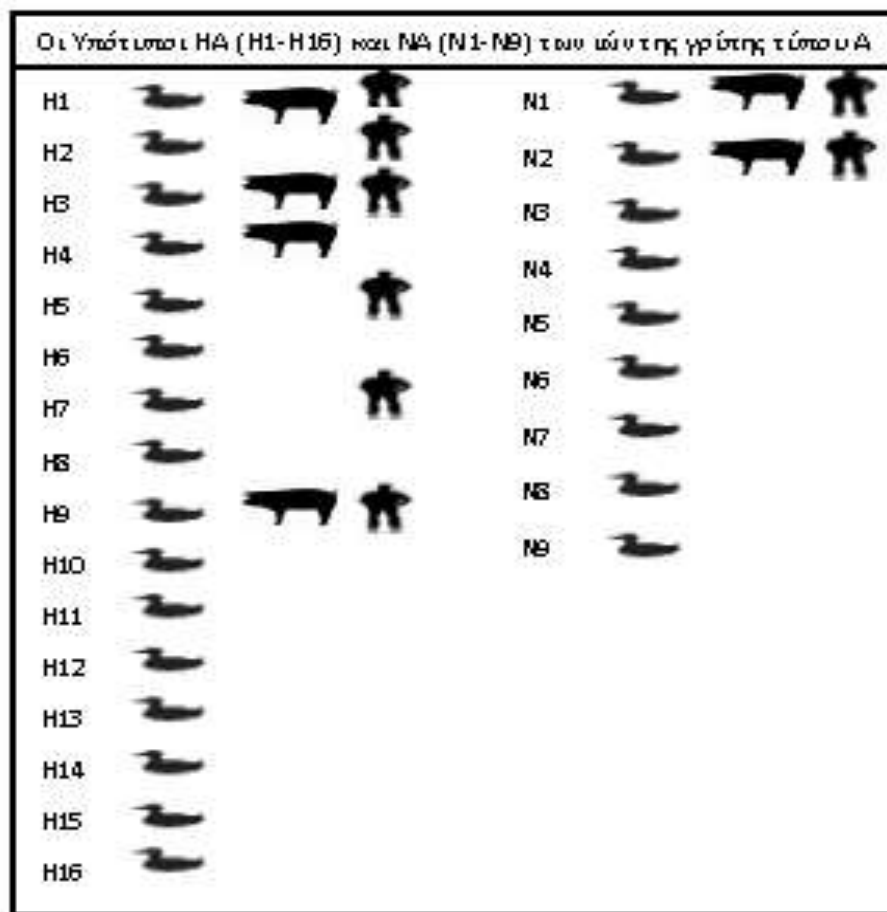
i. Ταξινόμηση

Οι ιοί της γρίπης των πτηνών ταξινομούνται στο γένος *Influenzavirus A* της οικογένειας *Orthomyxoviridae*. Η οικογένεια *Orthomyxoviridae* αποτελείται από τα γένη *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus* και *Isavirus*. Οι ιοί του γένους *Influenzavirus A* είναι οι μόνοι ορθομυξοϊοί που είναι γνωστό ότι προσβάλλουν τα πτηνά (Alexander, 2007). Η ταξινόμηση στα γένη *Influenza A*, *B*, *C* γίνεται βάσει των αντιγονικών διαφορών των πρωτεϊνών του νουκλεοκαψιδίου (NP-Nucleoprotein) και του περιβλήματος (M-Matrix Protein).

Ο ιός της γρίπης των πτηνών ανήκει στο γένος *Influenza A*, το οποίο ταξινομείται περαιτέρω σε υπότυπους με βάση την αντιγονικότητα των μορίων γλυκοπρωτεΐνης του περιβλήματος, δηλαδή της αιμοσυγκολλητίνης (Hemagglutinin, HA) και της νευραμινιδάσης (Neuraminidase, NA) ("A revision of the system of nomenclature for influenza viruses," 1980). Μέχρι στιγμής, έχουν αναγνωριστεί 16 υπότυποι HA (H1-H16) και 9 υπότυποι NA (N1-N9) (Fouchier et al., 2005) (Εικόνα 1). Οι περισσότεροι συνδυασμοί των 16 HA και 9 NA υπότυπων των ιών της γρίπης έχουν απομονωθεί από οικόσιτα και άγρια πτηνά αλλά η κατανομή τους ποικίλει ανάλογα με το χρόνο, τη γεωγραφική περιοχή και τα είδη των ξενιστών ("A revision of the system of nomenclature for influenza viruses," 1980).

Οι ιοί της γρίπης ταξινομούνται επίσης, με βάση τη λοιμογόνου τους δύναμη σε οικόσιτα πτηνά, σε ιούς υψηλής λοιμογόνου δύναμης (High Pathogenicity Avian Influenza Virus - HPAIV) και ιούς χαμηλής λοιμογόνου δύναμης (Low Pathogenicity Avian Influenza Virus-HPAIV). Για τον προσδιορισμό της λοιμογόνου δύναμης των ιών της γρίπης χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι. Σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο, ένας ιός ταξινομείται ως HPAI, εάν προκαλεί θάνατο σε έξι ή περισσότερα από τα οχτώ ευπαθή κοτόπουλα ηλικίας 4-8 εβδομάδων, 10 ημέρες μετά τον ενδοφλέβιο ενοφθαλμισμό τους με μολυσματικό αλλαντοϊκό υγρό τίτλου HA μεγαλύτερο από 1/16. Κατά τη δεύτερη μέθοδο, κάθε ιός που έχει δείκτη ενδοφλέβιας λοιμογόνου δύναμης (intravenous pathogenicity index-IVPI) μεγαλύτερο από 1.2 σε ευπαθή κοτόπουλα ηλικίας 4-8 εβδομάδων, ταξινομείται επίσης ως HPAI. Για όλους του ιούς των υπότυπων H5 και H7 που είναι χαμηλής λοιμογόνου δύναμης για τα κοτόπουλα, πρέπει να προσδιορίζεται η αλληλουχία των αμινοξέων του συνδετικού πεπτιδίου της αιμοσυγκολλητίνης. Αν η αλληλουχία είναι όμοια με αυτές που έχουν παρατηρηθεί σε άλλα στελέχη του ιού που έχουν ταξινομηθεί ως HPAI, το στέλεχος αυτό πρέπει επίσης να θεωρείται HPAI. Επομένως, οι ιοί των υπότυπων H5 και H7 που δεν είναι λοιμογόνοι για τα κοτόπουλα και δεν έχουν όμοιες αλληλουχίες αμινοξέων στο σημείο διάσπασης της HA0 με αυτές που έχουν παρατηρηθεί σε HPAI ιούς, θεωρούνται LPAI ιοί. Επίσης, οι ιοί διαφορετικοί

του υπότυπου H5 ή H7 και που δεν είναι λοιμογόννοι για τα κοτόπουλα θεωρούνται LPAI (International Office of Epizootics and Biological Standards Commission, 2012).



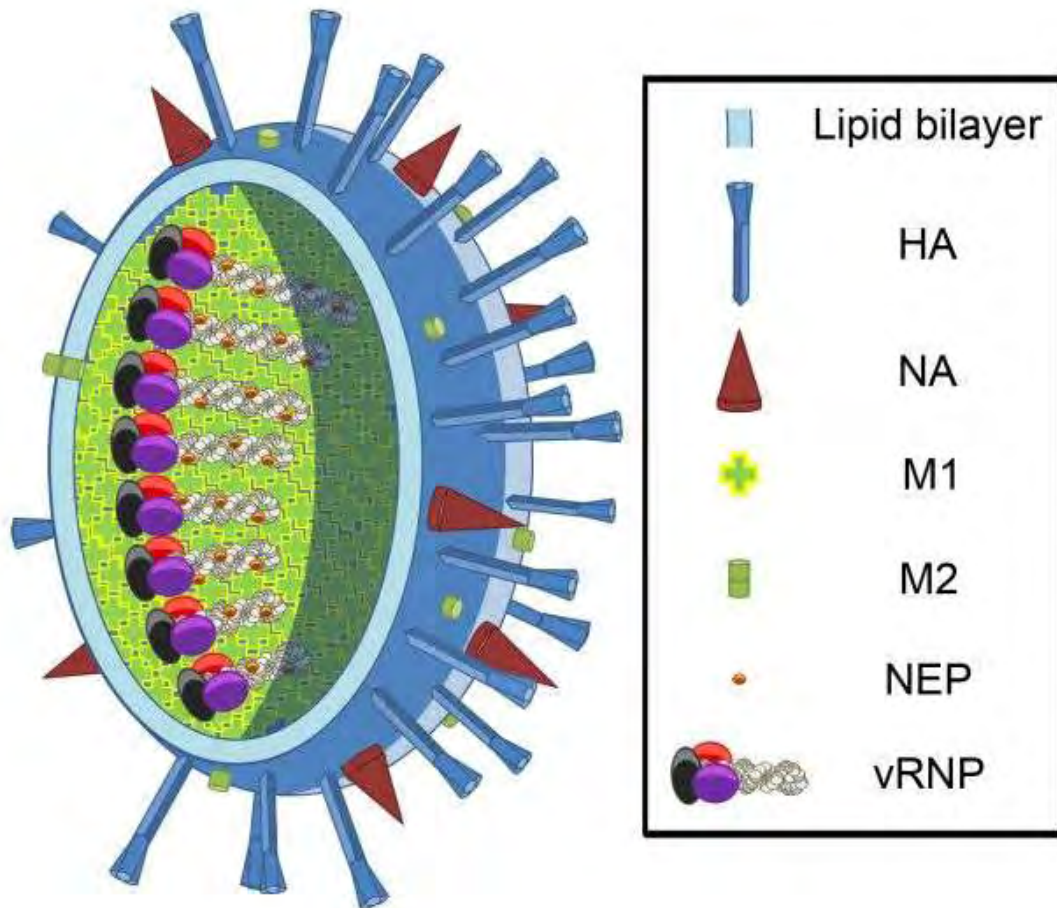
Εικόνα 1. Οι υπότυποι HA (H1-H16) και NA (N1-N9) των ιών του γένους *Influenza A* που έχουν απομονωθεί από πτηνά, χοίρους και ανθρώπους.

ii. Μορφολογία του Ιού της Γρίπης A

Οι ιοί του γένους *Influenza A* έχουν πολυμορφική δομή και φέρουν περίβλημα. Το πλήρως σχηματισμένο ιικό σωματίδιο είναι κατά κανόνα σφαιρικό με διάμετρο περίπου 100 nm (Εικόνα 2). Παρ'όλα αυτά, έχουν παρατηρηθεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και νηματοειδής μορφές του ιικού σωματιδίου που μπορεί να φτάσουν και τα 300nm. Το περίβλημα του σωματιδίου είναι λιποπρωτεϊνικής φύσης. Αποτελείται από διπλή στιβάδα λιπιδίων, που προέρχεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, και από ιικές πρωτεΐνες. Στην επιφάνεια του υπάρχουν προεκβολές, μήκους 10-14 nm και διαμέτρου 4-6 nm, που αντιπροσωπεύουν τις ιικές γλυκοπρωτεΐνες HA και NA σε αναλογία 4:1 (Palese P. & Shaw M., 2007).

Εσωτερικά του περιβλήματος, βρίσκεται η βασική μεμβράνη (Matrix), που αποτελείται από δύο πρωτεΐνες (M1 και M2), οι οποίες συμμετέχουν στη δομή του περιβλήματος. Ο πυρήνας περιέχει το σύμπλεγμα της ριβονουκλοεπρωτεΐνης (Ribonucleoprotein complex - RNP complex) που αποτελείται από το γενωμικό RNA, τις πολυμεράσες (PB1, PB2

και PA) και τη νουκλεοπρωτεΐνη (NP). Τέλος, στο εσωτερικό του ιού βρίσκεται η πρωτεΐνη NEP/NS2 (Nuclear Export Protein / Non Structural Protein 2). Το γένωμα των ιών της γρίπης Α αποτελείται από οχτώ τμήματα μονόκλωνου γραμμικού RNA αρνητικής πολικότητας (Noda et al., 2006).



Εικόνα 2. Το σωματίδιο του ιού της γρίπης Α

Το γένωμα του ιού της γρίπης Α αποτελείται από οχτώ τμήματα μονόκλωνου RNA αρνητικής πολικότητας. Στο περίβλημα του σωματιδίου προβάλλουν τρεις πρωτεΐνες, οι HA, NA και M2. Η πρωτεΐνη M1 βρίσκεται στο εσωτερικό της λιπιδικής μεμβράνης και αλληλεπιδρά με το ελικοειδές σύμπλεγμα RNP. Το RNA μαζί με το σύμπλεγμα των πολυμερασών και του νουκλεοκασιδίου σχηματίζει το σύμπλεγμα RNP. Οι πρωτεΐνες NS1 και NS2 είναι μη δομικές πρωτεΐνες (Rosas-Acosta 2013).

Η ΓΡΙΠΗ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

i. Ιστορική Αναδρομή

Η γρίπη των πτηνών αναφέρθηκε πρώτη φορά ως «πανώλη των πτηνών» το 1878 από τον Perroncito στην Ιταλία (Suarez & Schultz-Cherry, 2000). Αρχικά η νόσος ταυτίστηκε λανθασμένα με την οξεία σηψαιμική μορφή της χολέρας των πτηνών. Το

1880, οι Rivolto και Delprato διαφοροποίησαν τα δύο νοσήματα βασιζόμενοι στις κλινικές και παθολογικές εκδηλώσεις τους (Lupiani & Reddy, 2009). Το 1901, οι Centanni και Savonuzzi αναγνώρισαν ότι η αιτία της νόσου ήταν ένας διηθητός παράγοντας. Παρ' όλα αυτά, ο ιός αναγνωρίστηκε και ταξινομήθηκε ως ιός της γρίπης το 1955 (Saif & Barnes, 2008)

Υπάρχουν μεταγενέστερες αναφορές αυξημένου αριθμού κρουσμάτων από HPAI ιούς το 1894 και το 1901 στην Ιταλία, τα οποία στη συνέχεια εξαπλώθηκαν στην Αυστρία και τη Γερμανία και αργότερα στο Βέλγιο και τη Γαλλία μέσω της μετακίνησης πτηνών. Η εξάπλωση των HPAI ιών μέσω της Γερμανίας, συνέβη όταν στην έκθεση πτηνών «1901 Brunswick Fowl Exposition», εντοπίστηκαν πτηνά που νοσούσαν. Οι αρχές έκλεισαν την έκθεση και μετέφεραν τα μολυσμένα πτηνά στις περιοχές από όπου προέρχονταν, με αποτέλεσμα τη διασπορά του ιού. Στον 20^ο αιώνα, οι HPAI ιοί αναφέρθηκαν στην Ελβετία, τη Ρουμανία, τη Ρωσία, την Ολλανδία, την Ουγγαρία, τη Μεγάλη Βρετανία, την Αίγυπτο, την Κίνα, την Ιαπωνία, τη Βραζιλία και την Αργεντινή, στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, της Ρωσίας, της Βόρειας Αφρικής, της Μέσης Ανατολής, της Ασίας και της Νότιας και Βόρειας Αμερικής (Saif & Barnes, 2008). Σε πολλά μέρη της Ευρώπης, οι HPAI ιοί ήταν ενδημικοί μέχρι τα μέσα του 1930 (Alexander, D. J., 2000). Τη διετία 1924-1925 καθώς και το 1929, οι HPAI ιοί αναφέρθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Το 1924 σημειώθηκαν σημαντικές απώλειες στις υπαίθριες αγορές ζωντανών πτηνών (Live Poultry Market-LPM) στη Νέα Υόρκη και αργότερα στο Νιου Τζέρσεϋ, τη Φιλαδέλφεια και την Πενσυλβανία. Το 1925, εντοπίστηκαν μολυσμένες πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις καθώς και υπαίθριες αγορές ζωντανών πουλερικών στο Κονέκτικατ, στην ανατολική Βιρτζίνια, στην Ιντιάνα, στο Ιλινόις, στο Μίσιγκαν και στο Μισσούρι. Αργότερα, το 1929, αναφέρθηκαν κρούσματα σε σμήνη πτηνών στο Νιού Τζέρσεϋ. Για την εξάλειψη των HPAI ιών στις Η.Π.Α., εφαρμόστηκαν μέτρα εξυγίανσης και απολυμάνσεις, απομονώσεις και μείωση του πληθυσμού των πτηνών (Saif & Barnes, 2008).

Οι υπότυποι HPAI ιών στους οποίους αποδόθηκαν τα κρούσματα από το 1901 έως τα μέσα του 1950, έχουν σήμερα ταξινομηθεί ως H7N1 και H7N7 (Saif & Barnes, 2008). Παρ' όλα αυτά, νέοι υπότυποι του ιού της γρίπης, οι ιοί H5N1 και H5N3, απομονώθηκαν το 1959 από κοτόπουλα στη Σκωτία και το 1961 από κοινά γλαρόνια (*Sterna hirundo*) στη Βόρεια Αφρική αντίστοιχα (Swayne & Suarez, 2000). Έτσι, καθιερώθηκε η εσφαλμένη εντύπωση ότι όλοι οι υπότυποι H5 και H7 είναι HPAI ιοί. Το 1971, το στέλεχος H7N3 απομονώθηκε από ινδόρνιθες στο Όρεγκον που παρουσίασαν μέτριας σοβαρότητας αναπνευστική νόσο και διάρροια (Beard & Helfer, 1972). Από το 1971 και ύστερα ένας μεγάλος αριθμός H5 και H7 υπότυπων LPAI ιών απομονώθηκαν, καταρρίπτοντας τη θεωρία ότι οι υπότυποι H5 και H7 ανήκουν στους HPAI ιούς (Saif & Barnes, 2008).

Μέχρι το 1959 24 πρωτογενείς εξάρσεις που προκλήθηκαν από τους υπότυπους H5 και H7, είχαν αναφερθεί παγκοσμίως στην πλειονότητά τους στην Ευρώπη και την Αμερική. Παρ' όλα αυτά, καμία από τις εξάρσεις αυτές δεν έφθασε σε μέγεθος την επιζωοτία του H5N1 HPAI ιού στην Ασία, που εξαπλώθηκε σε μεγάλο αριθμό χωρών στην Ευρώπη και την Αφρική μέχρι το 2004, προκαλώντας σοβαρές απώλειες στον πληθυσμό των πτηνών. Παρ' όλα αυτά, μέχρι σήμερα, για την πλειονότητα των ανθρώπινων κρουσμάτων από ιούς της γρίπης των πτηνών, ευθύνεται ο υπότυπος H7 HPAI (Kalthoff et al., 2010).

Σε πολλές περιπτώσεις, οι ιοί της γρίπης απομονώθηκαν από ασυμπτωματικά υδρόβια άγρια πτηνά. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ορολογικές μελέτες σε μεταναστευτικά υδρόβια πτηνά οι οποίες ανέφεραν την παρουσία μόλυνσης από ιούς της γρίπης (Easterday et al., 1968). Το 1972 απομονώθηκε ο ιός της γρίπης από μεταναστευτικές πάπιες κατά τη διάρκεια προγράμματος επιτήρησης για τη νόσο Newcastle (Slemons et al., 1974), ενώ στην Αυστραλία απομονώθηκε από θαλάσσια πτηνά (Downie & Laver, 1973). Από τότε πραγματοποιήθηκαν έρευνες οι οποίες έδειξαν ότι υγρή υδρόβια άγρια πτηνά, που ανήκουν στις τάξεις *Anseriformes* και *Charadriiformes* αποτελούν την ασυμπτωματική δεξαμενή των ιών της γρίπης. Οι ιοί της γρίπης που έχουν απομονωθεί από άγρια πτηνά είναι κατά κύριο λόγο LPAI για τα οικόσιτα πτηνά (Saif & Barnes, 2008).

ii. Παθογένεια του Ιού της Γρίπης

Το πρώτο βήμα για τη μόλυνση και τον πολλαπλασιασμό του ιού, είναι η προσρόφησή του σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (sialic acids) του κυττάρου ξενιστή. Η HA είναι η περιοχή διαμέσου της οποίας ο ιός συνδέεται με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Οι ιοί της γρίπης του ανθρώπου συνδέονται κατά προτίμηση με τα α-2,6-linked sialic acids (SA), ενώ οι ιοί της γρίπης των πτηνών συνδέονται με τα α-2,3-linked SA. Δεδομένου ότι διαφορετικά μόρια HA αναγνωρίζουν διαφορετικά σιαλικά οξέα στην άκρη των υποδοχέων τους, τα μόρια HA του ιού παρουσιάζουν ειδικότητα ως προς τη σύνδεση με τους υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή. Η ειδικότητα του υποδοχέα των ιών της γρίπης έχει πολύ μεγάλη σημασία τόσο για την ικανότητα του ιού να μολύνει το κύτταρο ξενιστή όσο και για τον πολλαπλασιασμό του σε αυτό, όσο και για την επιζωοτιολογία/επιδημιολογία των ιών της γρίπης.

Μετά την επιτυχή προσρόφηση, τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο ξενιστή μέσω του μηχανισμού της ενδοκύττωσης. Η ενδοκύττωση διεγείρεται κατά την προσρόφηση των ιικών μορίων HA στα κατάλληλα μόρια σιαλικού οξέος της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδοσωματίου που περικλείει το ιικό σωματίδιο και το μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα. Η δομή της πρωτεΐνης HA υφίσταται διαρθρωτικές αλλαγές λόγω του όξινου περιβάλλοντος που προσφέρει το ενδοσωμάτιο. Έτσι, επιτυγχάνεται η σύντηξη της ιικής με την ενδοσωματική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη M2 αποτελεί τον δίαυλο ανταλλαγής ιόντων μέσω του οποίου ιόντα H^+ εισέρχονται από το ενδοσωμάτιο στο εσωτερικό του ιικού καψιδίου, με αποτέλεσμα την αποσύνδεση της πρωτεΐνης M1 από το σύμπλεγμα RNP και τελικά την απελευθέρωση του RNP του ιού στο κυτταρόπλασμα (Skehel & Wiley, 2000). Μετά την απελευθέρωση των συμπλεγμάτων RNP στο κυτταρόπλασμα, τα RNP μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου πραγματοποιείται η μεταγραφή του ιού και ο πολλαπλασιασμός του RNA του (Whittaker et al., 1996). Οι κύκλοι πολλαπλασιασμού ολοκληρώνονται με την συγκρότηση των νουκλεοκαψιδίων. Η πρωτεΐνη NA είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του υποδοχέα και συμμετέχει στην απελευθέρωση του ιού από τα προσβεβλημένα κύτταρα, αφού λάβει χώρα ο πολλαπλασιασμός του (Varghese et al., 1983).

Το σημείο διάσπασης της πρωτεΐνης HA στην πλειονότητα των ιών της γρίπης των πτηνών, αποτελείται από δυο βασικά αμινοξέα σε διακριτές θέσεις που συνθέτουν ένα μοτίβο διάσπασης (Wood et al., 1993). Τα trypsin-like ένζυμα που εκφράζονται κυρίως στην επιφάνεια των αναπνευστικών και γαστρεντερικών επιθηλιακών κυττάρων, αναγνωρίζουν αυτό το μονοβασικό μοτίβο διάσπασης. Επομένως, ο επαρκής πολλαπλασιασμός των ιών της γρίπης των πτηνών με μονοβασικό μοτίβο διάσπασης της πρωτεΐνης HA, περιορίζεται σε αυτούς τους ιστούς, οδηγώντας σε μέτριας σοβαρότητας νόσο στα πτηνά. Αυτοί είναι οι LPAI ιοί. Αντίθετα, οι ιοί της γρίπης των πτηνών που διαθέτουν ένα πολυβασικό μοτίβο διάσπασης, αναγνωρίζονται από τις subtilisin-like ενδοπρωτεάσες, οι οποίες βρίσκονται σε όλους του ιστούς. Έτσι, είναι ικανοί να πολλαπλασιαστούν σε πολλούς ιστούς οδηγώντας σε συστηματική μόλυνση και σχεδόν 100% θνησιμότητα στα πτηνά. Αυτοί είναι οι HPAI ιοί (Horimoto et al., 1994; Rott et al., 1995).

