



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

'ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ'
με κατεύθυνση:

«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»



ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**"Εργαστηριακή διερεύνηση του Ιού του Δυτικού Νείλου σε
πτηνά της περιοχής της Θεσσαλίας".**

**Ιακωβάκης Χρήστος του Αχιλλέα
Πτυχιούχος Κτηνιατρικής Παν/μίου Θεσσαλίας**

Λάρισα, Ιούλιος 2012

Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

- Χ. Μπιλλίνης (Επιβλέπων), Αναπληρωτής Καθηγητής Ιολογίας-Ιογενών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστημίο Θεσσαλίας
- Α. Γκόβαρης Αναπληρωτής Καθηγητής (Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης), Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Δ. Τόντης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής των ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστημίο Θεσσαλίας

Περίληψη

Με στόχο την ανίχνευση πιθανής μόλυνσης με τον ιό του Δυτικού Νείλου άγριων πτηνών από την περιοχή της Θεσσαλίας και την μοριακή ανάλυση στελεχών του ιού από θετικά δείγματα, ένας συνολικός αριθμός 65 πτηνών, τα οποία βρέθηκαν νεκρά ή κυνηγήθηκαν, συλλέχθηκαν κατά το διάστημα των κυνηγετικών περιόδων (από 20 Αυγούστου έως 28 Φεβρουαρίου του επόμενου έτους) 2009/10, 2010/11 και 2011/12 και από τους τέσσερις Νομούς της Θεσσαλίας. Για τους σκοπούς της μελέτης δόθηκε έμφαση κυρίως σε κορακοειδή, τα οποία αποτελούν ενδημικά πτηνά της Ελληνικής επικράτειας, παράλληλα όμως, συλλέχθηκαν και κάποια είδη μεταναστευτικών πτηνών.

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ολικού RNA από ομογενοποιημένα επιλεγμένων ιστών (ήπαρ, νεφροί, καρδιά, σπλήνας, εγκέφαλος) βάρους 140μg. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR) για κάθε δείγμα, με στόχο τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος του γονιδιώματος των φλαβοϊών, στους οποίους ανήκει και ο ΙΔΝ, μεγέθους 1084 ζευγών βάσεων, το οποίο είναι μέρος του γονιδίου που κωδικοποιεί τη μη δομική πρωτεΐνη NS5 και παράλληλα είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των ιών αυτής της οικογενείας. Στόχος ήταν ο εντοπισμός, σε πρώτη φάση, του συμπληρωματικού DNA του συγκεκριμένου τμήματος RNA και η ακόλουθη ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων αυτού. Στη συνέχεια η απομονωθείσα αλληλουχία θα συγκρίνονταν με άλλες καταχωρημένες στη βάση δεδομένων Genbank, κάνοντας χρήση του Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Η σύγκριση αυτή θα καθιστούσε δυνατή την ταυτοποίηση του ιού και σε περίπτωση ταύτισης του με τον Ιό του Δυτικού Νείλου, την αναγνώριση της πιθανής εξελικτικής ομάδας στην οποία ανήκει.

Σε κανένα από τα 65 δείγματα που εξετάστηκαν με τη μέθοδο RT-PCR δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του επιλεγμένου τμήματος του γονιδιώματος των Φλαβοϊών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι τα εξετασθέντα πτηνά τα οποία συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θεσσαλίας κατά τις κυνηγετικές περιόδους 2009/10, 2010/11 και 2011/12, δεν είχαν ενεργή μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου και κατά την περίοδο τουλάχιστον της δειγματοληψίας τους δεν ήταν ικανά για τη μετάδοση και διασπορά του ιού.