Το γεγονός ότι οι ιοί της γρίπης παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία, γίνεται αντιληπτό από τις μεγάλες αντιγονικές τους διαφορές, τις διαφορές στη λοιμογόνο τους δύναμη καθώς και από τις γενετικές τους διαφορές. Η γενετική ποικιλομορφία είναι δυνατόν να προκύψει από μηχανισμούς όπως είναι η ανταλλακτική ανακατάταξη, η αντιγονική παρέκκλιση (antigenic drift) και η αντιγονική μετάπτωση (antigenic shift). Ειδικότερα, η ανταλλακτική ανακατάταξη οδηγεί στην πρόκληση μεταλλάξεων που μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των νέων ιικών σωματιδίων, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες επιλογής. Κατά την αντιγονική παρέκκλιση (antigenic drift), πραγματοποιείται συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλαγμένων ιικών σωματιδίων που μπορεί είτε να μην είναι βιώσιμα, είτε να περιέχουν χρήσιμες μεταλλάξεις για την περεταίρω εξέλιξη του ιού (Webster et al., 1992). Αυτές οι σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων, αλλά και αμινοξέων με αποτέλεσμα την αλλαγή στην αντιγονικότητα των πρωτεϊνών HA και NA του ιού (Wright, 2001). Έτσι, τα αντισώματα του ξενιστή που προέρχονται από εμβολιασμό ή παλαιότερη λοίμωξη, δεν είναι πλέον ειδικά κατά του ιού (Webster et al., 1992). Τέλος, μέσω του μηχανισμού της αντιγονικής μετάπτωσης (antigenic shift) προκύπτουν στελέχη που είναι ανοσολογικά διαφορετικά από τα πατρογονικά, καθώς περιέχουν αντιγονικά διαφορετικές πρωτεΐνες. Επομένως, είναι δυνατό μετά από αντιγονική μετάπτωση, να προκύψουν στελέχη με έντονη λοιμογόνο δύναμη, ικανά να προκαλέσουν πανδημίες, επηρεάζοντας κυρίως «παρθένους» ανοσολογικά οργανισμούς (Wright, 2001).

iii. Κλινική Εικόνα

Η νόσος από HPAI ιούς σε οικόσιτα πτηνά χαρακτηρίζεται από υψηλή νοσηρότητα που ακολουθείται από ανεξήγητα υψηλή και ταχεία θνησιμότητα. Η κλινική εικόνα της νόσου, ποικίλει από ξαφνικό θάνατο με λίγα ή καθόλου συμπτώματα έως την εμφάνιση ποικιλίας κλινικών εκδηλώσεων. Στις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου που έχουν περιγραφεί, συμπεριλαμβάνονται συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα όπως η παρουσία ρινικού εκκρίματος, βήχας, δύσπνοια και η διόγκωση των ιγμορείων ή της κεφαλής. Άλλες κλινικές εκδηλώσεις που έχουν αναφερθεί, είναι η παρουσία οφθαλμικού εκκρίματος, η κυάνωση των περιοχών του δέρματος που δεν καλύπτονται από πτέρωμα, η απάθεια, η παρουσία νευρολογικών συμπτωμάτων, οι διαταραχές του

γαστρεντερικού συστήματος και η μείωση της κατανάλωσης νερού και τροφής. Τέλος, έχει αναφερθεί μείωση της ωοπαραγωγής και παραγωγή μεγάλου αριθμού αυγών χαμηλής ποιότητας (International Office of Epizootics and Biological Standards Commission, 2012). Οι πάπιες, οι χήνες, οι στρουθιονίδες και τα περιστέρια είναι λιγότερα ευπαθή στη μόλυνση από HPAI ιούς και συνήθως παρουσιάζουν νευρολογικά συμπτώματα όπως αταξία, ραιβόκρανο και επιληπτικές κρίσεις. Επίσης σε μερικά είδη πάπιας, ο ιός δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί ή ο πολλαπλασιασμός του είναι περιορισμένος με αποτέλεσμα να εμφανίζουν λίγα κλινικά συμπτώματα (Kalthoff et al., 2010).

Οι LPAI ιοί πολλαπλασιάζονται στα άγρια υδρόβια πτηνά που αποτελούν τον φυσικό ξενιστή τους, χωρίς να προκαλούν κλινική νόσο. Παρ' όλα αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι η μόλυνση των άγριων πτηνών από LPAI ιούς μπορεί να επηρεάσει τη μεταναστευτική τους συμπεριφορά (Kalthoff et al., 2010). Στα οικόσιτα πτηνά, οι LPAI ιοί προκαλούν μείωση του ρυθμού αύξησης βάρους στα κρεοπαραγωγά πτηνά ή μια μικρή και προσωρινή μείωση της ωοπαραγωγής. Εντούτοις, μπορούν υπό συνθήκες να προκαλέσουν μια πληθώρα κλινικών συμπτωμάτων, η σοβαρότητα των οποίων μπορεί να προσεγγίζει αυτή των κλινικών εκδηλώσεων που προκαλούνται από HPAI ιούς, ειδικά σε περιπτώσεις συνυπαρχόντων ασθeneιών ή δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών. Τα περισσότερα μολυσμένα πτηνά δεν εμφανίζουν συμπτώματα αλλά εξακολουθούν να αποβάλλουν μεγάλες ποσότητες του ιού, λειτουργώντας ως «σιωπηλές» δεξαμενές, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη μετάδοσή του ιού σε άλλα πτηνά. Τέλος, η κλινική εικόνα της νόσου εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος του πτηνού, η ηλικία, τα ειδικά χαρακτηριστικά του στελέχους που εμπλέκεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (International Office of Epizootics and Biological Standards Commission, 2012).

iv. Μετανάστευση και Ιός της Γρίπης των πτηνών

Τα μεταναστευτικά πτηνά και ιδιαίτερα οι μολυσμένες πάπιες που παρουσιάζουν φυσική ανθεκτικότητα στην ανάπτυξη νόσου, φαίνεται ότι συνέβαλαν στη διασπορά των ασιατικών στελεχών H5N1 HPAI από τη λίμνη Qinghai το 2005, στην Ευρώπη, την Αφρική, την Ινδία και τη Μέση Ανατολή (Gaidet et al., 2010; Gilbert et al., 2010; Kilpatrick et al., 2006; Prosser et al., 2009; Salzberg et al., 2007; Takekawa et al., 2010). Τα προγράμματα επιτήρησης στην Ταϊλάνδη το 2004, έδειξαν ότι οι οικοσίτες πάπιες που είχαν μολυνθεί από τον ιό H5N1 HPAI παρέμεναν ασυμπτωματικές με αποτέλεσμα η αρχική διασπορά του ιού στα οικόσιτα πτηνά και στους ανθρώπους να προέλθει από τη μετακίνηση των οικοσίων παπιών. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι κατοικίδιες πάπιες που διαβιούσαν σε τεχνητούς υγροτόπους, διατηρούσαν τον ιό και να τον διέσπειραν σε άγρια πτηνά που τρέφονταν στο ίδιο μέρος. Αν αυτά τα άγρια πτηνά ήταν μεταναστευτικά και παρουσίασαν περιορισμένη θνησιμότητα, μπορεί να διέσπειραν τον ιό σε μεγαλύτερες αποστάσεις. Αυτή η υπόθεση υποστηρίχθηκε από την γενετική ομοιότητα που παρουσίασαν τα στελέχη που απομονώθηκαν από την Ευρώπη, την Αφρική και τη Μέση Ανατολή, με τα αντίστοιχα στελέχη που απομονώθηκαν από τη λίμνη Qinghai (Kim et al., 2009).

Σε ορισμένες μελέτες, αναφέρθηκε η ικανότητα πτηνών που είναι μολυσμένα με ιούς της γρίπης Α, να διανύουν μεγάλες αποστάσεις κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης τους. Σε μια από αυτές, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν σταθερά ισότοπα στο πτέρωμα των πτηνών και πραγματοποίησαν φυλογενετική ανάλυση των στελεχών που απομονώθηκαν για να συσχετίσουν τη μεταναστευτική στρατηγική των άγριων παπιών με τη μόλυνση από τους ιούς της γρίπης Α. Στη μελέτη αυτή, δεν εντοπίστηκε διαφορά στον επιπολασμό της μόλυνσης από τον ιό της γρίπης Α μεταξύ των μεταναστευτικών πτηνών που διανύουν μέση και μεγάλη απόσταση και των μη μεταναστευτικών πτηνών. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τη γενετική ποικιλομορφία των ιών της γρίπης Α μεταξύ των τριών ομάδων, πιθανώς λόγω της «ανάμιξης» των ιών όταν τα πτηνά συναντώνται σε υγρότοπους κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Επιπλέον, δεν αναγνωρίστηκαν αλλαγές στη σωματική κατάσταση των πτηνών που θα μπορούσαν να οφείλονται στη μόλυνσή τους από ιούς της γρίπης Α και να επηρεάσουν τη μεταναστευτική τους στρατηγική (Hill et al., 2012). Σε άλλη μελέτη στην Αφρική, διαπιστώθηκε ότι μια πάπια του είδους *Dendrocygna viduata* που ήταν μολυσμένη με τον ιό της γρίπης Α, διήνυσε μεγάλη απόσταση (τουλάχιστον 655χλμ) κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής της (Gaidet et al., 2008).

Η συμβολή των άγριων πτηνών στη διασπορά των ιών της γρίπης από τη μια ήπειρο στην άλλη, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Σε πρόσφατες μελέτες, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των ιών που απομονώθηκαν από είδη άγριων πτηνών που μεταναστεύουν από τη μια ήπειρο στην άλλη, καθώς και από πληθυσμούς άγριων πτηνών που βρίσκονται πιο κοντά στην Ασία. Από τις μελέτες αυτές υποστηρίχθηκε ότι πραγματοποιείται ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των LPAI στελεχών της Βόρειας Αμερικής και της Ευρασίας σε πολλά είδη άγριων πτηνών, μεταξύ των οποίων τα είδη *Clangula hyemalis*, *Melanitta deglandi* και *Anas platyrhynchos* στην περιοχή Great Lakes (Jackwood and Stallknecht, 2007; Fries et al., 2013), *Anas acuta* και *Calidris alpina* στην Αλάσκα (Koehler et al., 2008; Wahlgren et al., 2008), *Arenaria interpres* και *Larus argentatus* στις ακτές του Ατλαντικού (Makarova et al., 1999) και σε υδρόβια πτηνά στον Καναδά (Krauss et al., 2007). Φαίνεται ότι η ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των ηπείρων γίνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις. Τμήματα RNA του ιού της γρίπης Α που απομονώθηκε από τη Βόρεια Αμερική, εντοπίστηκαν στην Ευρώπη σε πτηνά του είδους *Uria aalge* (Wallensten et al., 2005) και σε υδρόβια πτηνά στην Ασία (Bean et al., 1992; Liu et al., 2004). Έχει επίσης αναφερθεί η παρουσία και η διατήρηση τμημάτων ιών της γρίπης Α από την Ευρασία, μετά από την είσοδό τους στη Βόρεια Αμερική (Bahl et al., 2009).

Τέλος, έχει προταθεί ότι τα υδρόβια πτηνά έχουν μεταφέρει αναλλοίωτα σε μεγάλο βαθμό, στελέχη του ιού της γρίπης Α, σε μεγάλες αποστάσεις. Εντούτοις, αυτό το φαινόμενο θεωρείται σπάνιο. Κατά τη διάρκεια των 50 χρόνων επιτήρησης, δεν έχει αναγνωριστεί στη Βόρεια Αμερική ολόκληρο γένωμα του ιού της γρίπης Α, που να προέρχεται από την Ευρασία. Η μεταφορά τμημάτων του γενώματος του ιού της γρίπης θεωρείται πιο πιθανή, καθώς εμφανίζονται συνεχώς σε νέες περιοχές, ακόμα και σε διαφορετικές ηπείρους, ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμού που συμβαίνει κατά μήκος των μεταναστευτικών οδών των υδρόβιων πτηνών (Miller et al., 2014).

ν. Επιζωοτιολογία

Μετάδοση και Φορείς

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι ιοί της γρίπης μεταδίδονται από το ένα πτηνό στο άλλο δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως. Σε μελέτες που έγιναν τα προηγούμενα χρόνια, έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί η μετάδοση των LPAI και HPAI ιών σε οικόσιτα πτηνά και φάνηκε ότι η μετάδοση μεταξύ των πτηνών είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και εξαρτάται από το στέλεχος του ιού, το είδος του πτηνού καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Alexander et al., 1986, 1978; Narayan et al., 1969; Westbury et al., 1981, 1979).

Κατά κύριο λόγο ο ιός μεταδίδεται με άμεση επαφή μεταξύ μολυσμένων και ευπαθών πτηνών ή με έμμεση επαφή μέσω έκθεσης σε ουσίες ή αντικείμενα που είναι επιμολυσμένα με τον ιό. Η δημιουργία αερολύματος είναι ένας σημαντικός τρόπος μετάδοσης καθώς ο ιός βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στο αναπνευστικό σύστημα. Παρ' όλα αυτά, τα κόπρανα αποτελούν τον κύριο τρόπο μετάδοσης παρά το γεγονός ότι περιέχουν χαμηλότερη συγκέντρωση του ιού. Έτσι, οι ιοί της γρίπης μεταφέρονται εύκολα σε άλλες εγκαταστάσεις μέσω των ανθρώπων (μολυσμένα παπούτσια και ρούχα) και του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται (Saif & Barnes, 2008).

Η κατανάλωση των μολυσμένων πτηνών από άλλα ζώα ή ο κανιβαλισμός, αποτελούν μια επιπλέον πηγή μετάδοσης του ιού λόγω της υψηλής συγκέντρωσης των HPAI ιών στους ιστούς των μολυσμένων πτηνών. Παρ' όλα αυτά, η συγκέντρωση των ιών στο κρέας του πτηνού φαίνεται να ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος του ιού, το είδος του πτηνού και το κλινικό στάδιο της μόλυνσης (Swayne & Beck, 2005; Thomas & Swayne, 2007).

Παρά το γεγονός ότι η οριζόντια μετάδοση των ιών της γρίπης συμβαίνει συχνά, η κάθετη μετάδοση δεν έχει ακόμα αποδειχθεί. Οι περισσότεροι LPAI και HPAI ιοί προκαλούν μείωση και διακοπή της ωοπαράγωγής αντίστοιχα και με τον τρόπο αυτό περιορίζεται η πιθανότητα κάθετης μετάδοσης του ιού της γρίπης (Saif & Barnes, 2008).

Σε πειραματική μόλυνση που πραγματοποιήθηκε σε κοτόπουλα ηλικίας 3-4 εβδομάδων μετά από ενδορινικό ενοφθαλμισμό, ο τίτλος των HPAI ιών στον στοματοφάρυγγα (ανακτήθηκαν $10^{4.2-7.7}$ EID₅₀/mL μέση μολυσματική δόση αναπνευστικών εκκρίσεων για έμβρυα κοτόπουλων) ήταν υψηλότερος σε σχέση με την κλοάκη (ανακτήθηκαν $10^{2.5-4.5}$ EID₅₀/gm κοπράνων) (Swayne et al., 2000; Swayne & Beck, 2005). Από την άλλη μεριά, οι LPAI ιοί παρουσιάζουν χαμηλότερους τίτλους τόσο στο στοματοφάρυγγα ($10^{1.1-5.5}$ EID₅₀/mL) όσο και στην κλοάκη ($10^{1.0-4.3}$ EID₅₀/mL) (Swayne & Beck, 2005).

Τόσο στη φυσική όσο και στην πειραματική μόλυνση οι HPAI ιοί παρουσιάζουν χαμηλότερη μεταδοτικότητα σε σχέση με τους LPAI ιούς σε ευπαθή κοτόπουλα και ινδόρνιθες. Η ικανότητα των ιών να μεταδίδονται εύκολα σχετίζεται σε ένα βαθμό με την ποσότητα του ιού που απελευθερώνεται από το αναπνευστικό ή το γαστρεντερικό σύστημα. Παρ' όλα αυτά, οι HPAI ιοί προκαλούν εξαιρετικά γρήγορο θάνατο στα πτηνά

και για το λόγο αυτό είναι πιθανό να απεκκρίνεται μικρή ποσότητα του ιού κατά τη διάρκεια των μολύνσεων από HPAI ιούς (Alexander, 2007).

Οι ιοί της γρίπης παρουσιάζουν διάφορους βαθμούς προσαρμογής στα επιμέρους είδη ξενιστών. Η μετάδοση μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους είναι συχνή και εύκολη. Παρ' όλα αυτά, η μετάδοση μεταξύ ατόμων διαφορετικών ειδών μπορεί επίσης να συμβεί ιδίως όταν τα είδη των ξενιστών συνδέονται στενά όπως για παράδειγμα όταν ανήκουν στην ίδια ταξονομική οικογένεια, όπως είναι τα κοτόπουλα, οι ινδόρνιθες, οι φραγκόκοτες και τα ορτύκια της τάξης *Galliformes*, της οικογένειας *Phasianidae*. Η μετάδοση μεταξύ των ατόμων διαφορετικών ειδών μπορεί επίσης να συμβεί όταν τα είδη ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις, οι οποίες όμως ανήκουν στην ίδια κλάση, όπως είναι οι πάπιες (Order: *Anseriformes*) και οι ινδόρνιθες (Order: *Galliformes*), αλλά αυτό συμβαίνει λιγότερο συχνά σε σχέση με τη μετάδοση μεταξύ στενά συνδεδεμένων ειδών ξενιστών. Επιπλέον, η μετάδοση μεταξύ διαφορετικών ειδών που ανήκουν σε διαφορετικές φυλογενετικές κλάσεις, είναι ακόμα πιο σπάνια αλλά έχει αναφερθεί σε κάποιες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα η μετάδοση του ιού από τα κοτόπουλα στον άνθρωπο. Εξαίρεση αποτελεί η ευκολία και η συχνότητα μετάδοσης των στελεχών H1N1 και H3N2 του χοίρου σε ινδόρνιθες, όταν τα δυο είδη βρεθούν σε στενή γεωγραφική εγγύτητα (Mohan et al., 1981; Saif & Barnes, 2008; Suarez et al., 2003; Tang et al., 2005). Είναι εμφανές ότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα των ιών της γρίπης να μεταδίδονται μέσα στο ίδιο είδος αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικά είδη ξενιστών επηρεάζοντας τη συνολική επίπτωση της μόλυνσης. Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται η γεωγραφική κατανομή των ξενιστών, η παρουσία διαφορετικών ειδών σε κοντινές μεταξύ τους αποστάσεις, η ηλικία και η πυκνότητα των πτηνών, οι καιρικές συνθήκες και η θερμοκρασία (Saif & Barnes, 2008).

Σε πειραματικές μελέτες ο ιός της γρίπης έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να πολλαπλασιάζεται και να εκκρίνεται από τα κοτόπουλα για περίπου 36 ημέρες (Swayne & Slemons, 1992) και από τις ινδόρνιθες μέχρι 22 μέρες (Homme et al., 1970; Saif & Barnes, 2008). Παρ' όλα αυτά, σε επίπεδο πληθυσμού, οι ιοί της γρίπης μπορούν να διατηρηθούν για πολύ μεγαλύτερες χρονικές περιόδους σε αγροτικές εγκαταστάσεις ή μπορούν να αναδυθούν ξανά.

Στα άγρια υδρόβια πτηνά η διατήρηση των ιών της γρίπης οφείλεται στο γεγονός ότι μεταδίδονται σε ευπαθή πτηνά κατά τη διάρκεια του έτους. Ο επιπολασμός της μόλυνσης παρουσιάζει εποχικότητα στα άγρια πτηνά. Ο μέγιστος επιπολασμός παρουσιάζεται στα μεταναστευτικά άγρια υδρόβια πτηνά όταν είναι νεαρά πριν την μετανάστευση του φθινοπώρου ενώ ο χαμηλότερος επιπολασμός παρουσιάζεται όταν φθάνουν στις περιοχές διαχείμασης. Από τη στιγμή όμως που θα φθάσουν στις περιοχές διαχείμασης, μολύνουν τα ευπαθή γηγενή άγρια υδρόβια πτηνά τα οποία στη συνέχεια δημιουργούν το δικό τους κύκλο μόλυνσης (Hanson et al., 2003; D. E. Stallknecht et al., 1990). Έτσι, οι γηγενείς πάπιες συμβάλουν στη διατήρηση του ιού κατά τη διάρκεια του χειμώνα με αποτέλεσμα την επαναμόλυνση των μεταναστευτικών άγριων πτηνών.

Ειδικότερα, σε μια μελέτη που αφορούσε στη διατήρηση των ιών της γρίπης στα υδρόβια πτηνά που ζουν ελεύθερα στον Καναδά, φάνηκε ότι η διατήρησή τους σχετίζεται με τη μετάδοση του ιού από τα ενήλικα στα νεαρά πτηνά στις λίμνες όπου τα πτηνά συγκεντρώνονται πριν την μετανάστευση (Hinshaw et al., 1980). Η σημαντική ποσότητα του ιού που αποβάλλεται από τις μολυσμένες πάπιες μέσω των κοπράνων

(Webster et al., 1978) έχει σαν αποτέλεσμα την παρουσία του ιού στο νερό των λιμνών (Hinshaw et al., 1979). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη, προτάθηκε ότι ο ιός της γρίπης μπορεί να παραμείνει λοιμογόνος στο νερό της λίμνης μέχρι 4 ημέρες στους 22°C και πάνω από 30 ημέρες στους 0°C (Webster et al., 1978). Σε μεταγενέστερη μελέτη εκτιμήθηκε ότι από έναν αρχικό τίτλο 10^6 TCID₅₀ / ml η μολυσματικότητα των ιών διατηρείται μέχρι 207 ημέρες στους 17°C και 102 ημέρες στους 28°C (D E Stallknecht et al., 1990). Το μολυσμένο πόσιμο νερό ή το νερό των λιμνών μπορεί επομένως να οδηγήσει σε μόλυνση μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Στη συνέχεια, προτάθηκε ότι στα νερά της Αλάσκας καθώς και άλλων χωρών με χαμηλές θερμοκρασίες κατά τη χειμερινή περίοδο, ο ιός της γρίπης θα μπορούσε πιθανώς να διατηρείται το χειμώνα, με αποτέλεσμα το νερό να αποτελεί πηγή μόλυνσης για τα υδρόβια πτηνά την άνοιξη (Ito et al., 1995).

Ξενιστές

Η απομόνωση του ιού έχει αναφερθεί σε 105 είδη άγριων πτηνών που ανήκουν σε 26 Οικογένειες (Olsen et al., 2006). Ο ακριβής αριθμός των ευπαθών στον ιό ειδών πτηνών αναμένεται να είναι ακόμα μεγαλύτερος (Alexander, 2007). Οι ιοί της γρίπης έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν φυσική μόλυνση σε μια μεγάλη ποικιλία άγριων και οικόσιτων πτηνών ιδίως σε αυτά που ζουν ελεύθερα και καταλαμβάνουν υδατικά ενδιαίτηματα. Έχει επίσης αναφερθεί μόλυνση άγριων χερσαίων πτηνών από ιούς της γρίπης τα οποία όμως φαίνεται ότι δεν αντιπροσωπεύουν σημαντική πηγή ή δεξαμενή των ιών της γρίπης (Saif & Barnes, 2008).

Σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε διαφορετικά είδη άγριων πτηνών, ο ιός της γρίπης απομονώθηκε από το 15.2% των πτηνών της Τάξης *Anseriformes*, το 2.9% των πτηνών της Τάξης *Passeriformes* και το 2.2% των πτηνών της Τάξης *Charadriiformes* (Stallknecht & Shane, 1988). Τα παρυδάτια πτηνά και οι γλάροι φαίνεται να αποτελούν επίσης γενετική δεξαμενή του ιού καθώς η πλειονότητα των στελεχών που απομονώθηκαν από τα είδη αυτά, ανήκουν σε διαφορετικούς υπότυπους από αυτούς που απομονώθηκαν από τις πάπιες (Kawaoka et al., 1988; Sharp et al., 1993). Συνολικά, τα άγρια πτηνά από τα οποία έχουν απομονωθεί οι ιοί της γρίπης ανήκουν στις τάξεις *Anseriformes* (πάπιες, χήνες, και κύκνοι), *Charadriiformes* (γλάροι, γλαρόνια), *Ciconiiformes* (ερωδιοί), *Columbiformes* (περιστέρια), *Falconiformes* (γεράκια), *Galliformes* (πέρδικες και φασιανοί), *Gaviiformes*, *Gruiformes* (φαλαρίδες, νερόκοτες), *Passeriformes* (σπίνοι), *Pelecaniformes* (κορμοράνοι), *Piciformes* (δρυοκολάπτες), *Podicipediformes* (σκουφοβουτηχάρια), και *Procellariiformes* (Alexander & Gough, 1986; Manvell et al., 2000; Saif & Barnes, 2008; Stallknecht & Shane, 1988).

Στα οικοσυστήματα που έχουν δημιουργηθεί από τον άνθρωπο (αγροτικά οικοσυστήματα, σμήνη, προσωπικές συλλογές και εκθέσεις πτηνών), έχουν αναφερθεί μολύνσεις από ιούς της γρίπης σε πτηνά που ανήκουν στις τάξεις *Psittaciformes* (παπαγάλους, παπαγαλάκια), *Casuariiformes* (εμού), *Struthioniformes* (στρουθοκάμηλους), *Rheiformes*, και σε οικόσιτα πτηνά που ανήκουν στις τάξεις *Galliformes* και *Anseriformes*. Οι δύο τελευταίες τάξεις περιλαμβάνουν κοτόπουλα, ινδόρνιθες, ορτύκια Ιαπωνίας (*Coturnix japonica*), φραγκόκοτες (*Numida meleagris*), ορτύκια (*Colinus virginianus*), φασιανούς (διάφορα είδη), πέρδικες (*Alectoris chukar*),

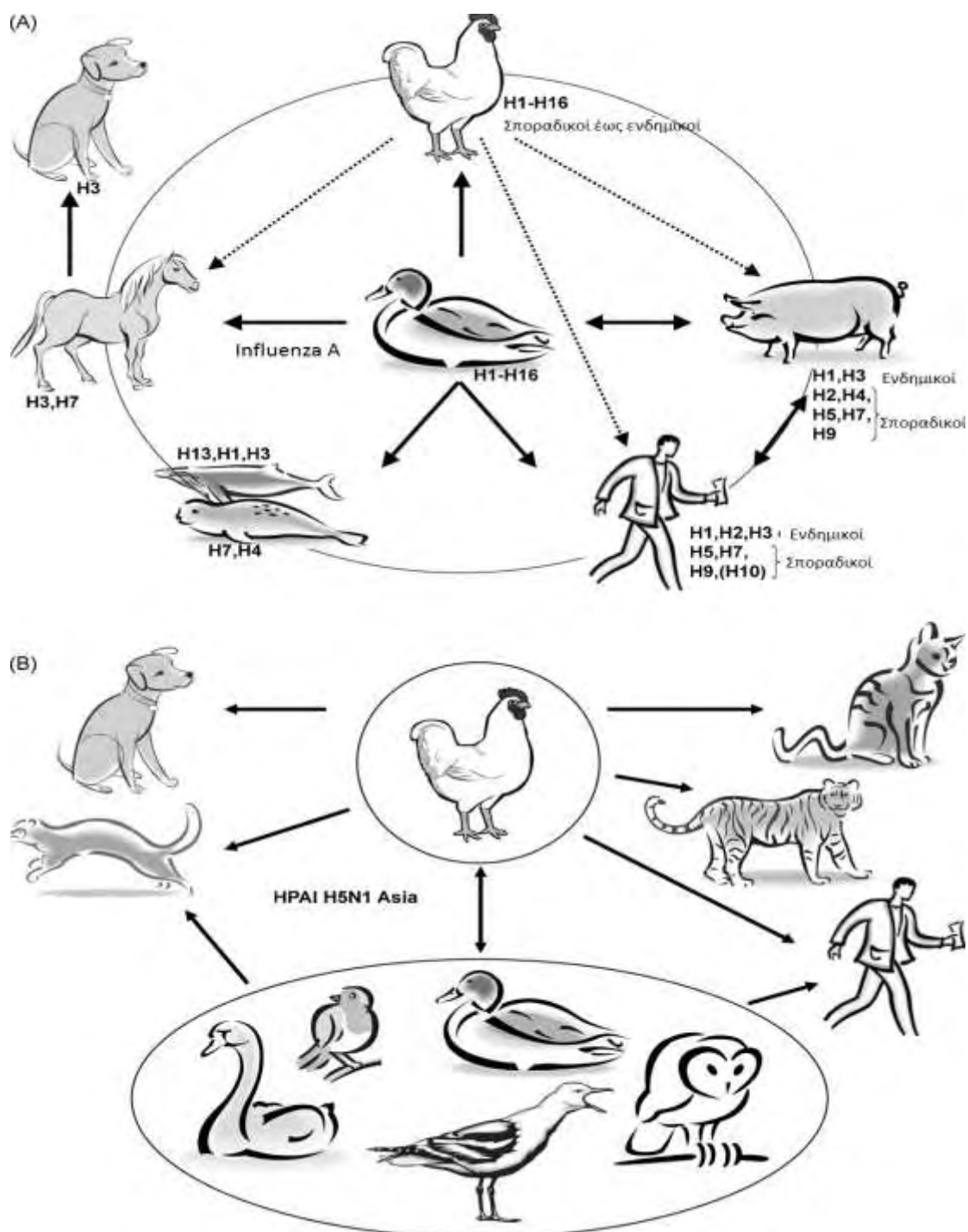
χήνες (*Anser anser domesticus*) και πάπιες (*Anas platyrhynchos domesticus*) (Saif & Barnes, 2008).

Επίσης, LPAI ιοί έχουν προκαλέσει επιζωοτίες αναπνευστικής νόσου σε μινκ, φώκιες και φάλαινες (Callan et al., 1995; Englund et al., 1986; Geraci et al., 1982; Hinshaw et al., 1986; Lang et al., 1981; Lvov et al., 1978; Webster et al., 1981). Σποραδικές μολύνσεις έχουν αναφερθεί σε τίγρεις, λεοπαρδάλεις, γάτες, σκύλους και κουνάβια. Στις περισσότερες από τις περιπτώσεις αυτές, αναφέρθηκε στενή επαφή με μολυσμένα πτηνά ή κατανάλωσή τους. Σε μερικές περιπτώσεις έχει αναφερθεί φυσική μόλυνση με ιούς της γρίπης των πτηνών και σε ανθρώπους (Kalthoff et al., 2010). Τέλος, σε πειραματικές μελέτες, οι ιοί της γρίπης έχει αποδειχθεί ότι μολύνουν χοίρους, φέρρετς, αρουραίους, ινδικά χοιρίδια, ποντίκια, γάτες, μινκ, άλλα πρωτεύοντα εκτός των ανθρώπων αλλά και ανθρώπους (Beare & Webster, 1991; Hinshaw et al., 1981; Shortridge et al., 1998).

Γεωγραφική Κατανομή

Οι ιοί της γρίπης των πτηνών παρουσιάζουν παγκόσμια κατανομή και η απομόνωσή τους έχει αναφερθεί στην Αφρική, την Ασία, την Ευρώπη, τη Βόρεια και Νότια Αμερική. Ακόμα, στην Ανταρκτική βρέθηκαν πιγκουίνοι ορολογικά θετικοί στον ιό της γρίπης (Morgan & Westbury, 1981; Saif & Barnes, 2008; Spackman et al., 2005; Swayne & Suarez, 2000).

Ο ελλιπής έλεγχος της μετακίνησης των πτηνών και τα χαμηλά επίπεδα βιοασφάλειας οδήγησαν στο να γίνουν ενδημικοί οι ιοί της γρίπης σε κάποιους πληθυσμούς πτηνών, ιδίως μεταξύ 1900-1930 στην Ευρώπη και σε μερικές περιοχές της Ασίας. Επίσης, μεταξύ 1924-1925 σημειώθηκε αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων από ΗΡΑΙ ιούς στις Η.Π.Α. σε μια υπαίθρια αγορά ζωντανών πτηνών, αλλά αντιμετωπίστηκε με μείωση του πληθυσμού των πτηνών πριν γίνει ενδημική. Οι ενδημικοί ΗΡΑΙ ιοί εξαφανίστηκαν από την Ευρώπη στα μέσα του 1930. Μελέτες που έγιναν σε υπαίθριες αγορές ζωντανών πτηνών στο Χονγκ Κονγκ, τη Νέα Υόρκη και άλλες μεγάλες πόλεις, έδειξαν ότι οι LPAI ιοί είναι ενδημικοί σε τέτοια συστήματα (Saif & Barnes, 2008). Το 1997 σημειώθηκε αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων από τον υπότυπο H5N1 στις υπαίθριες αγορές ζωντανών πτηνών στο Χονγκ Κόνγκ και από τον H5N2 στην Ιταλία. Επιπλέον, οι αγορές αυτές ήταν κατά πάσα πιθανότητα η πηγή των ΗΡΑΙ ιών που προκάλεσαν την έξαρση κρουσμάτων το 1983-1984 στις Η.Π.Α. (Capua et al., 1999; Saif & Barnes, 2008; Suarez et al., 1998). Το στέλεχος H7N2 LPAI έγινε ενδημικό σε αγορές ζωντανών πτηνών Βορειοανατολικά των Η.Π.Α. μεταξύ 1993-2006, αλλά μέχρι την εφαρμογή προγράμματος ελέγχου, ο ρυθμός μόλυνσης είχε μειωθεί. Αυτές οι αγορές ήταν η πηγή του H7N2 LPAI που μόλυνε 24 εμπορικές πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις στην Πενσυλβανία μεταξύ 1996-1998 και 7 εμπορικές πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις μεταξύ 2001-2002, 197 εμπορικές εκμεταλλεύσεις πτηνών στη Βιρτζίνια το 2002, μια μεγάλη πτηνοτροφική εκμετάλλευση στο Κονέκτικατ το 2003, μια μικρή φάρμα με όρνιθες στο Ρόουντ Αιλαντ το 2003 και 3 εμπορικές εκμεταλλεύσεις κρεοπαραγωγών ορνίθων στην Ντελμάρβα το 2004 (Akey, 2003; Dunn et al., 2003; Saif & Barnes, 2008; Suarez et al., 1999; Ziegler et al., 1999).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της μετάδοσης του ιού της γρίπης Α μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Α) και ο τρόπος μετάδοσης του HPAI H5N1 (Β) (Kalthoff et al., 2010)

vi. Εξάρσεις των Ιών της Γρίπης των Πτηνών (AIV)

Το στέλεχος H9N2 σε οικόσιτα πτηνά

Ιστορικά, οι LPAI ιοί δεν απομονώθηκαν και δεν έγιναν ενδημικοί στα πτηνά σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές όπως συνέβη με άλλους ιούς όπως οι πνευμονοϊοί ή οι ιοί της λοιμώδους βρογχίτιδας των πτηνών. Αυτό φαίνεται να συνέβη μόνο με τον H9N2 LPAI ιό ο οποίος απομονώθηκε από πτηνά, κυρίως κοτόπουλα, σε πολλές χώρες από τα μέσα του 1990 και έφθασε σε επίπεδο πανζωοτίας (Alexander, 2007). Αυξημένος αριθμός κρουσμάτων λόγω του H9N2, αναφέρθηκε σε οικόσιτες πάπιες, κοτόπουλα και ινδόρνιθες στη Γερμανία κατά τη διάρκεια του 1995-1997, 1998 και 2004, σε κοτόπουλα στην Ιταλία το 1994 και το 1996, φασιανούς στην Ιρλανδία το 1997, ορτύκια στην Νότια Αφρική το 1995, ινδόρνιθες στις ΗΠΑ το 1995 και 1996 και κοτόπουλα στην Κορέα το 1996. Επίσης, μολύνσεις αναφέρθηκαν στη Μέση Ανατολή και στην Ασία προκαλώντας την εξάπλωση του ιού σε κοτόπουλα εμπορίου στο Ιράν, τη Σαουδική Αραβία, το Πακιστάν, την Κίνα, την Κορέα, τα Ενωμένα Αραβικά Εμιράτα, το Ισραήλ, την Ιορδανία, το Κουβέιτ, το Λίβανο, τη Λιβύη και το Ιράκ. Σε μερικές από αυτές τις χώρες εφαρμόστηκε εμβολιασμός για τον έλεγχο της νόσου. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι ο H9N2 είχε γίνει ενδημικός στα κοτόπουλα του εμπορίου σε ένα σημαντικό αριθμό χωρών (Alexander, 2007).

Η εμφάνιση και η εξάπλωση του H5N1 HPAIV

Η εμφάνιση του H5N1 HPAI στην Νοτιοανατολική Ασία και η εξάπλωση του σε όλη την Ασία και την Ευρώπη αποτέλεσε ένα εξαιρετικά σημαντικό γεγονός. Ο ιός που θεωρήθηκε υπεύθυνος για τα αυξημένα κρούσματα που ακολούθησαν, προήλθε από μολυσμένες χήνες του εμπορίου από την επαρχία της Guandong της Κίνας το 1996 (Xu et al., 1999). Στις αναφορές που ακολούθησαν θεωρήθηκε ότι ο ιός συνέχισε να κυκλοφορεί στην Νότια Κίνα κυρίως σε οικόσιτες πάπιες ενώ παρουσίαζε γενετική ποικιλομορφία (Sims et al., 2005).

Το 2002 καταγράφηκε αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων σε πολλά είδη άγριων πτηνών σε δύο πάρκα υδρόβιων πτηνών στο Χόνγκ Κόνγκ (Ellis et al., 2004). Το 2003 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη θυμάτων λόγω μόλυνσης από HPAI ιό που προερχόταν από πτηνά, καθώς σημειώθηκαν έξι θάνατοι ανθρώπων από τους 18 που αναφέρθηκε ότι προσβλήθηκαν από τον ιό (Kalthoff et al., 2010). Από τον Δεκέμβριο του 2003 μέχρι τον Φεβρουάριο του 2004, οχτώ χώρες της Ευρώπης και την Νοτιοανατολικής Ασίας ανέφεραν αυξημένο αριθμό κρουσμάτων από τον H5N1 HPAI ιό. Το ασιατικό στέλεχος H5N1 HPAI εξαπλώθηκε σε όλη τη Νοτιοανατολική Ασία, συμπεριλαμβανομένων της Δημοκρατίας της Κορέας, της Ταϊλάνδης, της Ινδονησίας, του Βιετνάμ, της Ιαπωνίας, του Χόνγκ Κόνγκ, της Καμπότζης, της Λαϊκής Δημοκρατίας της Κίνας και της Μαλαισίας. Ο H5N1 HPAI ιός εντοπίστηκε σε οικόσιτα και άγρια πτηνά και για πρώτη φορά σε τίγρεις και λεοπαρδάλεις για τις οποίες η νόσος ήταν θανατηφόρος. Επιπλέον, σε αυτή την περίοδο αναφέρθηκαν ανθρώπινα κρούσματα στην Ταϊλάνδη και το Βιετνάμ (Kalthoff et al., 2010).

Το 2005, αναφέρθηκε αυξημένος αριθμός κρουσμάτων σε μεταναστευτικά άγρια πτηνά στην Κίνα και τη Μογγολία. Τον Απρίλιο του 2005, ο H5N1 HPAI προκάλεσε μαζικό θάνατο σε άγρια πτηνά στην Λίμνη Qinghai στην Βορειοδυτική Κίνα. Ειδικότερα, προτάθηκε ότι η παρουσία του ιού σε άγρια μεταναστευτικά πτηνά στη λίμνη Qinghai θα μπορούσε να είναι το μέσο με το οποίο ο H5N1 (Chen et al., 2005; Liu et al., 2005) εξαπλώθηκε Δυτικά και Νότια. Τον Ιούλιο του 2005, το Καζακστάν και η Ρωσία επιβεβαίωσαν την παρουσία αυξημένων κρουσμάτων σε πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις με την ταυτόχρονη παρουσία νεκρών άγριων πτηνών σε κοντινή απόσταση. Τον Οκτώβριο του 2005, αναφέρθηκαν αυξημένα κρούσματα σε πτηνά στην Τουρκία και τη Ρουμανία (Kalthoff et al., 2010). Στην Κροατία, εντοπίστηκαν επίσης άγρια πτηνά που ήταν μολυσμένα από τον ιό H5N1 HPAI. Στη συνέχεια, στις αρχές του 2006, 20 Ευρωπαϊκές χώρες (Ουκρανία, Βουλγαρία, Ελλάδα, Ιταλία, Σλοβενία, Γερμανία, Γαλλία, Αυστρία, Βοσνία-Ερζεγοβίνη, Σλοβακία, Ουγγαρία, Σερβία-Μαυροβούνιο, Ελβετία, Πολωνία, Αλβανία, Δανία, Σουηδία, Τσεχία, Ηνωμένο Βασίλειο και Ισπανία), 12 Μεσανατολικές χώρες (Κουβέιτ, Ισραήλ, Λωρίδα της Γάζας, Ιράν, Ιράκ, Αίγυπτος, Αφγανιστάν, Ιορδανία, Πακιστάν, Ινδία, Αζερμπαϊτζάν και Γεωργία) και επτά Αφρικανικές χώρες (Νιγηρία, Νίγηρα, Καμερούν, Μπουρκίνα Φάσο, Σουδάν, Ακτή Ελεφαντοστού και Τζιμπουτί) ανέφεραν την απομόνωση του ιού H5N1 HPAI από νεκρά οικόσιτα ή άγρια πτηνά. Στο μεταξύ, ο H5N1 HPAI ιός έγινε ενδημικός στις περισσότερες Νοτιοανατολικές Ασιατικές χώρες. Μέχρι το τέλος του 2006, η μόλυνση από τον H5N1 επιβεβαιώθηκε σε 263 ανθρώπους από τους οποίους στους 158 ήταν θανατηφόρος. Το 2007, 2008 και 2009 κάποιες χώρες της Ανατολικής Ασίας, της Ευρώπης, της Μέσης Ανατολής και της Αφρικής ανέφεραν αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων σε οικόσιτα και άγρια πτηνά ενώ στην Αίγυπτο ο H5N1 έγινε ενδημικός το 2008.

Οι υπότυποι H7 σε άγρια και οικόσιτα πτηνά

Τα άγρια πτηνά όπως έχει αναφερθεί, αποτελούν τις φυσικές δεξαμενές όλων των ιών της γρίπης συμπεριλαμβανομένων των υπότυπων H7. Οι υπότυποι αυτοί, είναι ικανοί να πολλαπλασιάζονται σε οικόσιτα πτηνά (Campitelli et al., 2004; Kim et al., 2012; Krauss et al., 2007; Ladman et al., 2010; Lee et al., 2012; Marché et al., 2012; Olsen et al., 2006; Song et al., 2009; Spackman et al., 2010, 2006) αποτελώντας κίνδυνο για τη μόλυνση των ανθρώπων (Driskell et al., 2010; Li et al., 2006; Song et al., 2009). Σύμφωνα με τα ευρήματα των προγραμμάτων επιτήρησης της νόσου που έχουν εφαρμοστεί τα τελευταία 15 χρόνια, οι ιοί της γρίπης των πτηνών του υπότυπου H7, παρουσιάζουν ευρεία εξάπλωση σε άγρια πτηνά, κυρίως σε πάπιες (Abdelwhab et al., 2014; Bulach et al., 2010; Kim et al., 2012; Lebarbenchon & Stallknecht, 2011; Lee et al., 2012). Επιπλέον, όλοι οι υπότυποι H7 του ιού της γρίπης των πτηνών που απομονώθηκαν, έχουν ταξινομηθεί ως LPAI ιοί. Όλοι οι συνδυασμοί των υπότυπων H7N έχουν απομονωθεί από άγρια πτηνά ενώ ο επικρατέστερος υπότυπος είναι ο H7N7 που έχει αναφερθεί σε 21 χώρες. Ακολουθούν ο υπότυπος H7N1 (18 χώρες), ο υπότυπος H7N3 (15 χώρες), ο H7N9 (εννιά χώρες), ο H7N8 (οχτώ χώρες), ο H7N3 (επτά χώρες), ο H7N6 (έξι χώρες), ο H7N4 (τρεις χώρες) και τέλος ο H7N5, που έχει αναφερθεί σε δύο χώρες και οι αναφορές απομόνωσής του περιορίζονται στη Βόρεια Αμερική. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο H7N3 έχει αναφερθεί σε περισσότερες χώρες της Αμερικής σε

σύγκριση με την Ευρώπη και ότι στις ΗΠΑ έχουν αναφερθεί όλοι οι H7N υπότυποι (Abdelwhab et al., 2014).

Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις, αναφέρθηκε αυξημένος αριθμός κρουσμάτων από LPAI και HPAI ιούς του υπότυπου H7 σε οικόσιτα πτηνά. Η νόσος στα οικόσιτα πτηνά παρουσίασε μεγάλο εύρος κλινικών εκδηλώσεων, από ασυμπτωματική μόλυνση έως ταχέως εξελισσόμενη και θανατηφόρο νόσο. Πριν το 1990, σε κάποιες μόνο περιπτώσεις είχαν αναφερθεί αυξημένα κρούσματα από τον υπότυπο H7 σε οικόσιτα πτηνά όπως η πανζωτία του H7N1 το 1901-1930 (Abdelwhab et al., 2014), του H7N3 το 1971 και 1979-1980 και του H7N9 το 1998 στις ΗΠΑ (Banks et al., 2000; Beard & Helfer, 1972), του H7N3 το 1963, του H7N7 το 1977 και 1979 και του H7N1 το 1982 στην Αγγλία (Alexander & Spackman, 1981; Banks et al., 2000), του H7N7 το 1976 και 1985 στην Αυστραλία, του H7N7 το 1977 και 1987 στη Γερμανία και του H7N2 το 1979 στο Ισραήλ (Abdelwhab et al., 2014; Banks et al., 2000). Αργότερα, σε ορολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκαν μολυσμένα οικόσιτα πτηνά στη Γερμανία το 2001 (Abdelwhab et al., 2014) και στην Ακτή Ελεφαντοστού το 2007-2009 (Couacy-Hymann et al., 2012), σε κοτόπουλα του εμπορίου στην Αίγυπτο το 2009-2010 (Afifi et al., 2013), σε οικόσιτες πάπιες στην Ινδία το 2009-2011 (Pawar et al., 2012) και σε πολλά είδη πτηνών στις ΗΠΑ από το 1997 έως το 2011 (Pasick et al., 2012; Senne, 2010, 2007, 2003).

Το Μάρτιο του 2013, οι κινεζικές αρχές ανακοίνωσαν την αναγνώριση ενός νέου ανασυνδυασμένου ιού της γρίπης Α (H7N9) που απομονώθηκε από τρία περιστατικά ανθρώπων που παρουσίασαν σοβαρή αναπνευστική νόσο και οδηγήθηκαν στο θάνατο. Η τυποποίηση και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των ιών που απομονώθηκαν, έδειξαν ότι οι ιοί που απομονώθηκαν από τα τρία αυτά περιστατικά ήταν σχεδόν όμοιοι γενετικά. Οι ιοί αυτοί ταξινομήθηκαν ως LPAI ιοί. Πρόκειται για την πρώτη αναφορά μόλυνσης ανθρώπων από τον υπότυπο H7N9 που προέρχεται από πτηνά. Επίσης αποτελεί την πρώτη αναφορά πρόκλησης θανατηφόρου μόλυνσης από έναν LPAI ιό της γρίπης των πτηνών σε ανθρώπους. Από τότε, αναφέρθηκαν επιπλέον κρούσματα σε ανθρώπους και μέχρι την 1^η Μαΐου του 2013, καταγράφηκαν 128 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα μεταξύ των οποίων τα 26 ήταν θανατηφόρα. Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις παρουσίασαν σποραδική εμφάνιση και δεν υπάρχει εμφανής επιδημιολογική σύνδεση μεταξύ τους. Οι ιοί που απομονώθηκαν από πτηνά και από περιβαλλοντικά δείγματα που λήφθηκαν από τις υπαίθριες αγορές ζωντανών πτηνών σε ορισμένες επαρχίες, ήταν γενετικά όμοιοι μεταξύ τους και με αυτούς που απομονώθηκαν από τα ανθρώπινα περιστατικά. Επομένως, προτάθηκε ότι ο αυξημένος αριθμός κρουσμάτων προκλήθηκε από έναν ανασυνδυασμένο ιό της γρίπης των πτηνών, χαμηλής λοιμογόνου δύναμης για τα πτηνά και χαμηλής μεταδοτικότητας από τα πτηνά στον άνθρωπο, που είναι όμως ικανός να προκαλέσει σοβαρή νόσο στους περισσότερους ανθρώπους που μολύνονται από αυτόν. Αυτό που ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί είναι αν η δεξαμενή και η πηγή των ιών αυτών ήταν οι υπαίθριες αγορές ζωντανών πτηνών (ECDC, 2013).

vii. Εργαστηριακή Διάγνωση

Η ταχεία ανίχνευση και ταυτοποίηση των ιών της γρίπης τύπου Α σε όλα τα είδη ζώων και στον άνθρωπο, είναι μεγάλης σημασίας για τον έλεγχο του ιού και της διασποράς του.

Ανίχνευση του ιού

Πληθώρα δοκιμών χρησιμοποιείται σήμερα για την ανίχνευση του ιού της γρίπης. Οι τεχνικές που επιτρέπουν την απομόνωση του ιού, όπως ο ενοφθαλμισμός εμβρυοφόρων αυγών, είναι οι σημαντικότερες, λόγω της αναγκαιότητας ύπαρξης του στελέχους για να πραγματοποιηθεί ο χαρακτηρισμός του υπότυπου.

Η ανίχνευση του ιού μπορεί επίσης να επιτευχθεί με την εφαρμογή μοριακών και ανοσολογικών δοκιμών. Οι μοριακές τεχνικές εφαρμόζονται είτε μετά από ενοφθαλμισμό του ιού σε εμβρυοφόρα αυγά είτε απευθείας σε κλινικά δείγματα μολυσμένων πτηνών για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των ιών της γρίπης. Σχετικά με τον ενοφθαλμισμό του ιού σε εμβρυοφόρα αυγά, ο πολλαπλασιασμός του λαμβάνει χώρα μετά από ενοφθαλμισμό σε ειδικά ελεύθερα από παθογόνους παράγοντες εμβρυοφόρα αυγά (Specific Pathogen Free embryonated eggs – SPF) ή ειδικά αρνητικά στην παρουσία αντισωμάτων αυγά (Specific Antibody Negative eggs – SAN). Στις μοριακές μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνονται η αντίστροφη μεταγραφή - αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-PCR, RT-PCR) και η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative Real-Time PCR, qRT - PCR) σε διάφορες παραλλαγές τους. Για την εφαρμογή τους, χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές (primers) για τα γονίδια της πρωτεΐνης NP ή της πρωτεΐνης M που αποτελούν συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος του ιού (Altmüller et al., 1992; Spackman et al., 2002). Η qRT – PCR βασίζεται στον ανιχνευτή υδρόλυσης (probe) ή στη μέθοδο TaqMan για την παραγωγή σήματος φθορισμού ειδικού για την αλληλουχία στόχο. Είναι η τεχνική επιλογής σε πολλά εργαστήρια για τη διάγνωση από κλινικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή προσφέρει γρήγορα αποτελέσματα και υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Βασίζεται στην αρχική ανίχνευση των ιών σε κλινικά δείγματα ενισχύοντας την περιοχή του γονιδίου M, η οποία είναι πολύ συντηρημένη για όλους τους ιούς της γρίπης Α, ακολουθούμενη από τον έλεγχο για τους υπότυπους H5 και H7. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στοχεύουν την περιοχή HA2 καθώς είναι μια σχετικά συντηρημένη περιοχή μεταξύ των γονιδίων της αιμοσυγκολλητίνης των υπότυπων H5 και H7 (Spackman et al., 2008; Spackman & Suarez, 2008).

Άλλες μοριακές μέθοδοι που έχουν επίσης αναπτυχθεί για την ανίχνευση του ιϊκού RNA, έχουν στόχο τον περιορισμό της επίδρασης των ανασταλτικών ουσιών που υπάρχουν στα δείγματα που εξετάζονται, της πιθανότητας επιμόλυνσης με νουκλεϊκά οξέα και της διάρκειας της εξέτασης. Τέτοιες μέθοδοι είναι οι δοκιμές Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA), μια συνεχής ισοθερμική αντίδραση που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση των υπότυπων H5 και H7 σε κλινικά δείγματα μέσα σε 6 ώρες (Lau et al., 2004) και το σύστημα Loop-mediated isothermal Amplification

(LAMP) που παρά την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα που παρουσιάζει για την ανίχνευση του υπότυπου H5, έχει περιορισμένη εφαρμογή λόγω της επίδρασης που έχει στην ευαισθησία του η παρουσία μεταλλάξεων στις περιοχές στόχο (Postel et al., 2010).

Η ανοσολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του αντιγόνου του ιού είναι η εμπορικά διαθέσιμη ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Κατά κύριο λόγο, στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον των νουκλεοπρωτεϊνών και για το λόγο αυτό μπορεί να ανιχνεύσει κάθε στέλεχος του ιού της γρίπης. Είναι ταχεία διαγνωστική δοκιμή και τα βασικά μειονεκτήματα που παρουσιάζει είναι η μειωμένη ευαισθησία, το γεγονός ότι μπορεί να μην έχει επικυρωθεί για διαφορετικά είδη πτηνών και η αδυναμία αναγνώρισης του υπότυπου του στελέχους (International Office of Epizootics and Biological Standards Commission, 2012).

Ανίχνευση αντισωμάτων

Η ανίχνευση των αντισωμάτων χρησιμοποιείται επίσης για την εκτίμηση προηγούμενης έκθεσης των πτηνών στον ιό της γρίπης και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την επιτήρηση της νόσου καθώς και ως συμπληρωματική διαγνωστική μέθοδος. Οι δοκιμές που υπάρχουν σήμερα για την ανίχνευση αντισωμάτων, περιλαμβάνουν την εμπορικά διαθέσιμη ELISA, την ανοσοδιάχυση σε άγαρ (Agar Gel Immunodiffusion – AGID), τη δοκιμή αιμοσυγκόλλησης (Haemagglutination test - HA) και τη δοκιμή αναστολής της αιμοσυγκόλλησης (Haemagglutination Inhibition test - HI) όπου γίνεται χρήση ειδικών αντιορών για την τυποποίηση των στελεχών. Κάθε μια από τις παραπάνω δοκιμές παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της.

viii. Η Νόσος στην Ελλάδα

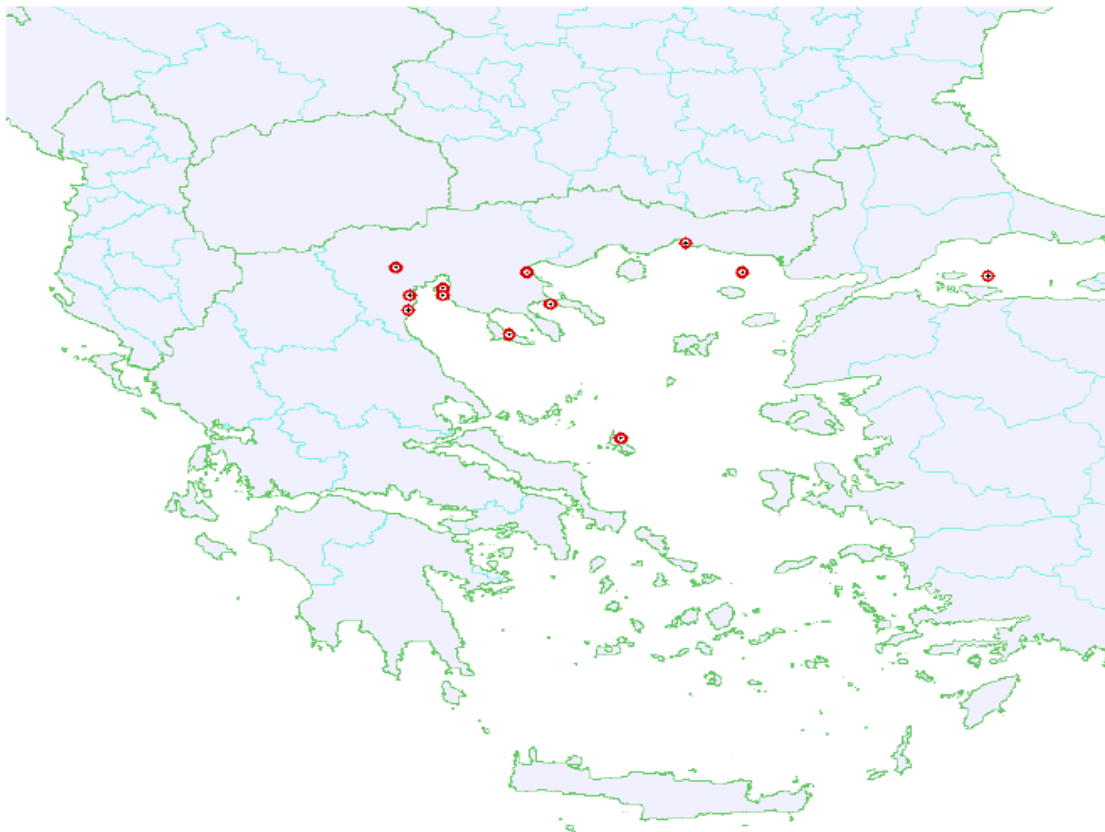
Στην Ελλάδα, μεταξύ 30/1/2006 και 7/3/2006, βρέθηκαν μολυσμένα από τον H5N1 33 άγρια υδρόβια πτηνά. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν μολυσμένοι 30 βουβόκυκνοι, ένας κορμοράνος, ένας αγριόκυκνος (*Cygnus cygnus*) και ένας κοκκινόχηνας (*Branta ruficollis*) (OIE, 2006). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα άγρια πτηνά βρέθηκαν νεκρά στην Βορειοανατολική Ελλάδα, με εξαίρεση την περίπτωση ενός άγριου πτηνού (*Branta ruficollis*) που βρέθηκε νεκρό στη Σκύρο (Εικόνα 4). Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την περίοδο που βρέθηκαν μολυσμένα τα άγρια πτηνά, δεν αναφέρθηκε αυξημένος αριθμός κρουσμάτων στους υγρότοπους διεθνούς ενδιαφέροντος, όπως η Λίμνη Κερκίνη, το Δέλτα των ποταμών Αξιός-Λουδίας-Αλιάκμονας ή σε υγροτόπους της δυτικής Ελλάδας (π.χ. στον Αμβρακικό Κόλπο και στη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου). Κατά κύριο λόγο οι περιπτώσεις αυτές συνδέονται με την ασυνήθιστη μετακίνηση των υδρόβιων πτηνών, πιθανώς λόγω της περιόδου ψύχους στη Μαύρη Θάλασσα (Gauthier-Clerc et al., 2007; Gilbert et al., 2006).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για τη διερεύνηση της επιζωοτίας της γρίπης των πτηνών, συλλέχθηκαν δείγματα από διάφορα είδη άγριων πτηνών από το 2004 έως το 2006. Σε κανένα από τα

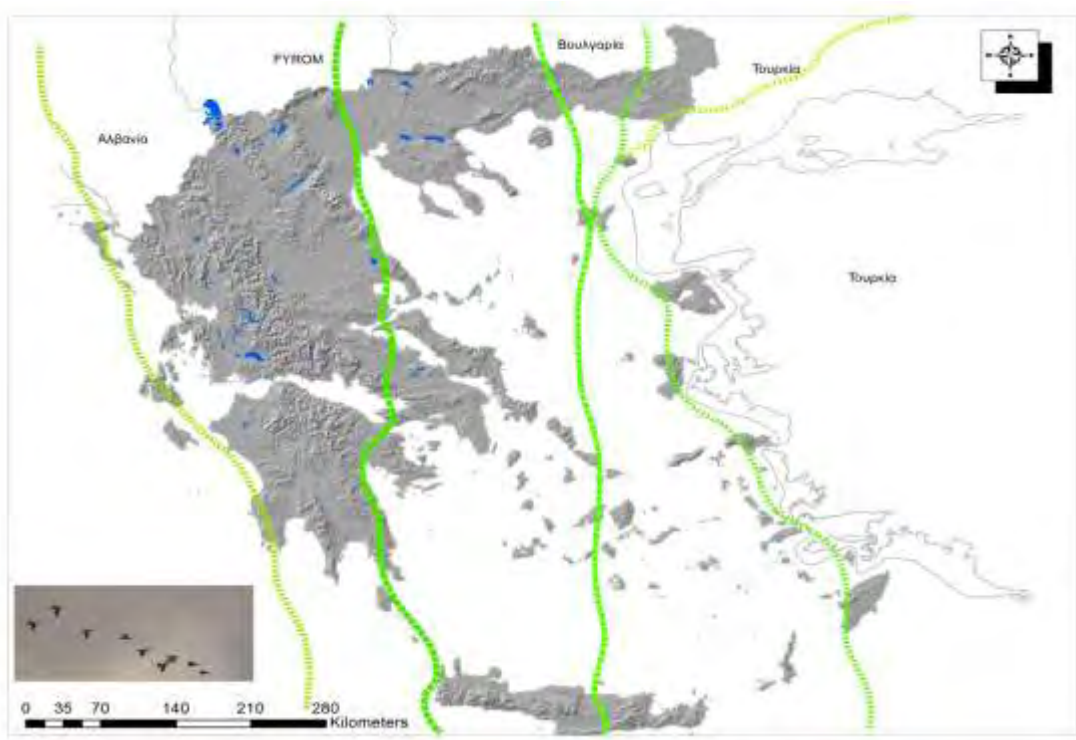
δείγματα άγριων πτηνών που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε ο ιός της γρίπης των πτηνών. Ομοίως, σε κανένα από τα δείγματα οικόσιτων πτηνών, σπουργιτιών και Μεσογειακών γλάρων που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία του ιού (Gouliamtzis, P. & Goutner, V., 2011).

Σχετικά με την οικολογία του ιού της γρίπης των πτηνών στη χώρα μας, αξίζει να σημειωθεί ότι η Ελλάδα βρίσκεται σε μια από τις κύριες μεταναστευτικές διαδρομές των πτηνών από τη βόρεια Ευρώπη και την Ασία προς την Αφρική και το αντίστροφο. Οι κύριες μεταναστευτικές περίοδοι των πτηνών είναι η άνοιξη (Μάρτιος - Μάιος) και το φθινόπωρο (τέλη Αυγούστου - μέσα Οκτωβρίου).

Όσον αφορά στα υδρόβια πτηνά, τα περισσότερα δεν είναι τυπικά μεταναστευτικά αλλά μετακινούνται κατά τη χειμερινή περίοδο προς τις νότιες χώρες. Κατά την άνοιξη και το καλοκαίρι αναπαράγονται στη βόρεια Ευρώπη και την Ασία. Στη συνέχεια, αφού ολοκληρωθεί η αναπαραγωγή τους και λόγω των δυσμενών συνθηκών που δεν επιτρέπουν την εξεύρεση τροφής, αρχίζουν σταδιακά να μετακινούνται νοτιότερα όπου το κλίμα είναι ηπιότερο. Στους ελληνικούς υγροτόπους διαχειμάζουν περισσότερα από 500.000 υδρόβια πτηνά κάθε χειμώνα που προέρχονται κυρίως από τις χώρες της βόρειας Ευρώπης, τη Ρωσία και τη νοτιοδυτική Ασία. Τον Φεβρουάριο, τα περισσότερα από αυτά αρχίζουν να μετακινούνται πάλι προς το Βορρά, δηλαδή προς τις περιοχές αναπαραγωγής τους (Εικόνα 5)



Εικόνα 4. Χάρτης γεωγραφικής κατανομής πτηνών που βρέθηκαν θετικά στον ιό της γρίπης H5N1 στην Ελλάδα (ΟΙΕ, 2006).



Εικόνα 5. Χάρτης απεικόνισης των μεταναστευτικών διαδρομών των μεταναστευτικών πτηνών στην Ελλάδα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η εργαστηριακή διερεύνηση της παρουσίας του ιού της γρίπης σε άγρια πτηνά στη Θεσσαλία με τη βοήθεια της μεθόδου RT-PCR.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

i. Δείγματα άγριων πτηνών

Για το σκοπό της παρούσας μελέτης, συλλέχθηκαν ιστοτεμάχια από 40 άγρια πτηνά κατά τη διάρκεια των κυνηγετικών περιόδων 2012-2013 και 2013-2014 (Πίνακας 1). Τα άγρια πτηνά μεταφέρθηκαν άμεσα (εντός 24 ωρών) στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., σε ειδικό ψυγείο μεταφοράς και σημάνθηκαν με τον κωδικό αναγνώρισης του κάθε πτηνού. Κατά τη συλλογή και θήρευση των ανωτέρω πτηνών τηρήθηκαν όλες οι προβλεπόμενες, από την κείμενη νομοθεσία, διαδικασίες (<http://www.ypeka.gr/Default.aspx?tabid=508>).

Η επιλογή των άγριων πτηνών που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, έγινε με γνώμονα το γεγονός ότι τα υδρόβια πτηνά αποτελούν τις βιολογικές δεξαμενές των ιών της γρίπης Α. Έτσι, δόθηκε έμφαση στη συλλογή δειγμάτων από άγρια πτηνά που ανήκουν στην Οικογένεια *Anatidae*, Τάξη *Anseriformes*, καθώς σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά είδη άγριων πτηνών όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσίασαν το μεγαλύτερο ποσοστό μόλυνσης από τον ιό της γρίπης Α (15.2%) (Stallknecht & Shane, 1988).

Όσον αφορά στα είδη των ιστοτεμαχίων που συλλέχθηκαν από κάθε άγριο πτηνό, η επιλογή έγινε με βάση τους ιστούς στους οποίους πολλαπλασιάζονται οι ΗΡΑΙ και ΛΡΑΙ ιοί. Για το λόγο αυτό, από κάθε πτηνό συλλέχθηκαν ιστοτεμάχια ήπατος, πνευμόνων και καρδιάς. Τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν μετά τη συλλογή τους σε αποστειρωμένα φιαλίδια μιας χρήσης τύπου erpendorf, χωρητικότητας 1,5ml ελεύθερα από DNases και RNases, σημάνθηκαν με τον κωδικό αναγνώρισης του κάθε πτηνού και τοποθετήθηκαν στους -80°C μέχρι την επεξεργασία τους.

Πίνακας 1. Οι Τάξεις, οι Οικογένειες, τα είδη και ο αριθμός των άγριων πτηνών που εξετάστηκαν για την παρουσία του ιού της γρίπης Α και η χρονική περίοδος που επιτρέπεται η θήρα τους.

| Τάξη | Οικογένεια | Είδος Πτηνού | Αριθμός πτηνών | Περίοδος Θήρας |
|---------------------|-----------------|--------------------|----------------|-------------------|
| <i>Anseriformes</i> | <i>Anatidae</i> | <i>Anas crecca</i> | 23 | 15/9 έως 31/1 του |

| | | | | |
|---------------------|-----------------|--|-----------|----------------------------------|
| | | (κιρκίρι) | | επόμενου έτους |
| <i>Anseriformes</i> | <i>Anatidae</i> | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | 12 | 15/9 έως 31/1 του επόμενου έτους |
| <i>Anseriformes</i> | <i>Anatidae</i> | <i>Aythya ferina</i> (κυνηγόπαπια) | 1 | 15/9 έως 31/1 του επόμενου έτους |
| <i>Anseriformes</i> | <i>Anatidae</i> | <i>Anas penelope</i> (σφυριχτάρι) | 1 | 15/9 έως 10/2 του επόμενου έτους |
| <i>Anseriformes</i> | <i>Anatidae</i> | <i>Aythya fuligula</i> (τσικνόπαπια) | 1 | 15/9 έως 10/2 του επόμενου έτους |
| <i>Anseriformes</i> | <i>Anatidae</i> | <i>Anas strepera</i> (φλυαρόπαπια) | 1 | 15/9 έως 10/2 του επόμενου έτους |
| <i>Gruiformes</i> | <i>Rallidae</i> | <i>Fulica atra</i> (φαλαρίδα) | 1 | 15/9 έως 10/2 του επόμενου έτους |
| ΣΥΝΟΛΟ | | | 40 | |

ii. Αντίστροφη μεταγραφή-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμέρασης (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction- RT-PCR)

1. Εκχύλιση ολικού RNA από ιστοτεμάχια άγριων πτηνών

Η εκχύλιση του ιϊκού RNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο οργανικής εκχύλισης με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο Trizol LS. Μετά την απόψυξη των δειγμάτων, δημιουργήθηκαν ομογενοποιήματα των ιστοτεμαχίων που συλλέχθηκαν από κάθε άγριο πτηνό τα οποία στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε εκχύλιση ολικού RNA. Αρχικά δημιουργήθηκε ένα μίγμα 10% από ιστό και αποστειρωμένο PBS, το μίγμα αυτό φυγοκεντρήθηκε για 10min στα 12.000g και η εκχύλιση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε από το υπερκείμενο υγρό όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Εκχύλιση ολικού RNA από ιστοτεμάχια

- 1) Προσθήκη 250μl υπερκείμενου υγρού σε 750μl αντιδραστήριου Trizol LS. Τοποθέτηση σε μηχανήμα vortex. Σύντομη φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του υγρού από το καπάκι του φιαλιδίου.
- 2) Προσθήκη 200μl χλωροφορμίου 100% στο μίγμα ιστού και αντιδραστήριου Trizol. Τοποθέτηση σε μηχανήμα vortex για 15 δευτερόλεπτα. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 7 λεπτά.
- 3) Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (12000g).

4) Σημείωση:

Μετά τη φυγοκέντρωση το μείγμα διαχωρίζεται σε τρεις διαφορετικές στοιβάδες (η κατώτερη ερυθρή, η ενδιάμεση και η ανώτερη υδάτινη και μη χρωματισμένη στοιβάδα). Το RNA παραμένει αποκλειστικά στη ανώτερη υδάτινη στοιβάδα.

- 5) Μεταφορά 400-450 μ l της ανώτερης υδατικής στοιβάδας σε ξεχωριστό φιαλίδιο μικροφυγοκέντρωσης που έχει προηγουμένως σημειωθεί με τον κωδικό του πτηνού. Στο σημείο αυτό αποφεύχθηκε η μεταφορά οργανικής φάσης μαζί με την υδατική καθώς θα μείωνε την απόδοση του RNA (RNA yield) και θα οδηγούσε σε αναστολή της αντίδρασης της RT-PCR.
- 6) Προσθήκη 500 μ l ισοπροπανόλης 100%. Προσθήκη 1 μ l γλυκογόνου 5mg/ml στην ισοπροπανόλη με στόχο την κατακρήμνιση του RNA. Αντιστροφή του φιαλιδίου αρκετές φορές για να αναμιχθεί το διάλυμα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά .
- 7) Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στους 4 °C (10000g).
- 8) Απομάκρυνση του υγρού διαλύματος. Στο σημείο αυτό αποφεύχθηκε η διατάραξη του ιζήματος του RNA. Προσθήκη 1.0 ml αιθανόλης 70%. Ακολουθεί καλή ανάμιξη.
- 9) Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 4 °C (10000g).
- 10) Απομάκρυνση αιθανόλης χωρίς να αποσπαστεί το ίζημα του RNA. Αναστροφή του φιαλιδίου σε ένα καθαρό χαρτί για να απομακρυνθεί η υγρασία για 10 λεπτά ή μέχρι να απομακρυνθεί κάθε σημάδι υγρασίας.
- 11) Ανασύσταση του ιζήματος με προσθήκη 50 μ l RNase-free νερού και επώαση στους 4 °C για 1 ώρα.
- 12) Αποθήκευση του δείγματος RNA στους -80°C. Αποφυγή επαναλαμβανόμενου παγώματος/ξεπαγώματος.

Για την εκχύλιση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Διάλυμα TRIzol LS Reagent
- 2) Χλωροφόρμιο 100%
- 3) Ισοπροπανόλη 100%
- 4) Γλυκογόνο 5mg/ml
- 5) Αιθανόλη 70%
- 6) RNase-free νερό
- 7) Phosphate Buffered Saline (PBS), 0,1 M, pH 7,4
- 8) Αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου erppendorf χωρητικότητας 1,5ml ελεύθερα από DNases και RNases
- 9) Vortex
- 10) Φυγόκεντρος

2. Εκκινητές

Οι εκκινητές είναι μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια με μέγεθος συνήθως 12-18 bp, συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχου. Η επιλογή του γονιδίου του ιού της γρίπης Α προς ενίσχυση, έγινε με σκοπό την ανίχνευση οποιουδήποτε ιού της γρίπης Α. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών (Πίνακας 2) (Fouchier et al., 2000) για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου Matrix (M), μεγέθους 244 ζευγών βάσεων, η οποία είναι συντηρημένη για όλους τους ιούς της γρίπης Α.

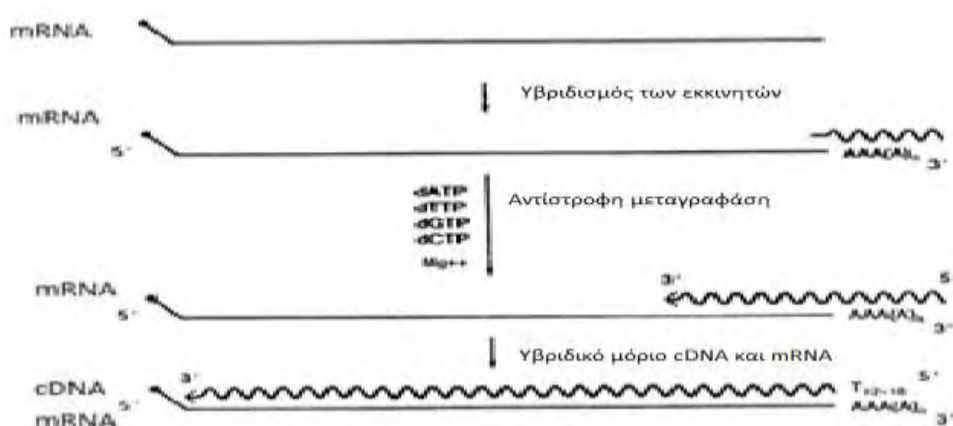
Για την προετοιμασία των εκκινητών αρχικά πραγματοποιήθηκε σύντομη φυγοκέντρηση των λυοφιλοποιημένων εκκινητών πριν την ανασύστασή τους με προσθήκη nuclease-free νερού ώστε η συγκέντρωσή τους να είναι 100μM. Ακολούθησε ήπια ανάμιξη και ηρεμία για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν τα διαλύματα εργασίας αραιώνοντας ποσότητα των εκκινητών με την προσθήκη nuclease-free νερού, ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 10μM.

Πίνακας 2. Αλληλουχία των εκκινητών που είναι ειδικοί για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου Matrix (M) του ιού της γρίπης Α

| Γονίδιο προς ενίσχυση | | Αλληλουχία (5'-3') |
|------------------------------|--------|------------------------------------|
| Type A influenza-matrix gene | M52 C | CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG |
| | M253 R | AGG GCA TTT TGG ACA AA G/T CGT CTA |

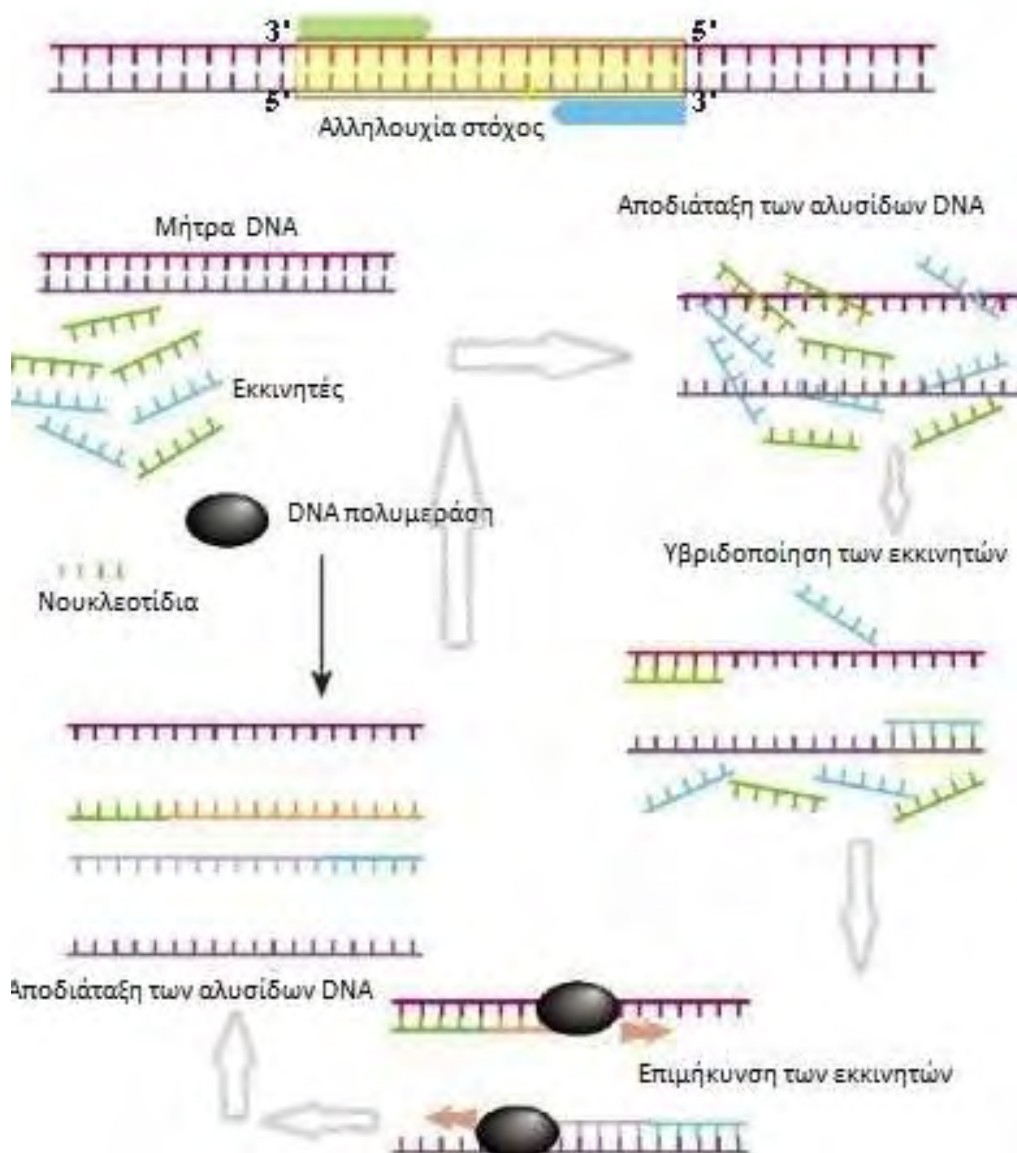
3. Διαδικασία σύνθεσης cDNA και PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου σε ένα βήμα

Η διαδικασία σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) από RNA, ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Το ένζυμο αυτό απομονώνεται από ορισμένους RNA ιούς και χρησιμοποιεί το RNA ως υπόστρωμα για να συνθέσει μια αλυσίδα DNA (cDNA). Κατά αυτόν τον τρόπο, παράγονται υβριδικά μόρια cDNA-RNA. Στη συνέχεια, η αλυσίδα RNA καταστρέφεται, το γονίδιο στόχος εντοπίζεται στη cDNA αλυσίδα και ενισχύεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών και με τη δράση της DNA πολυμεράσης (Εικόνα 6).

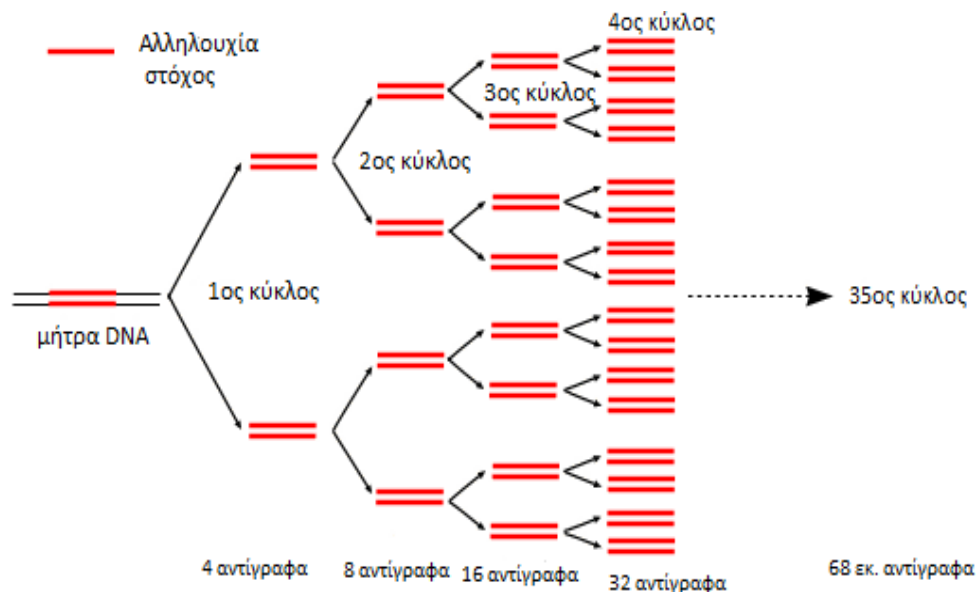


Εικόνα 6. Απεικόνιση της διαδικασίας σύνθεσης του cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών (primer annealing), η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει το συμπληρωματικό cDNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το mRNA.

Τη μεταγραφή του RNA σε cDNA, ακολουθεί η ενίσχυση του γονιδίου στόχου με τη διαδικασία της PCR όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 7. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου, θα έχουν προκύψει εκατομμύρια αντίγραφα της (Εικόνα 8).



Εικόνα 7. Η διαδικασία της PCR. Στο πρώτο βήμα, οι δύο κλώνοι της αλυσίδας του DNA αποδιατάσσονται μετά από θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται και οι εκκινήτες υβριδοποιούνται στις θέσεις πρόσδεσης εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχου. Στο τελευταίο βήμα η DNA πολυμεράση συνθέτει νέους κλώνους DNA που περιέχουν την αλληλουχία στόχο, προσθέτοντας στους εκκινήτες νουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς τη μήτρα DNA. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 25-40 κύκλους.



Εικόνα 8. Απεικόνιση των κύκλων ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου με την τεχνική της PCR. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων ενίσχυσης έχουν προκύψει εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου.

Η μεταγραφή του RNA σε cDNA και ακολούθως η PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του OneStep RT-PCR Kit (Qiagen GmbH). Συγκεκριμένα για κάθε μίγμα αντίδρασης χρειάστηκαν (Πίνακας 3):

- α) Εκχύλισμα RNA (RNA template)
- β) Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 12,5 mM $MgCl_2$
- γ) Ελεύθερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια κάθε αζωτούχου βάσεως (dNTPs) με συγκέντρωση 10mM για κάθε ένα από τα dATP, dCTP, dGTP, και dTTP
- ε) Εμπρόσθιος εκκινητής - M52 C συγκέντρωσης 10μM
- στ) Ανάστροφος εκκινητής - M253 R συγκέντρωσης 10μM
- ζ) Enzyme mix (περιέχει Omniscript Αντίστροφη Μεταγραφάση, Sensiscript Αντίστροφη Μεταγραφάση και HotStarTaq DNA Πολυμεράση)
- η) RNase-free νερό

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 25 μL.

Πίνακας 3. Τα αντιδραστήρια και ο όγκος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μίγματος αντίδρασης της RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου M του ιού της γρίπης A με το OneStep RT-PCR Kit (Qiagen)

| Αντιδραστήριο | Όγκος αντιδραστηρίου (μl) σε κάθε αντίδραση |
|---|---|
| 5X ρυθμιστικό δ/μα με 12,5 mM $MgCl_2$ | 5 |
| Μίγμα dNTPs (10mM για κάθε ένα από τα dATP, dCTP, dGTP, και dTTP) | 1 |
| Εμπρόσθιος εκκινητής (10μM) | 2.5 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| Ανάστροφος εκκινητής (10μM) | 2.5 |
| Enzyme mix | 1 |
| RNase-free νερό | 11 |
| RNA Template | 2 |
| Σύνολο | 25 |

Για τη μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA και την επακόλουθη ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου, ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας και τα προς εξέταση δείγματα τοποθετήθηκαν στον αυτόματο ηλεκτρονικό θερμοκυκλοποιητή που είχε προηγουμένως ρυθμιστεί για να εκτελέσει το πρόγραμμα που φαίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Συνθήκες της RT-PCR για τους ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο M του ιού της γρίπης A

| Φάση Αντίδρασης | Στάδιο | Αριθμός κύκλων | Χρόνος | Θερμοκρασία |
|----------------------|--|----------------|----------|-------------|
| Αντίστροφη Μεταγραφή | Αντίστροφη Μεταγραφή | 1 | 30λεπτά | 50 °C |
| | Ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης με θερμότητα | | 15 λεπτά | 95 °C |
| PCR | Αποδιάταξη | 40 | 1 λεπτό | 94°C |
| | Υβριδισμός εκκινητών | | 1 λεπτό | 55 °C |
| | Επιμήκυνση | | 1 λεπτό | 72°C |
| | Τελική επιμήκυνση | | 10 λεπτά | 72°C |

iii. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των τμημάτων του DNA που έχουν διαφορετικό μέγεθος. Τα τμήματα του DNA εντοπίζονται στο πήκτωμα αγαρόζης μετά από χρώση του DNA με αραιά διαλύματα βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής, που έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να γίνεται ορατή κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα, με τη χρήση ενός ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης και κατεύθυνσης και βασίστηκε στο γεγονός ότι οι φωσφορικές ομάδες του DNA, σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH, αποκτούν αρνητικό φορτίο. Έτσι, στο ηλεκτρικό πεδίο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, το DNA μετακινείται από την κάθοδο προς την άνοδο, με σταθερή ταχύτητα ανεξάρτητα από την νουκλεοτιδική του σύσταση. Οι διαφορές που προκύπτουν στην κινητικότητα των διαφορετικών τμημάτων DNA, οφείλονται στην αντίσταση που εμφανίζεται κατά τη μετακίνηση τους διαμέσου των πόρων του πηκτώματος. Η αντίσταση κατά τη μετακίνηση των τμημάτων

DNA αυξάνεται αναλογικά με το μέγεθος του προϊόντος DNA που ηλεκτροφορεύεται. Επομένως, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των μορίων DNA, τόσο πιο δύσκολη είναι η μετακίνησή τους, ενώ αντίθετα, τα μόρια DNA με μικρό μοριακό μέγεθος περνούν ευκολότερα μέσα από το πήκτωμα και φτάνουν γρηγορότερα στην άνοδο.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X

Αραίωση του διαλύματος 10X TBE με προσθήκη απεσταγμένου νερού ώστε να προκύψει διάλυμα 1X TBE (Αραίωση 1/10).

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (1X TBE buffer) χρησιμοποιήθηκαν:

1. Εμπορικά διαθέσιμο 10X TBE buffer
2. Απεσταγμένο νερό

Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης 2%

1. Προσθήκη αгарόζης σε διάλυμα 1X TBE σε κωνική γυάλινη φιάλη ώστε να προκύψει διάλυμα αгарόζης 2%.
2. Ανάδευση του διαλύματος με κυκλικές κινήσεις.
3. Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης που περιέχει το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι τη διάλυση της αгарόζης.
4. Προσθήκη ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml στο διάλυμα, ώστε να προκύψει διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,05%.
5. Τοποθέτηση του μίγματος που έχει προκύψει στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.
6. Τοποθέτηση της ειδικής χτένας για τη δημιουργία οπών στο πήκτωμα της αгарόζης.
7. Στερεοποίηση του πηκτώματος αгарόζης.

Για την παρασκευή του πηκτώματος αгарόζης 2% χρησιμοποιήθηκαν:

1. Αгарόζη (Ultra Pure Gibco BRL)
2. 1 X TBE
3. Απεσταγμένο νερό

Μετά τη στερεοποίηση του πηκτώματος αгарόζης, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Συγκεκριμένα, σε 8μl από κάθε προϊόν της PCR, προστέθηκαν 2 μl χρωστικής (bromophenol blue) και κάθε μίγμα τοποθετήθηκε σε μια από τις οπές του πηκτώματος αгарόζης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα προϊόντα της PCR. Για να διασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων και η σαφής απεικόνισή τους, χρησιμοποιήθηκε θετικός και αρνητικός μάρτυρας και δείκτης μοριακών βαρών (100bp DNA ladder). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο στέλεχος του ιού της γρίπης Α που απομονώθηκε από χοίρο (ευγενική παραχώρηση από το Εργαστήριο Ιολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής της Γάνδης, Βέλγιο). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε RNase-free νερό. Η επεξεργασία του θετικού και αρνητικού μάρτυρα ήταν ακριβώς η ίδια όπως και για τα κλινικά δείγματα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 160 Volt για 20 λεπτά σε πήκτωμα αгарόζης 2% στην οποία προστέθηκε 0,05% βρωμιούχο αιθίδιο. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης,

το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε ειδικό μηχάνημα υπερϊώδους ακτινοβολίας προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA που πολλαπλασιάστηκε.

iv. Χαρτογραφική απόδοση δακτυλιώσεων

Για τη χαρτογραφική απόδοση των δακτυλιώσεων και των επανευρέσεων των ειδών *Anas crecca* και *Anas platyrhynchos* που έχουν αναφερθεί από το 1985-2004 (Ακριώτης Τ & Χανδρινός Γ, 2004), έγινε εισαγωγή των στοιχείων δακτυλιώσεων και επανευρέσεων και μετατράπηκαν σε διανυσματικά σημειακά αρχεία (vector point files) για το κάθε είδος ξεχωριστά με την βοήθεια του ArcGIS Desktop 10.1 (ESRI, Redlands, CA, USA). Όλα τα ψηφιακά επίπεδα πληροφορίας γεωαναφέρθηκαν με τη βοήθεια του Data Management Tools - ArcToolbox στο Παγκόσμιο Σύστημα Γεωαναφοράς (WGS 84).

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η παρουσία του ιού της γρίπης Α διαπιστώθηκε σε τέσσερα από τα 40 δείγματα άγριων πτηνών που εξετάστηκαν με την τεχνική της RT-PCR. Τα τέσσερα άγρια πτηνά που βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του ιού της γρίπης Α ανήκουν στην Οικογένεια *Anseriformes*, Τάξη *Anatidae*. Ειδικότερα, ο ιός της γρίπης Α ανιχνεύθηκε σε δύο κικκίρια (*Anas crecca*) και δύο πρασινοκέφαλες πάπιες (*Anas platyrhynchos*). Σε κανένα από τα υπόλοιπα είδη άγριων πτηνών που εξετάστηκαν (*Aythya ferina*, *Anas penelope*, *Aythya fuligula*, *Fulica atra*, *Anas strepera*) δεν διαπιστώθηκε η παρουσία του ιού της γρίπης Α. Τα άγρια πτηνά που βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του ιού της γρίπης Α, θηρεύτηκαν στις περιοχές της Λάρισας (μια *Anas platyrhynchos*), του Βόλου (μια *Anas platyrhynchos*) και της Καρδίτσας (μια *Anas crecca* στο χωριό Σοφάδες και μια *Anas crecca* στο χωριό Παλαμάς) κατά την κυνηγετική περίοδο 2012-2013 (Πίνακας 5).

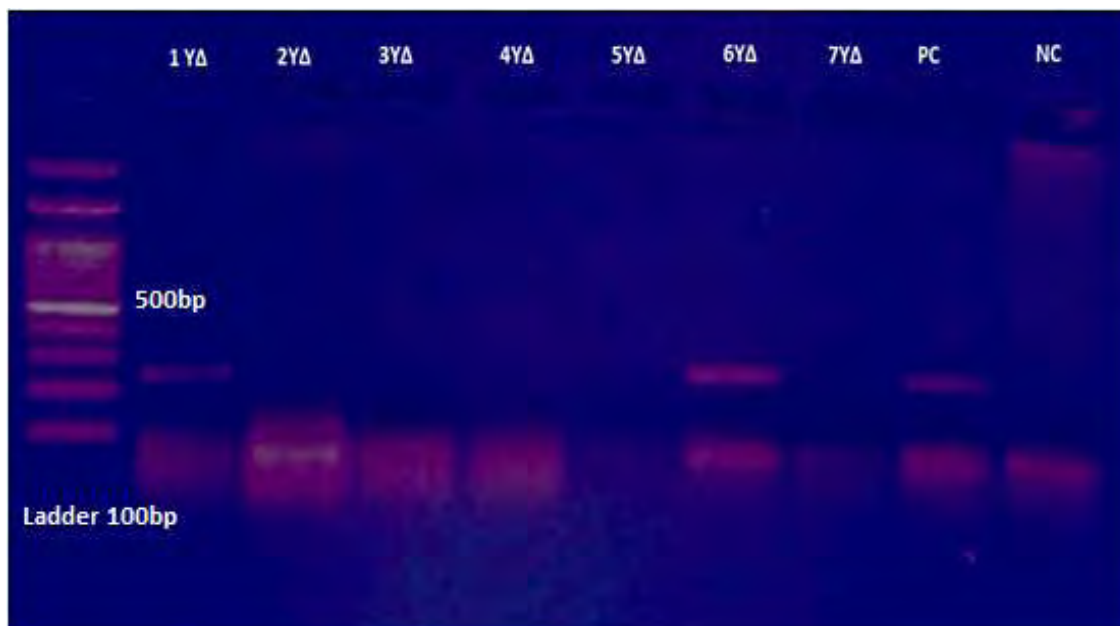
Τα προϊόντα της RT-PCR που προέκυψαν από τα δείγματα άγριων πτηνών που βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του ιού της γρίπης Α, είχαν το αναμενόμενο μέγεθος (244bp) (Εικόνα 9-12).

Πίνακας 5. Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων εξέτασης των δειγμάτων άγριων πτηνών με RT-PCR, των περιοχών της Θεσσαλίας και των περιόδων θήρας που συλλέχθηκαν τα άγρια πτηνά που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη

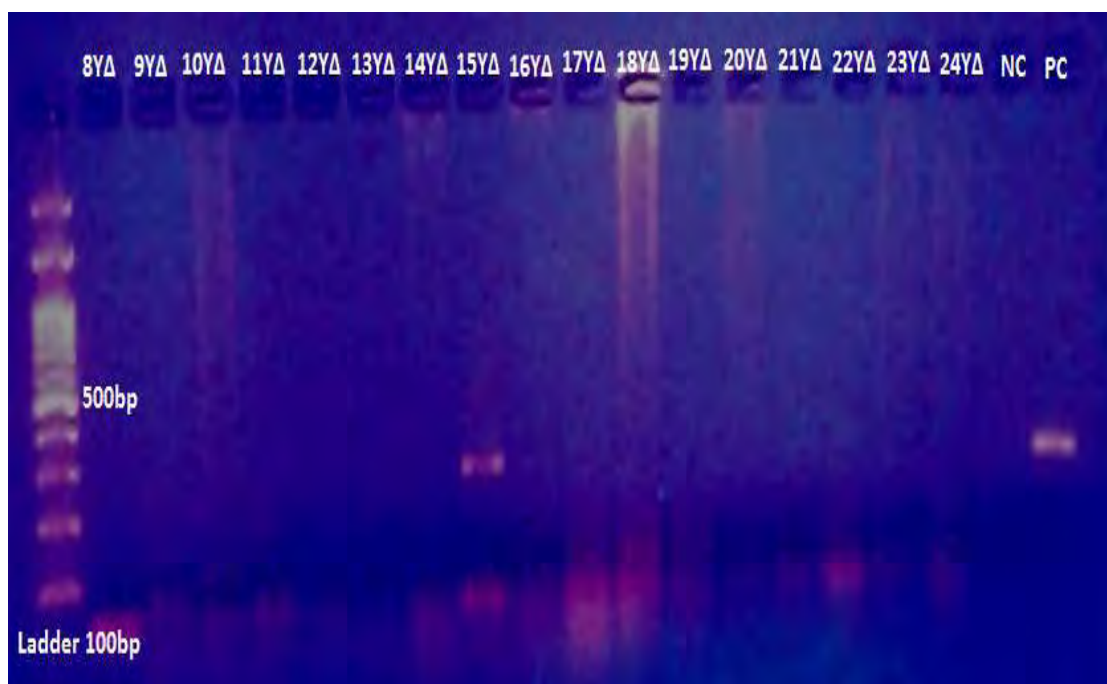
| ΑΜ πτηνού | Είδος Πτηνού | RT-PCR | Περιοχή | Περίοδος Θήρας που έγινε η δειγματοληψία |
|-----------|---|----------|---------|--|
| 1 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Θετικό | Λάρισα | 2012-2013 |
| 2 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |

| | | | | |
|-------|--|----------|-----------------------|-----------|
| | | | | |
| 3 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |
| 4 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |
| 5 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |
| 6 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Θετικό | Βόλος | 2012-2013 |
| 7 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Βόλος | 2012-2013 |
| 8 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2012-2013 |
| 9 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2013-2014 |
| 10 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2013-2014 |
| 11 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2013-2014 |
| 12 ΥΠ | <i>Anas platyrhynchos</i> (πρασινοκέφαλη) | Αρνητικό | Βόλος | 2013-2014 |
| 13 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Βόλος | 2012-2013 |
| 14 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Βόλος | 2012-2013 |
| 15 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Θετικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2012-2013 |
| 16 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Βόλος | 2012-2013 |
| 17 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |
| 18 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |
| 19 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |
| 20 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |
| 21 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2012-2013 |

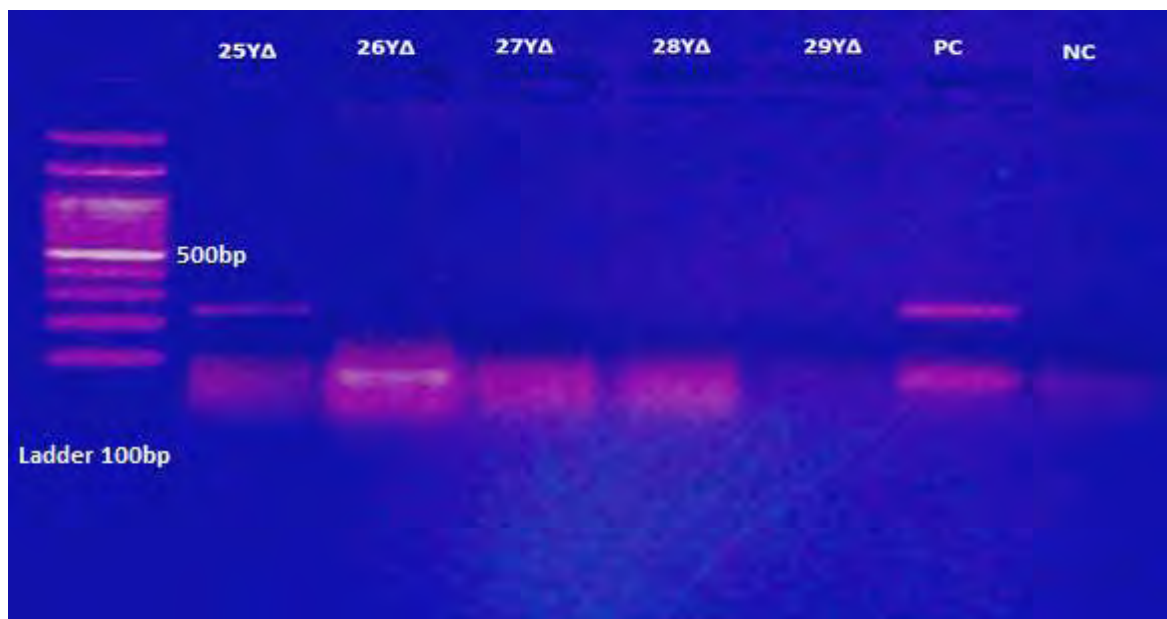
| | | | | |
|-------|---|----------|-----------------------|-----------|
| | | | | |
| 22 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2012-2013 |
| 23 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2012-2013 |
| 24ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2012-2013 |
| 25 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Θετικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2012-2013 |
| 26 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2012-2013 |
| 27 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2012-2013 |
| 28 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2012-2013 |
| 29 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2012-2013 |
| 30 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2013-2014 |
| 31 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2013-2014 |
| 32 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2013-2014 |
| 33 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2013-2014 |
| 34 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2013-2014 |
| 35 ΥΠ | <i>Anas crecca</i> (κιρκίρι) | Αρνητικό | Λάρισα | 2013-2014 |
| 36 ΥΠ | <i>Aythya ferina</i> (κυνηγόπαπια) | Αρνητικό | Βόλος | 2012-2013 |
| 37 ΥΠ | <i>Anas penelope</i> (σφυριχτάρι) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2012-2013 |
| 38 ΥΠ | <i>Aythya fuligula</i> (τσικνόπαπια) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Σοφάδες) | 2012-2013 |
| 39 ΥΠ | <i>Fulica atra</i> (φαλαρίδα) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2012-2013 |
| 40 ΥΠ | <i>Anas strepera</i> (φλυαρόπαπια) | Αρνητικό | Καρδίτσα (Παλαμάς) | 2012-2013 |



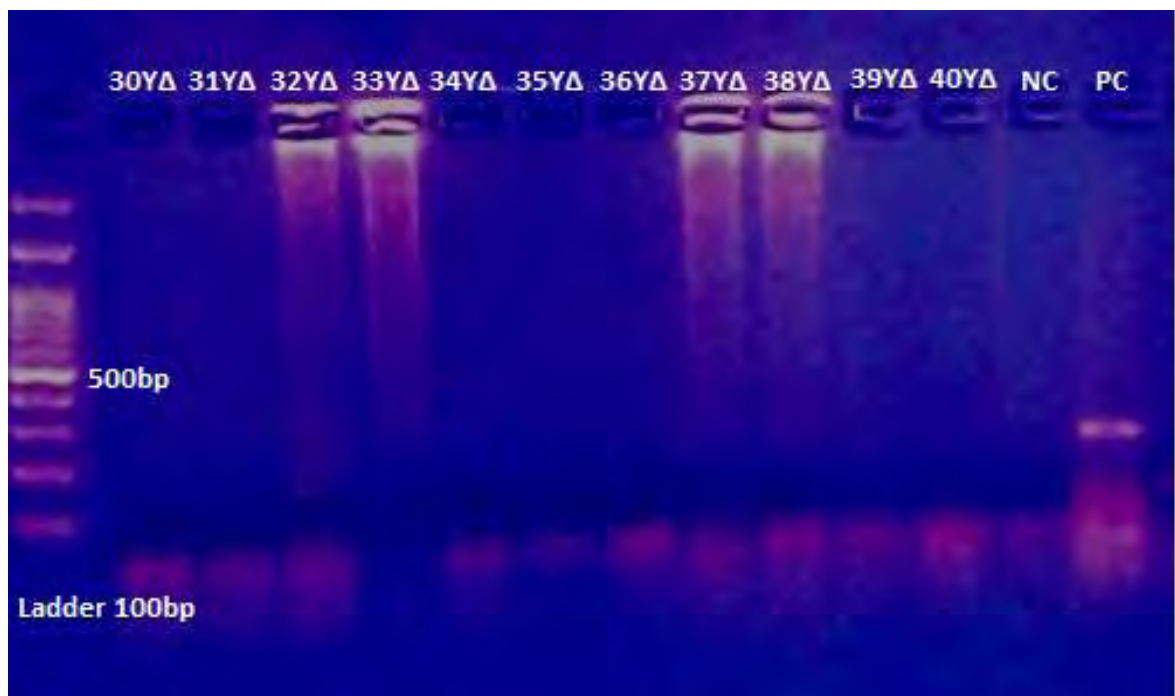
Εικόνα 9. Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της RT-PCR. Θετικά δείγματα: 1YΔ και 6YΔ, Αρνητικά δείγματα: 2YΔ-5YΔ και 7YΔ, PC: Θετικός μάρτυρας (πρότυπο στέλεχος ιού της γρίπης A από χοίρο), NC: Αρνητικός μάρτυρας, Ladder 100 bp: Δείκτης μοριακών βαρών.



Εικόνα 10. Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της RT-PCR. Θετικό δείγμα: 15YΔ, Αρνητικά δείγματα: 8YΔ-14YΔ και 16YΔ-24YΔ, PC: Θετικός μάρτυρας (πρότυπο στέλεχος ιού της γρίπης A από χοίρο), NC: Αρνητικός μάρτυρας, Ladder 100 bp: Δείκτης μοριακών βαρών.



Εικόνα11. Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της RT-PCR. Θετικό δείγμα:25YΔ, Αρνητικά δείγματα: 26YΔ-29YΔ, PC: Θετικός μάρτυρας (πρότυπο στέλεχος ιού της γρίπης Α από χοίρο), NC: Αρνητικός μάρτυρας, Ladder 100 bp: Δείκτης μοριακών βαρών



Εικόνα 12. Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της RT-PCR. Αρνητικά δείγματα: 30YΔ-40YΔ, PC: Θετικός μάρτυρας (πρότυπο στέλεχος ιού της γρίπης Α από χοίρο), NC: Αρνητικός μάρτυρας, Ladder 100 bp: Δείκτης μοριακών βαρών.

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας του ιού της γρίπης των πτηνών σε άγρια πτηνά στην περιοχή της Θεσσαλίας. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν ιστοτεμάχια από 40 άγρια πτηνά που θηρεύτηκαν κατά τις κυνηγετικές περιόδους 2012-2013 και 2013-2014. Τα υδρόβια άγρια πτηνά που επιλέχθηκαν για τη συλλογή ιστοτεμαχίων, ανήκουν στις Τάξεις *Anseriformes* (n=39), και *Gruiformes* (n=1). Για την εξέταση των δειγμάτων με RT-PCR, επιλέχθηκε σαν αλληλουχία στόχος τμήμα του γονιδίου M που είναι μια πολύ συντηρημένη περιοχή του γονιδιώματος των ιών της γρίπης Α. Σε τέσσερα από τα 40 δείγματα άγριων πτηνών που εξετάστηκαν με την RT-PCR, διαπιστώθηκε η παρουσία του ιού της γρίπης Α. Τα άγρια πτηνά που βρέθηκαν θετικά στον ιό της γρίπης Α, θηρεύτηκαν στις περιοχές της Λάρισας (μια *Anas platyrhynchos*), του Βόλου (μια *Anas platyrhynchos*) και της Καρδίτσας (μια *Anas crecca* στο χωριό Σοφάδες και μια *Anas crecca* στο χωριό Παλαμάς) κατά την κυνηγετική περίοδο 2012-2013.

Σε προηγούμενες μελέτες, ο ιός της γρίπης των πτηνών απομονώθηκε και από τις δυο Τάξεις άγριων πτηνών που επιλέχθηκαν και συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Ωστόσο, το μεγαλύτερο ποσοστό απομόνωσης έχει αναφερθεί σε πτηνά που ανήκουν στην Τάξη *Anseriformes* (Stallknecht & Shane, 1988). Με γνώμονα αυτό το γεγονός, δόθηκε έμφαση στη συλλογή δειγμάτων άγριων πτηνών που ανήκουν στην Τάξη *Anseriformes*, τα οποία αποτέλεσαν το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού της μελέτης. Ειδικότερα, τα πτηνά της Οικογένειας *Anseriformes* που εξετάστηκαν ήταν 23 *Anas crecca* (κιρκίρια), 12 *Anas platyrhynchos* (πρασινοκέφαλη), μια *Aythya ferina* (κυνηγόπαπια), μια *Anas penelope* (σφυριχτάρι), μια *Aythya fuligula* (τσικνόπαπια) και μια *Anas strepera* (φλυαρόπαπια). Ο ιός της γρίπης ανιχνεύθηκε σε 2 *Anas crecca* (κιρκίρια) και σε 2 *Anas platyrhynchos* (πρασινοκέφαλη). Η ανίχνευση του ιού της γρίπης δεν κατέστη δυνατή σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα άγριων πτηνών που εξετάστηκαν από την Τάξη *Anseriformes* καθώς και από την Τάξη *Gruiformes*.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε πληθυσμούς άγριων πτηνών σε άλλες χώρες (Stallknecht & Shane, 1988). Το γεγονός ότι ο ιός της γρίπης Α ανιχνεύθηκε μόνο σε άγρια πτηνά των ειδών *Anas crecca* και *Anas platyrhynchos*, από το σύνολο των άγριων πτηνών της μελέτης που ανήκουν στην Τάξη *Anseriformes*, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα δύο αυτά είδη αποτέλεσαν το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού της μελέτης, αυξάνοντας την πιθανότητα να βρεθούν μολυσμένα πτηνά ανάμεσά τους. Επίσης, το γεγονός ότι το ένα άγριο πτηνό της μελέτης που ανήκει στην Τάξη *Gruiformes* δεν βρέθηκε θετικό στην παρουσία του ιού της γρίπης, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι εξετάστηκε μόνο ένα άγριο πτηνό αυτής της Τάξης αλλά και στο χαμηλότερο επιπολασμό της μόλυνσης που έχει βρεθεί σε αυτά τα είδη σε άλλες χώρες (Stallknecht & Shane, 1988).

Το κάθε είδος υδρόβιου άγριου πτηνού ακολουθεί τη δική του στρατηγική μετανάστευσης και η κατανομή των πτηνών στους διάφορους τύπους υγροτόπων εξαρτάται από τις βιολογικές και οικολογικές απαιτήσεις τους. Ένας μεγάλος αριθμός υδρόβιων άγριων πτηνών μεταναστεύουν στους ελληνικούς υγροτόπους για διαχείμαση από τις βόρειες χώρες της Δυτικής Παλαιαρκτικής. Εκτιμάται ότι ο αριθμός αυτός αποτελεί ένα ποσοστό 18.2%-31.2% του συνόλου των υδρόβιων πτηνών που

διαχειμάζει στην ανατολική Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα. Τα περισσότερα είδη άγριων πτηνών έρχονται στους ελληνικούς υδροτόπους κατά τον Νοέμβριο και αρχίζουν σταδιακά την αναχώρησή τους για τις περιοχές αναπαραγωγής κατά τα τέλη Ιανουαρίου (Καζαντζίδης Σ. & Νοΐδου Μ., 2007).

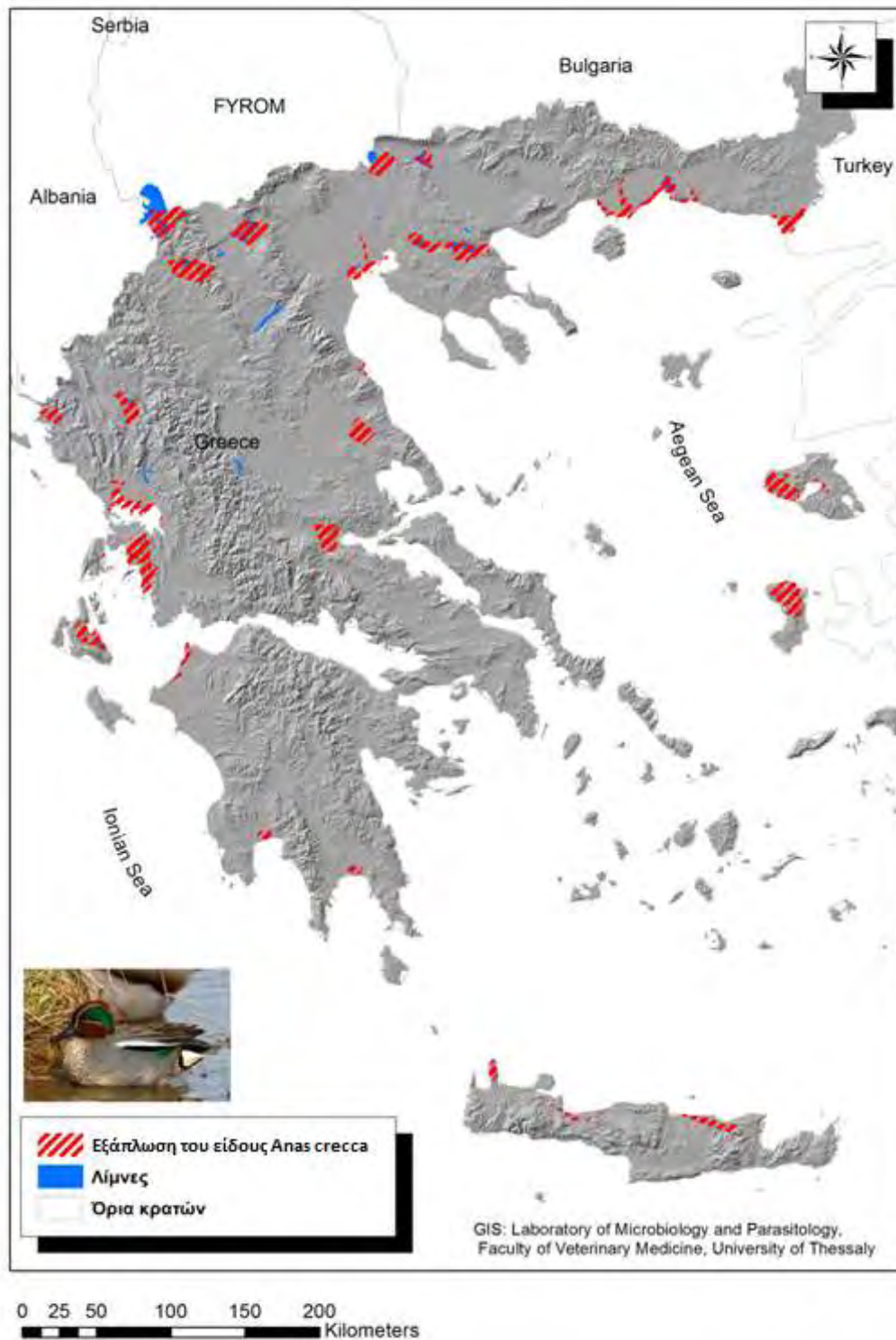
Το είδος *Anas crecca* που ανάλογα με το υποείδος (*Anas crecca crecca*, *Anas crecca carolinensis*, *Anas crecca nimia*) είναι πλήρως ή μερικώς μεταναστευτικό, παρουσιάζει ευρεία κατανομή στο Βόρειο Ημισφαίριο, από τις ανατολικές ακτές του Ειρηνικού στη Β. Αμερική, μέχρι την Ευρασία και τις δυτικές ακτές του Ειρηνικού στην Ιαπωνία. Συναντάται επίσης σε μικρότερο βαθμό στην Αφρική. Οι πληθυσμοί του υποείδους *Anas crecca crecca* αναπαράγονται στην Ευρώπη και την Ασία, κυρίως στα βόρεια και κεντρικά τμήματα των ηπείρων και διαχειμάζουν στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη, στην Αφρική και ανατολικά προς τη Μέση Ανατολή μέχρι την Ινδία, την Ινδονησία, την Ταϊβάν, την Κορέα και την Ιαπωνία. Στην Ελλάδα, το υποείδος *Anas crecca crecca* έρχεται μόνο για διαχείμαση από τον Δεκέμβριο έως τον Μάιο στη βόρεια και κεντρική χώρα. Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες καταγραφής των πτηνών του είδους *Anas crecca* στην Ελλάδα, ο πληθυσμός τους ανερχόταν στις 38.000 άτομα κατά την περίοδο 1982-1992 ενώ ο μέγιστος αριθμός καταγράφηκε το 1970, που ανήλθε στις 96.940 άτομα κατά τη χειμερινή περίοδο. Στην Εικόνα 13 απεικονίζεται η κατανομή των πτηνών του είδους *Anas crecca* στην Ελλάδα (Handrinos & Akriotis, 1997).

Τα άγρια πτηνά του είδους *Anas platyrhynchos*, παρουσιάζουν ευρεία κατανομή σε όλο το Βόρειο και Νότιο Ημισφαίριο, τη Βόρεια Αμερική από την Αλάσκα μέχρι το Μεξικό και τη Χαβάη και σε όλη την Ευρασία. Πρόκειται για ένα αυστηρά μεταναστευτικό είδος που αναπαράγεται στις βόρειες χώρες και διαχειμάζει στις νότιες. Οι μελέτες καταγραφής των πτηνών του είδους *Anas platyrhynchos* που πραγματοποιήθηκαν παλαιότερα στην Ελλάδα, έδειξαν ότι ο πληθυσμός ανερχόταν στις 23.000 άτομα κατά την περίοδο 1982-1992, ενώ ο μέγιστος αριθμός καταγράφηκε το 1970, που ανήλθε στις 71.940 άτομα στη λίμνη Κάρλα. Στην Εικόνα 14 απεικονίζεται η κατανομή των πτηνών του είδους *Anas platyrhynchos* στην Ελλάδα (Handrinos & Akriotis, 1997).

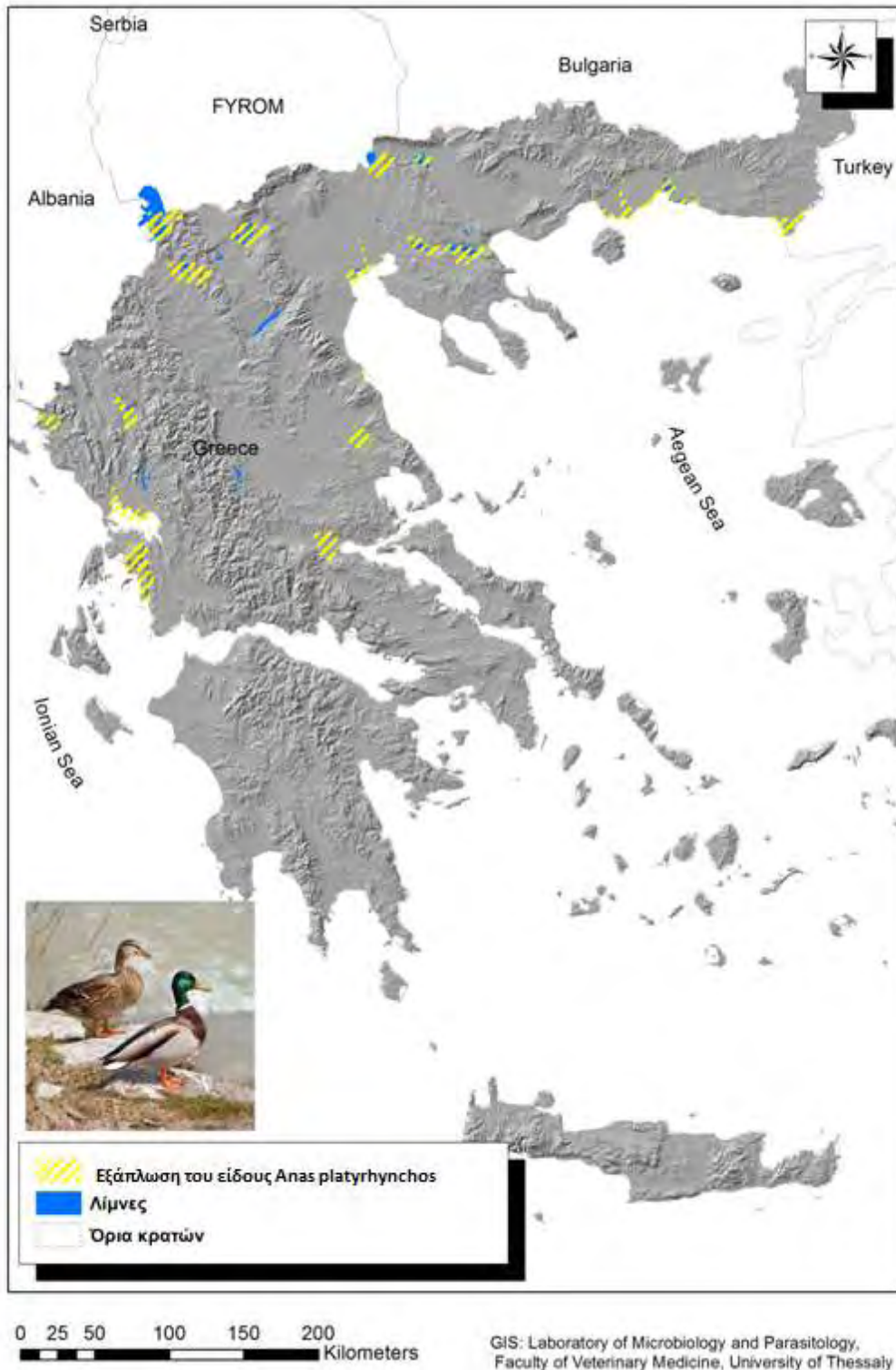
Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από το ΕΘΙΑΓΕ κατά τις χειμερινές περιόδους 2005-2006, 2006-2007, 2007-2008 σε εννέα υδροτόπους, μεταξύ άλλων δράσεων, καταγράφηκαν οι πληθυσμοί ορισμένων υδρόβιων άγριων πτηνών. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή, τα πολυπληθέστερα είδη υδρόβιων άγριων πτηνών ήταν τα *Anas crecca*, *Fulica atra*, *Anas platyrhynchos* και *Anas penelope*. Ο μέγιστος πληθυσμός του είδους *Anas crecca* (58.500 άτομα σε όλες τις περιοχές έρευνας) καταγράφηκε στις αρχές Φεβρουαρίου 2007. Ο μέγιστος αριθμός του είδους *Fulica atra* (61.204 άτομα) καταγράφηκε στα τέλη Δεκεμβρίου 2006 και ο μέγιστος αριθμός των ειδών *Anas platyrhynchos* (44.200 άτομα) και *Anas penelope* (33.821 άτομα) καταγράφηκε στα μέσα Ιανουαρίου 2006 (Καζαντζίδης Σ. & Νοΐδου Μ., 2007).

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι πτηνά από τέσσερα διαφορετικά είδη (*Anas platyrhynchos*, *Fulica atra*, *Anas penelope* και *Anas clypeata*) δακτυλιώθηκαν στο δέλτα του Έβρου και δύο *Anas platyrhynchos* που δακτυλιώθηκαν τον Ιανουάριο του 2007, ξαναβρέθηκαν, η πρώτη ζωντανή τον Απρίλιο του 2007 στη Ρωσία, περίπου 450 χλμ βορειοανατολικά της Μόσχας και 2.248χλμ βορειοανατολικά του δέλτα Έβρου και η δεύτερη βρέθηκε λίγες μέρες αργότερα από την πρώτη, νεκρή, 951 χλμ βορειοανατολικά της Μόσχας και σε απόσταση 2.657 χλμ από το δέλτα Έβρου. Αυτές είναι και οι πρώτες επανευρέσεις στο εξωτερικό, υδρόβιων πτηνών που δακτυλιώθηκαν στην Ελλάδα (Εικόνα 15) (Καζαντζίδης Σ. & Νοΐδου Μ., 2007). Έχουν επίσης καταγραφεί από

παλαιότερη μελέτη τέσσερις επανευρέσεις άγριων πτηνών του είδους *Anas platyrhynchos* που δακτυλιώθηκαν στη Ρωσία, ενός στη Σουηδία και ενός στην Ουκρανία τα οποία εντοπίστηκαν κατά την χειμερινή περίοδο στην Ελλάδα (Handrinos & Akriotis, 1997).

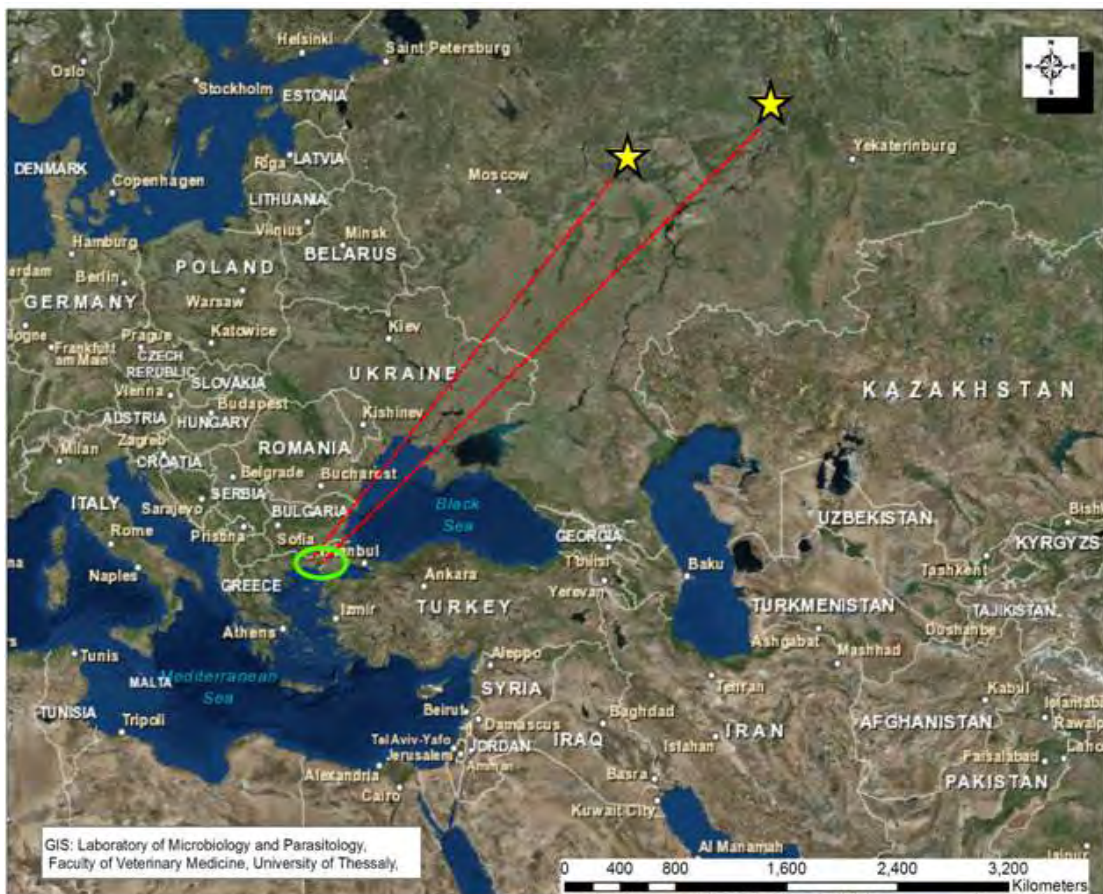


Εικόνα 13. Χάρτης εξάπλωσης του είδους *Anas crecca* στην Ελλάδα (Handrinos and Akriotis, 1997). Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές που απαντάται το είδος *Anas crecca* στην Ελλάδα. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι λίμνες.



Εικόνα 14. Χάρτης εξάπλωσης του είδους *Anas platyrhynchos* στην Ελλάδα (Handrinos and Akriotis, 1997). Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές που απαντάται το είδος *Anas platyrhynchos* στην Ελλάδα. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι λίμνες.

Σε άλλη μελέτη αναφέρθηκε ότι από τις 33 δακτυλιωμένες *Anas platyrhynchos* που επανευρέθηκαν στην Ελλάδα, οι περισσότερες προερχόταν από τη Ρωσία (Ακριώτης Τ & Χανδρινός Γ, 2004). Από αυτές, οι 24 δακτυλιώθηκαν κοντά σε περιοχές όπου αναφέρθηκε αυξημένος αριθμός κρουσμάτων από τον ιό της γρίπης Α. Οι αποστάσεις των περιοχών δακτυλίωσης από τις περιοχές όπου αναφέρθηκε μεγάλος αριθμός κρουσμάτων, ήταν από 60 έως πάνω από 100 χλμ. Οι μεγαλύτερες αποστάσεις καταγράφηκαν στη Ρωσία, κυρίως κοντά στην περιοχή του δέλτα του ποταμού Βόλγα. Η περιοχή αυτή αποτελεί μια από τις πιο κρίσιμες για την πιθανή εισαγωγή ιών της γρίπης στην Ελλάδα, λόγω της γεωγραφικής εγγύτητας με περιοχές που έχουν αναφερθεί αυξημένοι αριθμοί κρουσμάτων (Gouliamtzis, P. & Goutner, V., 2011). Στην ίδια μελέτη αναφέρθηκαν επίσης 41 επανευρέσεις δακτυλιωμένων *Anas crecca* (Ακριώτης Τ & Χανδρινός Γ, 2004). Οι θέσεις δακτυλίωσης και επανεύρεσης των *Anas platyrhynchos* και *Anas crecca* που αναφέρθηκαν στη μελέτη αυτή, απεικονίζονται στις Εικόνες 16 και 17.



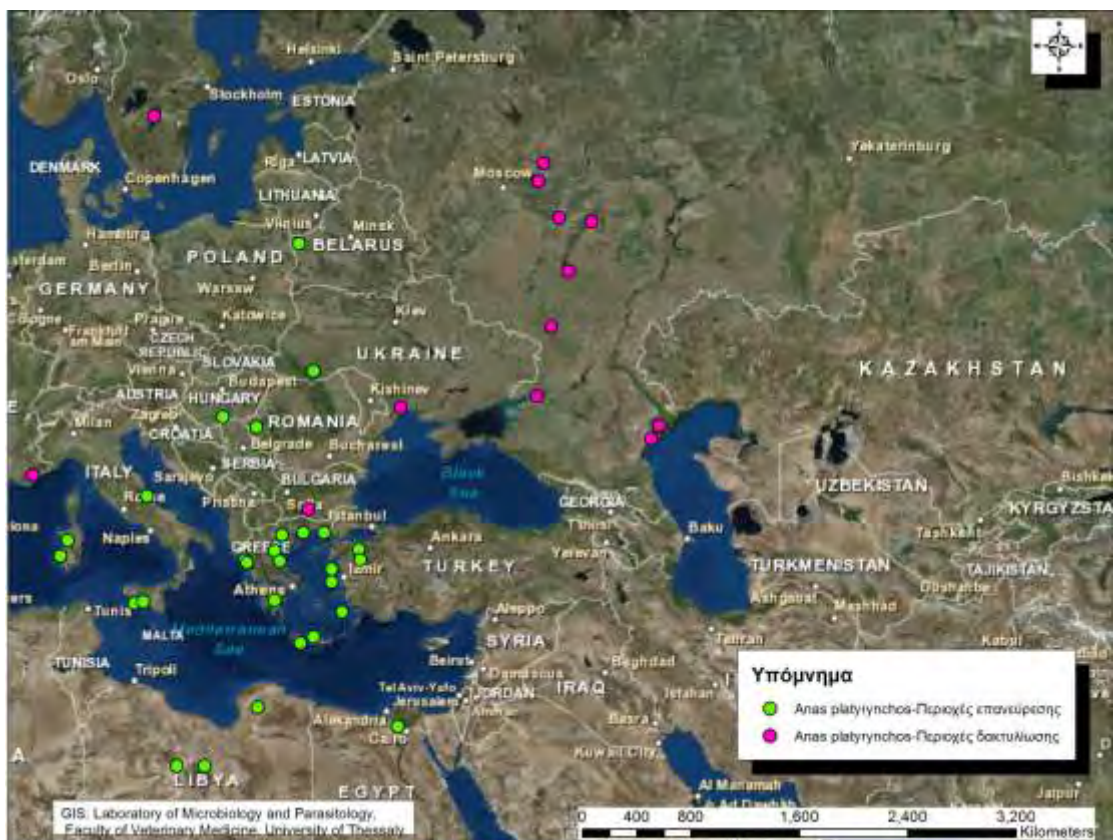
Πηγή δεδομένων: EΘΙΑΓΕ/www.nagref.gr/journals/ethg/images/31/ethg31p4-7.pdf

Εικόνα 15. Θέσεις επανεύρεσης δύο *Anas platyrhynchos* που δακτυλιώθηκαν στο δέλτα Έβρου (Καζαντζίδης Σ. & Νοϊδου Μ. 2007). Οι θέσεις επανεύρεσης απεικονίζονται με το σύμβολο του αστεριού.



Πηγή: Τ. Ακριώτης & Γ. Χανδρινός. Επανευρέσεις δακτυλιωμένων Πουλίων. (1985-2004)

Εικόνα 16. Χάρτης απεικόνισης των περιοχών δακτυλίωσης και επανεύρεσης των ειδών *Anas crecca* (Ακριώτης Τ & Χανδρινός Γ 2004). Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές επανεύρεσης και με κόκκινο χρώμα οι περιοχές δακτυλίωσης



Πηγή: Τ. Ακριώτης & Γ. Χανδρινός. Επανευρέσεις δακτυλιωμένων Πουλίων. (1985-2004)

Εικόνα 17. Χάρτης απεικόνισης των περιοχών δακτυλίωσης και επανεύρεσης των ειδών *Anas platyrhynchos* (Ακριώτης Τ & Χανδρινός Γ 2004). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές επανεύρεσης και με ροζ χρώμα οι περιοχές δακτυλίωσης.

Τα πτηνά του είδους *Anas platyrhynchos* θεωρείται πιθανότερο να μπορούν να διασπείρουν τον ιό της γρίπης σε μακρινές αποστάσεις σε σχέση με άλλα είδη πάπιας. Ειδικότερα, μια μελέτη στην οποία πραγματοποιήθηκε πειραματική μόλυνση έξι ειδών άγριων παπιών με τον ιό H5N1 (*Anas platyrhynchos*, *Anas crecca*, *Aythya ferina*, *Aythya fuligula*, *Anas penelope*, *Anas strepera*), έδειξε ότι το είδος *Anas platyrhynchos* ήταν το μόνο που είχε τη δυνατότητα να αποβάλει μεγάλη ποσότητα του ιού της γρίπης χωρίς να παρουσιάζει κλινικά ή παθολογικά ευρήματα νόσου. Κάποια χαρακτηριστικά του είδους ενισχύουν τον πιθανό ρόλο του ως φορέα του ιού της γρίπης Α σε μακρινές αποστάσεις και συμμετέχουν στην ύπαρξη πιθανής σύνδεσης μεταξύ των άγριων υδρόβιων πτηνών, των οικοσιστών ζώων και των ανθρώπων. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι το γεγονός ότι πρόκειται για το πολυπληθέστερο είδος πάπιας στη Δυτική Ευρασία (περίπου 9 εκ. άτομα), ότι μέρος του πληθυσμού μεταναστεύει σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ των περιοχών αναπαραγωγής και διαχείμασης και το ότι βρίσκεται σχεδόν σε κάθε είδος υγροτόπου και είναι πολύ ανεκτικό στην παρουσία του ανθρώπου (Keawcharoen et al., 2008).

Οι πάπιες (Τάξεις *Anatidae*, *Anatinae*) παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο μετάδοσης του ιού σε οικοσιστά πτηνά (Delogu et al., 2003), καθώς είναι οι ξενιστές από τους οποίους έχει απομονωθεί η μεγαλύτερη ποικιλία και έχει αναφερθεί η μεγαλύτερη κατανομή ιών της γρίπης (Stallknecht & Shane, 1988). Επίσης, έχουν συνδεθεί με στελέχη ιών που έχουν προκαλέσει αυξημένο αριθμό κρουσμάτων από ΗΡΑΙ ιούς στα οικοσιστά πτηνά (Munster et al., 2005). Αποβάλλουν μεγάλες ποσότητες του ιού ΗΡΑΙ H5N1 ενώ παραμένουν υγιείς και ικανές να μεταφέρουν τον ιό σε μεγάλες αποστάσεις (Hulse-Post et al., 2005). Τέλος είναι τα άγρια πτηνά που έρχονται πιο συχνά σε άμεση επαφή με τα οικοσιστά πτηνά (Gouliamtzis, P. & Goutner, V., 2011).

Το 2009 η πανδημία του ιού της γρίπης H1N1 και ο αυξημένος αριθμός κρουσμάτων από τον ιό H3N2 απέδειξαν ότι οι χοίροι αποτελούν έναν ακόμα σημαντικό κίνδυνο. Οι χοίροι θεωρούνται ενδιάμεσοι ξενιστές και μπορούν να λειτουργήσουν ως πηγή που οδηγεί στην εμφάνιση νέων ιών της γρίπης καθώς τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού τους συστήματος διαθέτουν και τους δύο τύπους υποδοχέων σιαλικών οξέων, επιτρέποντας τον ανασυνδυασμό του γενετικού υλικού των ιών του ανθρώπου και των πτηνών (Kalthoff et al., 2010). Το 2009 ξεκίνησε η πανδημία γρίπης από τον ιό H1N1 που προερχόταν από χοίρους, μετά από άμεση επαφή ανθρώπων και χοίρων. Ακολούθησε η ταχεία διασπορά του ιού μέσω της μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο. Ο χαρακτηρισμός του ιού επιβεβαίωσε την προέλευσή του από ζώα και πτηνά και τη δυνατότητα μετάδοσής του μεταξύ των ειδών. Ο αυξημένος αριθμός κρουσμάτων από τον ιό H3N2 στις ΗΠΑ προκλήθηκε επίσης λόγω της επαφής μεταξύ χοίρων και ανθρώπων (Vincent et al. 2014). Παρά το γεγονός ότι ο ιός αυτός φαίνεται να μεταδίδεται πιο εύκολα από τους χοίρους στον άνθρωπο, το Center for Disease Control and Prevention (CDC) ανέφερε επίσης τρεις περιπτώσεις μετάδοσης του ιού μεταξύ ανθρώπων κατά τη διάρκεια της περιόδου που αναφέρθηκε ο αυξημένος αριθμός κρουσμάτων.

Αξιίζει να αναφερθεί ότι μόλυνση από τα ασιατικά στελέχη του ΗΡΑΙV H5N1, αναφέρθηκε και σε αιλουροειδή μεταξύ των οποίων οι γάτες καθώς και σε σκύλους μετά από κατανάλωση μολυσμένων πτηνών. Η νόσος στις γάτες εκδηλώθηκε με υψηλό πυρετό και αναπνευστική δυσχέρεια που οδήγησαν στο θάνατο. Οι μολυσμένες γάτες που ζουν σε ενδημικές περιοχές αποτελούν επίσης έναν μεγάλο κίνδυνο λόγω της στενής τους επαφής με άγρια και οικοσιστά πτηνά και ανθρώπους (Kalthoff et al., 2010).

Οι ιοί της γρίπης Α (HPAI και LPAI) αποτελούν μεγάλο κίνδυνο για τον άνθρωπο λόγω της ικανότητάς τους να μεταδίδονται απευθείας από τα πτηνά. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα υδρόβια και άλλα μεταναστευτικά άγρια πτηνά έχουν αναγνωριστεί ως οι δεξαμενές και το κύριο μέσο μεταφοράς νέων ιών της γρίπης από τη μια ήπειρο στην άλλη μέσω των μεταναστευτικών διαδρομών. Οι ιοί που προκάλεσαν πανδημίες το 1918, 1957 και 1968 προέκυψαν είτε από ανασυνδυασμό μεταξύ των ιών των ανθρώπων και των πτηνών, είτε μετά από άμεση εισαγωγή των ιών στον ανθρώπινο πληθυσμό μέσω των πτηνών. Επίσης, πέντε υπότυποι των ιών της γρίπης των πτηνών είναι γνωστό ότι έχουν προκαλέσει σποραδικά νόσο στον άνθρωπο μετά από άμεση επαφή με πτηνά. Οι ιοί αυτοί είναι οι HPAIV H5N1, LPAIV και HPAIV H7N3, LPAIV και HPAIV H7N7, LPAIV H9N2, και LPAIV H10N7. Πριν το 1996, υπήρξαν μόνο τρεις περιπτώσεις ιών της γρίπης των πτηνών που προσέβαλαν απευθείας ανθρώπους και η περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού τους σε πρωτεύοντα αποδόθηκε στο ότι ο άνθρωπος και τα πτηνά ανήκουν σε διαφορετικές Τάξεις (inter class barrier). Τα τελευταία χρόνια, αναφέρεται συχνότερα η μόλυνση των ανθρώπων από ιούς της γρίπης των πτηνών των υπότυπων H5 και H7 (Kalthoff et al., 2010).

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη αναφέρεται η ανίχνευση του ιού της γρίπης Α σε υδρόβια μεταναστευτικά άγρια πτηνά που διαχειμάζουν στη χώρα μας και ανήκουν στα είδη *Anas platyrhynchos* και *Anas crecca*. Η έρευνα αυτή μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για περεταίρω διερεύνηση της παρουσίας του ιού της γρίπης σε άγρια πτηνά σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, για τον χαρακτηρισμό των υπότυπων του ιού της γρίπης που κυκλοφορούν στη χώρα μας και για τον προσδιορισμό της κατανομής του ιού σε γεωγραφικό επίπεδο και επίπεδο ξενιστών. Δεδομένου ότι τα στελέχη της γρίπης Α μπορούν να κυκλοφορούν και να ανασυνδυάζονται μεταξύ των άγριων και οικόσιτων πτηνών και των χοίρων, με αποτέλεσμα να μεταδίδονται στον άνθρωπο προκαλώντας μέτρια ή σοβαρή νόσο, η πιθανότητα πρόκλησης μελλοντικών πανδημιών γρίπης πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι υπάρχει η ανάγκη για συνεχή επιτήρηση των πληθυσμών άγριων πτηνών, προκειμένου να επιτευχθεί αφενός η έγκαιρη αναγνώριση των νέων υπότυπων των ιών της γρίπης που κυκλοφορούν στην Ελλάδα και αφετέρου η λήψη μέτρων πρόληψης για την προστασία της Δημόσιας Υγείας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelwhab, E. M., J. Veits, and T. C. Mettenleiter.** (2014). "Prevalence and Control of H7 Avian Influenza Viruses in Birds and Humans." *Epidemiology and Infection* 142 (05): 896–920.
- Afifi, Manal A. A., Magdy F. El-Kady, Sahar A. Zoelfakar, Ahmed Sayed Abdel-Moneim, and Ahmed Sayed Abddel-Moneim.** (2013). "Serological Surveillance Reveals Widespread Influenza A H7 and H9 Subtypes among Chicken Flocks in Egypt." *Tropical Animal Health and Production* 45 (2): 687–90.
- Akey, B. L.** (2003). "Low-Pathogenicity H7N2 Avian Influenza Outbreak in Virginia during 2002." *Avian Diseases* 47 (3 Suppl): 1099–1103.
- Alexander, Dennis J.** (2007). "An Overview of the Epidemiology of Avian Influenza." *Vaccine* 25 (30): 5637–44..
- Alexander, D. J.** (2000). *The History of Avian Influenza in Poultry*, 7–8.
- Alexander, D J, W H Allan, D G Parsons, and G Parsons.** (1978). "The Pathogenicity of Four Avian Influenza Viruses for Fowls, Turkeys and Ducks." *Research in Veterinary Science* 24 (2): 242–47.
- Alexander, D. J., and R. E. Gough.** (1986). "Isolations of Avian Influenza Virus from Birds in Great Britain." *The Veterinary Record* 118 (19): 537–38.
- Alexander, D J, G Parsons, and R J Manvell.** (1986). "Experimental Assessment of the Pathogenicity of Eight Avian Influenza A Viruses of H5 Subtype for Chickens, Turkeys, Ducks and Quail." *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A* 15 (4): 647–62.
- Alexander, D. J., and D. Spackman.** (1981). "Characterisation of Influenza A Viruses Isolated from Turkeys in England during March-May 1979." *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A* 10 (3): 281–93.
- Altmüller, A, M Kunerl, K Müller, V S Hinshaw, W M Fitch, and C Scholtissek.** (1992). "Genetic Relatedness of the Nucleoprotein (NP) of Recent Swine, Turkey, and Human Influenza A Virus (H1N1) Isolates." *Virus Research* 22 (1): 79–87.
- Banks, J., E. C. Speidel, J. W. McCauley, and D. J. Alexander.** (2000). "Phylogenetic Analysis of H7 Haemagglutinin Subtype Influenza A Viruses." *Archives of Virology* 145 (5): 1047–58.
- Beard, C. W., and D. H. Helfer.** (1972). "Isolation of Two Turkey Influenza Viruses in Oregon." *Avian Diseases* 16 (5): 1133–36.
- Beare, A. S., and R. G. Webster.** (1991). "Replication of Avian Influenza Viruses in Humans." *Archives of Virology* 119 (1-2): 37–42.
- Bulach, Dieter, Rebecca Halpin, David Spiro, Laura Pomeroy, Daniel Janies, and David B. Boyle.** (2010). "Molecular Analysis of H7 Avian Influenza Viruses from Australia and New Zealand: Genetic Diversity and Relationships from 1976 to 2007." *Journal of Virology* 84 (19): 9957–66.
- Bulletin of the World Health Organization.** (1980). *A Revision of the System of Nomenclature for Influenza Viruses: A WHO Memorandum* 58 (4): 585–91.
- Callan, R. J., G. Early, H. Kida, and V. S. Hinshaw.** (1995). "The Appearance of H3 Influenza Viruses in Seals." *The Journal of General Virology* 76 (Pt 1) (January): 199–203.
- Campitelli, Laura, Elvira Mogavero, Maria Alessandra De Marco, Mauro Delogu, Simona Puzelli, Fabiola Frezza, Marzia Facchini, et al.** (2004). "Interspecies Transmission of an H7N3 Influenza Virus from Wild Birds to Intensively Reared Domestic Poultry in Italy." *Virology* 323 (1): 24–36.

Capua, Ilaria, S. Marangon, Lucia Selli, D. J. Alexander, D. E. Swayne, Manuela Dalla Pozza, E. Parenti, and F. M. Cancellotti. (1999). "Outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N2) in Italy during October 1997 to January 1998." *Avian Pathology* 28 (5): 455–60.

Chen, H., G. J. D. Smith, S. Y. Zhang, K. Qin, J. Wang, K. S. Li, R. G. Webster, J. S. M. Peiris, and Y. Guan. (2005). "Avian Flu: H5N1 Virus Outbreak in Migratory Waterfowl." *Nature* 436 (7048): 191–92..

Couacy-Hymann, E., A. V. Kouakou, C. K. Kouamé, A. L. Kouassi, Y. M. Koffi, P. Godji, P. Nana, Z. Tarnagda, and C. Akoua-Koffi. (2012). "Surveillance for Avian Influenza and Newcastle Disease in Backyard Poultry Flocks in Côte d'Ivoire, 2007-2009." *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 31 (3): 821–28.

Delogu, M., M. A. De Marco, I. Donatelli, L. Campitelli, and E. Catelli. (2003). "Ecological Aspects of Influenza A Virus Circulation in Wild Birds of the Western Palearctic." *Veterinary Research Communications* 27 Suppl 1 (September): 101–6.

Downie, J. C., and W. G. Laver. (1973). "Isolation of a Type A Influenza Virus from an Australian Pelagic Bird." *Virology* 51 (2): 259–69.

Driskell, Elizabeth A., Cheryl A. Jones, David E. Stallknecht, Elizabeth W. Howerth, and S. Mark Tompkins. (2010). "Avian Influenza Virus Isolates from Wild Birds Replicate and Cause Disease in a Mouse Model of Infection." *Virology* 399 (2): 280–89.

Dunn, P. A., E. A. Wallner-Pendleton, H. Lu, D. P. Shaw, D. Kradel, D. J. Henzler, P. Miller, D. W. Key, M. Ruano, and S. Davison. (2003). "Summary of the 2001-02 Pennsylvania H7N2 Low Pathogenicity Avian Influenza Outbreak in Meat Type Chickens." *Avian Diseases* 47 (3 Suppl): 812–16.

Easterday, B. C., D. O. Trainer, B. Tůmová, and H. G. Pereira. (1968). "Evidence of Infection with Influenza Viruses in Migratory Waterfowl." *Nature* 219 (5153): 523–24.

ECDC. (2013). "Human Infection with a Novel Avian Influenza Virus, A(H7N9) – China."

Ellis, Trevor M., R. Barry Bousfield, Lucy A. Bissett, Kitman C. Dyrting, Geraldine S. M. Luk, S. T. Tsim, Katharine Sturm-Ramirez, Robert G. Webster, Yi Guan, and J. S. Malik Peiris. (2004). "Investigation of Outbreaks of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza in Waterfowl and Wild Birds in Hong Kong in Late 2002." *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A* 33 (5): 492–505.

Englund, L., B. Klingeborn, and T. Mejerland. (1986). "Avian Influenza A Virus Causing an Outbreak of Contagious Interstitial Pneumonia in Mink." *Acta Veterinaria Scandinavica* 27 (4): 497–504.

Fouchier, R. A., T. M. Bestebroer, S. Herfst, L. Van Der Kemp, G. F. Rimmelzwaan, and A. D. Osterhaus. (2000). "Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11): 4096–4101.

Fouchier, Ron A. M., Vincent Munster, Anders Wallensten, Theo M. Bestebroer, Sander Herfst, Derek Smith, Guus F. Rimmelzwaan, Björn Olsen, and Albert D. M. E. Osterhaus. (2005). "Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls." *Journal of Virology* 79 (5): 2814–22.

Gaidet, Nicolas, Julien Cappelle, John Y. Takekawa, Diann J. Prosser, Samuel A. Iverson, David C. Douglas, William M. Perry, Taej Mundkur, and Scott H. Newman. (2010). "Potential Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 by Wildfowl: Dispersal Ranges and Rates Determined from Large-Scale Satellite Telemetry: Potential Dispersal of H5N1 HPAI Virus by Wildfowl." *Journal of Applied Ecology* 47 (5): 1147–57.

Gaidet, Nicolas, Giovanni Cattoli, Saliha Hammoumi, Scott H. Newman, Ward Hagemeijer, John Y. Takekawa, Julien Cappelle, et al. (2008). "Evidence of Infection by H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Healthy Wild Waterfowl." *PLoS Pathogens* 4 (8): e1000127.

- Gauthier-Clerc, M., C. Lebarbenchon, and F. Thomas. (2007). "Recent Expansion of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1: A Critical Review: Recent Expansion of Avian Influenza H5N1." *Ibis* 149 (2): 202–14.
- Geraci, J. R., D. J. St Aubin, I. K. Barker, R. G. Webster, V. S. Hinshaw, W. J. Bean, H. L. Ruhnke, et al. (1982). "Mass Mortality of Harbor Seals: Pneumonia Associated with Influenza A Virus." *Science (New York, N.Y.)* 215 (4536): 1129–31.
- Gilbert, Marius, Scott H. Newman, John Y. Takekawa, Leo Loth, Chandrashekhar Biradar, Diann J. Prosser, Sivananinthaperumal Balachandran, et al. (2010). "Flying over an Infected Landscape: Distribution of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Risk in South Asia and Satellite Tracking of Wild Waterfowl." *EcoHealth* 7 (4): 448–58. doi.
- Gilbert, Marius, Xiangming Xiao, Joseph Domenech, Juan Lubroth, Vincent Martin, and Jan Slingenbergh. (2006). "Anatidae Migration in the Western Palearctic and Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus." *Emerging Infectious Diseases* 12 (11): 1650–56.
- Gouliamtzis, P., and Goutner, V. (2011). "Tracking Possible Ways of Transmission of the Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 to Greece Using Ringing Recoveries of Wild Birds" *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 15: 135–44.
- Handrinos, George, and Triantaphyllos Akriotis. (1997). *The Birds of Greece*. London: C. Helm.
- Hanson, B. A., D. E. Stallknecht, D. E. Swayne, L. A. Lewis, and D. A. Senne. (2003). "Avian Influenza Viruses in Minnesota Ducks during 1998–2000." *Avian Diseases* 47 (3 Suppl): 867–71.
- Hill, Nichola J., John Y. Takekawa, Joshua T. Ackerman, Keith A. Hobson, Garth Herring, Carol J. Cardona, Jonathan A. Runstadler, and Walter M. Boyce. (2012). "Migration Strategy Affects Avian Influenza Dynamics in Mallards (*Anas platyrhynchos*)." *Molecular Ecology* 21 (24): 5986–99.
- Hinshaw, Virginia S., Robert G. Webster, and Bruce Turner. (1979). "Water-Borne Transmission of Influenza A Viruses?" *Intervirology* 11 (1): 66–68.
- Hinshaw, V. S., W. J. Bean, J. Geraci, P. Fiorelli, G. Early, and R. G. Webster. (1986). "Characterization of Two Influenza A Viruses from a Pilot Whale." *Journal of Virology* 58 (2): 655–56.
- Hinshaw, V. S., R. G. Webster, B. C. Easterday, and W. J. Bean. (1981). "Replication of Avian Influenza A Viruses in Mammals." *Infection and Immunity* 34 (2): 354–61.
- Hinshaw, V S, R G Webster, and B Turner. (1980). "The Perpetuation of Orthomyxoviruses and Paramyxoviruses in Canadian Waterfowl." *Canadian Journal of Microbiology* 26 (5): 622–29.
- Homme, P. J., B. C. Easterday, and D. P. Anderson. (1970). "Avian Influenza Virus Infections. II. Experimental Epizootiology of Influenza A-Turkey-Wisconsin-1966 Virus in Turkeys." *Avian Diseases* 14 (2): 240–47.
- Horimoto, T., K. Nakayama, S. P. Smeekens, and Y. Kawaoka. (1994). "Proprotein-Processing Endoproteases PC6 and Furin Both Activate Hemagglutinin of Virulent Avian Influenza Viruses." *Journal of Virology* 68 (9): 6074–78.
- Hulse-Post, D. J., K. M. Sturm-Ramirez, J. Humberd, P. Seiler, E. A. Govorkova, S. Krauss, C. Scholtissek, et al. (2005). "Role of Domestic Ducks in the Propagation and Biological Evolution of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses in Asia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (30): 10682–87.
- International Office of Epizootics, and Biological Standards Commission. 2012. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: (mammals, Birds and Bees)*. Paris: Office international des épizooties.
- Ito, T, K Okazaki, Y Kawaoka, A Takada, R G Webster, and H Kida. (1995). "Perpetuation of Influenza A Viruses in Alaskan Waterfowl Reservoirs." *Archives of Virology* 140 (7): 1163–72.
- Kalthoff, Donata, Anja Globig, and Martin Beer. (2010). "(Highly Pathogenic) Avian Influenza as a Zoonotic Agent." *Veterinary Microbiology* 140 (3–4): 237–45.

- Kawaoka, Y, T M Chambers, W L Sladen, and R G Webster. (1988). "Is the Gene Pool of Influenza Viruses in Shorebirds and Gulls Different from That in Wild Ducks?" *Virology* 163 (1): 247–50.
- Keawcharoen, Juthatip, Debby van Riel, Geert van Amerongen, Theo Bestebroer, Walter E. Beyer, Rob van Lavieren, Albert D.M.E. Osterhaus, Ron A.M. Fouchier, and Thijs Kuiken. (2008). "Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1)." *Emerging Infectious Diseases* 14 (4): 600–607.
- Kilpatrick, A. Marm, Aleksei A. Chmura, David W. Gibbons, Robert C. Fleischer, Peter P. Marra, and Peter Daszak. (2006). "Predicting the Global Spread of H5N1 Avian Influenza." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (51): 19368–73.
- Kim, Hye-Ryoung, Choi-Kyu Park, Youn-Jeong Lee, Jae-Ku Oem, Hyun-Mi Kang, Jun-Gu Choi, O.-Soo Lee, and You-Chan Bae. (2012). "Low Pathogenic H7 Subtype Avian Influenza Viruses Isolated from Domestic Ducks in South Korea and the Close Association with Isolates of Wild Birds." *The Journal of General Virology* 93 (Pt 6): 1278–87.
- Kim, Jeong-Ki, Nicholas J. Negovetich, Heather L. Forrest, and Robert G. Webster. (2009). "Ducks: The 'Trojan Horses' of H5N1 Influenza." *Influenza and Other Respiratory Viruses* 3 (4): 121–28.
- Krauss, Scott, Caroline A. Obert, John Franks, David Walker, Kelly Jones, Patrick Seiler, Larry Niles, et al. (2007). "Influenza in Migratory Birds and Evidence of Limited Intercontinental Virus Exchange." *PLoS Pathogens* 3 (11): e167.
- Ladman, B. S., C. P. Driscoll, C. R. Pope, R. D. Slemons, and J. Gelb. (2010). "Potential of Low Pathogenicity Avian Influenza Viruses of Wild Bird Origin to Establish Experimental Infections in Turkeys and Chickens." *Avian Diseases* 54 (3): 1091–94.
- Lang, G., A. Gagnon, and J. R. Geraci. (1981). "Isolation of an Influenza A Virus from Seals." *Archives of Virology* 68 (3-4): 189–95.
- Lau, Lok-Ting, Jill Banks, Rebecca Aherne, Ian H Brown, Natalie Dillon, Richard A Collins, Ka-Yun Chan, Yin-Wan Wendy Fung, Jun Xing, and Albert C H Yu. (2004). "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Methods to Detect Avian Influenza Virus." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (2): 336–42.
- Lebarbenchon, Camille, and David E. Stallknecht. (2011). "Host Shifts and Molecular Evolution of H7 Avian Influenza Virus Hemagglutinin." *Virology Journal* 8: 328.
- Lee, D.-H., J.-H. Kwon, J.-K. Park, Y.-N. Lee, S.-S. Yuk, J.-B. Lee, S.-Y. Park, I.-S. Choi, and C.-S. Song. (2012). "Characterization of Low-Pathogenicity H5 and H7 Korean Avian Influenza Viruses in Chickens." *Poultry Science* 91 (12): 3086–90.
- Liu, J., H. Xiao, F. Lei, Q. Zhu, K. Qin, X.-W. Zhang, X.-L. Zhang, et al. (2005). "Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Infection in Migratory Birds." *Science (New York, N.Y.)* 309 (5738): 1206.
- Li, Yanbing, Chengjun Li, Liling Liu, Hongwei Wang, Chuanbin Wang, Guobing Tian, Robert G. Webster, Kangzhen Yu, and Hualan Chen. (2006). "Characterization of an Avian Influenza Virus of Subtype H7N2 Isolated from Chickens in Northern China." *Virus Genes* 33 (1): 117–22.
- Lupiani, Blanca, and Sanjay M. Reddy. (2009). "The History of Avian Influenza." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32 (4): 311–23.
- Lvov, D. K., V. M. Zdanov, A. A. Sazonov, N. A. Braude, E. A. Vladimirtseva, L. V. Agafonova, E. I. Skljanskaja, et al. (1978). "Comparison of Influenza Viruses Isolated from Man and from Whales." *Bulletin of the World Health Organization* 56 (6): 923–30.
- Manvell, R. J., P. McKinney, U. Wernery, and K. Frost. (2000). "Isolation of a Highly Pathogenic Influenza A Virus of Subtype H7N3 from a Peregrine Falcon (*Falco Peregrinus*)." *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A* 29 (6): 635–37.
- Marché, Sylvie, Gerwin Claes, Steven Van Borm, Didier Vangeluwe, Thierry van den Berg, and Bénédict Lambrecht. (2012). "Different Replication Profiles in Specific-Pathogen-Free Chickens

- of Two H7 Low Pathogenic Avian Influenza Viruses Isolated from Wild Birds." *Avian Diseases* 56 (4 Suppl): 959–65.
- Miller, R. S., S. J. Sweeney, J. E. Akkina, and E. K. Saito.** (2014). "Potential Intercontinental Movement of Influenza A(H7N9) Virus into North America by Wild Birds: Application of a Rapid Assessment Framework." *Transboundary and Emerging Diseases*, March..
- Mohan, R., Y. M. Saif, G. A. Erickson, G. A. Gustafson, and B. C. Easterday.** (1981). "Serologic and Epidemiologic Evidence of Infection in Turkeys with an Agent Related to the Swine Influenza Virus." *Avian Diseases* 25 (1): 11–16.
- Morgan, I. R., and H. A. Westbury.** (1981). "Virological Studies of Adelie Penguins (*Pygoscelis Adeliae*) in Antarctica." *Avian Diseases* 25 (4): 1019–26.
- Munster, Vincent J., Anders Wallensten, Chantal Baas, Guus F. Rimmelzwaan, Martin Schutten, Björn Olsen, Albert D. M. E. Osterhaus, and Ron A. M. Fouchier.** (2005). "Mallards and Highly Pathogenic Avian Influenza Ancestral Viruses, Northern Europe." *Emerging Infectious Diseases* 11 (10): 1545–51.
- Narayan, O, G Lang, and B T Rouse.** (1969). "A New Influenza A Virus Infection in Turkeys. IV. Experimental Susceptibility of Domestic Birds to Virus Strain Turkey-Ontario 7732-1966." *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung* 26 (1): 149–65.
- Noda, Takeshi, Hiroshi Sagara, Albert Yen, Ayato Takada, Hiroshi Kida, R. Holland Cheng, and Yoshihiro Kawaoka.** (2006). "Architecture of Ribonucleoprotein Complexes in Influenza A Virus Particles." *Nature* 439 (7075): 490–92.
- OIE 2006.** "Follow-up Report No.: 5, OIE Ref: 3850, Report Date: 22/08/2006, Country: Greece."
- Olsen, Björn, Vincent J Munster, Anders Wallensten, Jonas Waldenström, Albert D M E Osterhaus, and Ron A M Fouchier.** (2006). "Global Patterns of Influenza a Virus in Wild Birds." *Science (New York, N.Y.)* 312 (5772): 384–88.
- Palese P., and Shaw M.** (2007). "Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication". In: *Fields Virology*. 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Pasick, John, Janice Pedersen, and Mario Solis Hernandez.** (2012). "Avian Influenza in North America, 2009-2011." *Avian Diseases* 56 (4 Suppl): 845–48.
- Pawar, Shailesh D., Sandeep D. Kale, Amol S. Rawankar, Santosh S. Koratkar, Chandrashekhar G. Raut, Satish A. Pande, Jayati Mullick, and Akhilesh C. Mishra.** (2012). "Avian Influenza Surveillance Reveals Presence of Low Pathogenic Avian Influenza Viruses in Poultry during 2009-2011 in the West Bengal State, India." *Virology Journal* 9: 151.
- Postel, Alexander, Tobias Letzel, Sieghard Frischmann, Christian Grund, Martin Beer, and Timm Harder.** (2010). "Evaluation of Two Commercial Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for Detection of Avian Influenza H5 and H7 Hemagglutinin Genes." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 22 (1): 61–66.
- Prosser, Diann J., John Y. Takekawa, Scott H. Newman, Baoping Yan, David C. Douglas, Yuansheng Hou, Zhi Xing, et al.** (2009). "Satellite-Marked Waterfowl Reveal Migratory Connection between H5N1 Outbreak Areas in China and Mongolia." *Ibis* 151 (3): 568–76.
- Rott, R., H. D. Klenk, Y. Nagai, and M. Tashiro.** (1995). "Influenza Viruses, Cell Enzymes, and Pathogenicity." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152 (4 Pt 2): S16–19.
- Saif, Y. M., and H. John Barnes, eds.** (2008). *Diseases of Poultry*. 12th ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub. Professional.
- Salzberg, Steven L., Carl Kingsford, Giovanni Cattoli, David J. Spiro, Daniel A. Janies, Mona Mehrez Aly, Ian H. Brown, et al.** (2007). "Genome Analysis Linking Recent European and African Influenza (H5N1) Viruses." *Emerging Infectious Diseases* 13 (5): 713–18.
- Senne, D. A.** (2003). "Avian Influenza in the Western Hemisphere Including the Pacific Islands and Australia." *Avian Diseases* 47 (3 Suppl): 798–805.

- Senne, Dennis A.** (2007). "Avian Influenza in North and South America, 2002-2005." *Avian Diseases* 51 (1 Suppl): 167–73.
- Senne, Dennis A.** (2010). "Avian Influenza in North and South America, the Caribbean, and Australia, 2006-2008." *Avian Diseases* 54 (1 Suppl): 179–86.
- Sharp, G B, Y Kawaoka, S M Wright, B Turner, V Hinshaw, and R G Webster.** (1993). "Wild Ducks Are the Reservoir for Only a Limited Number of Influenza A Subtypes." *Epidemiology and Infection* 110 (1): 161–76.
- Shortridge, K F, N N Zhou, Y Guan, P Gao, T Ito, Y Kawaoka, S Kodihalli, et al.** (1998). "Characterization of Avian H5N1 Influenza Viruses from Poultry in Hong Kong." *Virology* 252 (2): 331–42.
- Sims, L D, J Domenech, C Benigno, S Kahn, A Kamata, J Lubroth, V Martin, and P Roeder.** (2005). "Origin and Evolution of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza in Asia." *The Veterinary Record* 157 (6): 159–64.
- Skehel, J. J., and D. C. Wiley.** (2000). "Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin." *Annual Review of Biochemistry* 69: 531–69.
- Slemons, R. D., D. C. Johnson, J. S. Osborn, and F. Hayes.** (1974). "Type-A Influenza Viruses Isolated from Wild Free-Flying Ducks in California." *Avian Diseases* 18 (1): 119–24.
- Song, Haichen, Hongquan Wan, Yonas Araya, and Daniel R. Perez.** (2009). "Partial Direct Contact Transmission in Ferrets of a Mallard H7N3 Influenza Virus with Typical Avian-like Receptor Specificity." *Virology Journal* 6: 126.
- Spackman, Erica, Jack Gelb, Lauren A. Preskenis, Brian S. Ladman, Conrad R. Pope, Mary J. Pantin-Jackwood, and Enid T. McKinley.** (2010). "The Pathogenesis of Low Pathogenicity H7 Avian Influenza Viruses in Chickens, Ducks and Turkeys." *Virology Journal* 7: 331.
- Spackman, Erica, Hon S Ip, David L Suarez, Richard D Slemons, and David E Stallknecht.** (2008). "Analytical Validation of a Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Test for Pan-American Lineage H7 Subtype Avian Influenza Viruses." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 20 (5): 612–16.
- Spackman, Erica, Kevin G. McCracken, Kevin Winker, and David E. Swayne.** (2006). "H7N3 Avian Influenza Virus Found in a South American Wild Duck Is Related to the Chilean 2002 Poultry Outbreak, Contains Genes from Equine and North American Wild Bird Lineages, and Is Adapted to Domestic Turkeys." *Journal of Virology* 80 (15): 7760–64.
- Spackman, Erica, Dennis A Senne, T J Myers, Leslie L Bulaga, Lindsey P Garber, Michael L Perdue, Kenton Lohman, Luke T Daum, and David L Suarez.** (2002). "Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes." *Journal of Clinical Microbiology* 40 (9): 3256–60.
- Spackman, Erica, David E. Stallknecht, Richard D. Slemons, Kevin Winker, David L. Suarez, Melissa Scott, and David E. Swayne.** (2005). "Phylogenetic Analyses of Type A Influenza Genes in Natural Reservoir Species in North America Reveals Genetic Variation." *Virus Research* 114 (1-2): 89–100.
- Spackman, Erica, and David L Suarez.** (2008). "Detection and Identification of the H5 Hemagglutinin Subtype by Real-Time RT-PCR." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 436: 27–33.
- Stallknecht, D E, and S M Shane.** (1988). "Host Range of Avian Influenza Virus in Free-Living Birds." *Veterinary Research Communications* 12 (2-3): 125–41.
- Stallknecht, D E, S M Shane, M T Kearney, and P J Zwank.** (1990). "Persistence of Avian Influenza Viruses in Water." *Avian Diseases* 34 (2): 406–11.
- Stallknecht, D. E., S. M. Shane, P. J. Zwank, D. A. Senne, and M. T. Kearney.** (1990). "Avian Influenza Viruses from Migratory and Resident Ducks of Coastal Louisiana." *Avian Diseases* 34 (2): 398–405.

- Suarez, D. L., M. Garcia, J. Latimer, D. Senne, and M. Perdue. (1999). "Phylogenetic Analysis of H7 Avian Influenza Viruses Isolated from the Live Bird Markets of the Northeast United States." *Journal of Virology* 73 (5): 3567–73.
- Suarez, D. L., M. L. Perdue, N. Cox, T. Rowe, C. Bender, J. Huang, and D. E. Swayne. (1998). "Comparisons of Highly Virulent H5N1 Influenza A Viruses Isolated from Humans and Chickens from Hong Kong." *Journal of Virology* 72 (8): 6678–88.
- Suarez, D. L., and S. Schultz-Cherry. (2000). "Immunology of Avian Influenza Virus: A Review." *Developmental and Comparative Immunology* 24 (2-3): 269–83.
- Suarez, D. L., E. Spackman, and D. A. Senne. (2003). "Update on Molecular Epidemiology of H1, H5, and H7 Influenza Virus Infections in Poultry in North America." *Avian Diseases* 47 (3 Suppl): 888–97.
- Swayne, David E., and Joan R. Beck. (2005). "Experimental Study to Determine If Low-Pathogenicity and High-Pathogenicity Avian Influenza Viruses Can Be Present in Chicken Breast and Thigh Meat Following Intranasal Virus Inoculation." *Avian Diseases* 49 (1): 81–85.
- Swayne, D. E., M. Garcia, J. R. Beck, N. Kinney, and D. L. Suarez. (2000). "Protection against Diverse Highly Pathogenic H5 Avian Influenza Viruses in Chickens Immunized with a Recombinant Fowlpox Vaccine Containing an H5 Avian Influenza Hemagglutinin Gene Insert." *Vaccine* 18 (11-12): 1088–95.
- Swayne, D. E., and R. D. Slemons. (1992). "Evaluation of the Kidney as a Potential Site of Avian Influenza Virus Persistence in Chickens." *Avian Diseases* 36 (4): 937–44.
- Swayne, D. E., and D. L. Suarez. (2000). "Highly Pathogenic Avian Influenza." *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 19 (2): 463–82.
- Takekawa, John Y., Scott H. Newman, Xiangming Xiao, Diann J. Prosser, Kyle A. Spragens, Eric C. Palm, Baoping Yan, et al. (2010). "Migration of Waterfowl in the East Asian Flyway and Spatial Relationship to HPAI H5N1 Outbreaks." *Avian Diseases* 54 (1 Suppl): 466–76.
- Tang, Y., C. W. Lee, Y. Zhang, D. A. Senne, R. Dearth, B. Byrum, D. R. Perez, D. L. Suarez, and Y. M. Saif. (2005). "Isolation and Characterization of H3N2 Influenza A Virus from Turkeys." *Avian Diseases* 49 (2): 207–13.
- Thomas, Colleen, and David E. Swayne. (2007). "Thermal Inactivation of H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus in Naturally Infected Chicken Meat." *Journal of Food Protection* 70 (3): 674–80.
- Varghese, J. N., W. G. Laver, and P. M. Colman. (1983). "Structure of the Influenza Virus Glycoprotein Antigen Neuraminidase at 2.9 Å Resolution." *Nature* 303 (5912): 35–40.
- Vincent, A., L. Awada, I. Brown, H. Chen, F. Claes, G. Dauphin, R. Donis, et al. (2014). "Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research." *Zoonoses and Public Health* 61 (1): 4–17.
- Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers, and Y. Kawaoka. (1992). "Evolution and Ecology of Influenza A Viruses." *Microbiological Reviews* 56 (1): 152–79.
- Webster, R. G., V. S. Hinshaw, W. J. Bean, K. L. Van Wyke, J. R. Geraci, D. J. St Aubin, and G. Petursson. (1981). "Characterization of an Influenza A Virus from Seals." *Virology* 113 (2): 712–24.
- Webster, R G, M Yakhno, V S Hinshaw, W J Bean, and K G Murti. (1978). "Intestinal Influenza: Replication and Characterization of Influenza Viruses in Ducks." *Virology* 84 (2): 268–78.
- Westbury, H A, A J Turner, and L Amon. (1981). "Transmissibility of Two Avian Influenza a Viruses (H7 N6) between Chickens." *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A* 10 (4): 481–87.
- Westbury, H.A., A.J. Turner, and L. Kovesdy. (1979). "The Pathogenicity of Three Australian Fowl Plague Viruses for Chickens, Turkeys and Ducks." *Veterinary Microbiology* 4 (3): 223–34.
- Whittaker, G., M. Bui, and A. Helenius. (1996). "The Role of Nuclear Import and Export in Influenza Virus Infection." *Trends in Cell Biology* 6 (2): 67–71.

Wood, G. W., J. W. McCauley, J. B. Bashiruddin, and D. J. Alexander. (1993). "Deduced Amino Acid Sequences at the Haemagglutinin Cleavage Site of Avian Influenza A Viruses of H5 and H7 Subtypes." *Archives of Virology* 130 (1-2): 209–17.

Xu, X., Subbarao, N. J. Cox, and Y. Guo. (1999). "Genetic Characterization of the Pathogenic Influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) Virus: Similarity of Its Hemagglutinin Gene to Those of H5N1 Viruses from the 1997 Outbreaks in Hong Kong." *Virology* 261 (1): 15–19.

Ziegler, A. F., S. Davison, H. Acland, and R. J. Eckroade. (1999). "Characteristics of H7N2 (nonpathogenic) Avian Influenza Virus Infections in Commercial Layers, in Pennsylvania, 1997–98." *Avian Diseases* 43 (1): 142–49.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ακριώτης Τ, και Χανδρινός Γ. (2004). *Επανευρέσεις Δακτυλιωμένων Πουλιών (1985-2004)*. Ελληνικό Κέντρο Δακτυλίωσης Πουλιών.

Καζαντζίδης Σ., και Νοΐδου Μ. (2007). "Η Έρευνα Για Τα Υδρόβια Πουλιά Στους Ελληνικούς Υγρότοπους" ΕΘΙΑΓΕ.