Η μέθοδος RT-PCR, σε συνδυασμό με την ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων (sequencing), αποτελεί ένα πολύ σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο που μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την επιδημιολογία του ΙΔΝ. Λόγω όμως της ταχείας κάθαρσης του ιού από τον οργανισμό των πτηνών, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνη της ως μέθοδος screening.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....σελ.Ι
Κατάσταση Πινάκων Διπλωματικής Εργασίας.....σελ.ΙΙ
Κατάσταση Διαγραμμάτων Διπλωματικής Εργασίαςσελ.ΙΙΙ
Ιός του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ).....σελ. 1
 Ιστορική αναδρομή-γενικά στοιχεία.....σελ. 1
 Ταξινόμηση του ιού.....σελ. 2
 Το γονιδίωμα και οι πρωτεΐνες του ιού.....σελ. 3
 Δομή και μορφολογία του ιού.....σελ. 4
 Γενετική ποικιλομορφία του ιού.....σελ. 7
 Πολλαπλασιασμός-αντιτύπωση του ιού.....σελ.10
Μετάδοση και διασπορά του ιού.....σελ.13
 Κύκλος μετάδοσης του ιού.....σελ.13
 Τα κουνούπια που εμπλέκονται στη μετάδοση του ιού.....σελ.16
 Ο ρόλος των κουνουπιών στη διαχείμαση του ιού.....σελ.19
 Τρόποι μετάδοσης του ιού στον άνθρωπο.....σελ.20
Προσβολή από τον ιό του Δυτικού Νείλου.....σελ.21
 Κλινικές εκδηλώσεις στον άνθρωπο.....σελ.21
 Ο ιός του Δυτικού Νείλου στα πτηνά και τα άλογα.....σελ.22
Πρόληψη και έλεγχος.....σελ.24

Θεραπεία και εμβόλια.....σελ.24	σελ.24
Μέτρα ελέγχου.....σελ.24	σελ.24
Επιδημιολογία του ιού.....σελ.25	σελ.25
Παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα.....σελ.25	σελ.25
Οι πρόσφατες (2010-2011) εξάρσεις του ΙΑΝ στην Ελλάδα.....σελ.31	σελ.31
Εργαστηριακή διάγνωση.....σελ.36	σελ.36
Ορολογικές δοκιμές.....σελ.36	σελ.36
Δοκιμή εξουδετέρωσης της κυτταροπαθογόνου δράσης σε μικροπλάκα (Plaque reduction neutralisation-PRN).....σελ.36	σελ.36
Ταυτοποίηση του ιού.....σελ.37	σελ.37
Καλλιέργεια.....σελ.37	σελ.37
Ανοσολογικές μέθοδοι.....σελ.38	σελ.38
Μοριακές μέθοδοι.....σελ.38	σελ.38
Μέθοδος RT-PCR.....σελ.39	σελ.39
Το πρώτο βήμα της RT-PCR (Αντίστροφη μεταγραφή του Ριβοζονουκλεϊκούξέος)σελ.39	σελ.39
Το δεύτερο βήμα της RT-PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράση.....σελ.40	σελ.40
Επιλογή του DNA στόχου.....σελ.40	σελ.40
Μίγμα αντίδρασης της PCR.....σελ.41	σελ.41
Διαδικασία της PCR.....σελ.42	σελ.42
Εμφάνιση και αποτύπωση του τελικού προϊόντος πολλαπλασιασμού.....σελ.44	σελ.44

Πειραματικό μέρος.....σελ.46	σελ.46
Υλικά και μέθοδοι.....σελ.46	σελ.46
Χρονική περίοδος και περιοχή δειγματοληψίας.....σελ.46	σελ.46
Γεωγραφικές πληροφορίες και κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής δειγματοληψίας.....σελ.47	σελ.47
Κλίμα.....σελ.47	σελ.47
Ποταμοί.....σελ.48	σελ.48
Λίμνες.....σελ.49	σελ.49
Βιότοποι-Υγρότοποι.....σελ.49	σελ.49
Είδη πτηνών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.....σελ.50	σελ.50
Επιλογή του κλινικού δείγματος για την απομόνωση του ΙΔΝ.....σελ.52	σελ.52
Επεξεργασία και χειρισμός του κλινικού δείγματος.....σελ.52	σελ.52
RT-PCR σε ένα βήμα (One step RT-PCR)σελ.53	σελ.53
Επιλογή του RNA στόχου.....σελ.53	σελ.53
Απομόνωση ολικού RNA.....σελ.54	σελ.54
Εφαρμογή της μεθόδου αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε ένα βήμα.....σελ.55	σελ.55
Αποτελέσματασελ.57	σελ.57
Συμπεράσματα-συζήτηση.....σελ.58	σελ.58
Βιβλιογραφία.....σελ.62	σελ.62

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε, ένα μέρος αυτής, στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Ινστιτούτου Βιοϊατρικής Έρευνας και Τεχνολογίας και περατώθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το πειραματικό μέρος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έγιναν υπό την επίβλεψη του κ. Χαράλαμπου Μπιλλίνη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιολογίας-Ιογενών Νοσημάτων του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η συμβολή του οποίου υπήρξε καθοριστική για την εκπόνηση αυτής και τον ευχαριστώ θερμά για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγησή του και τις υποδείξεις και διορθώσεις του σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γιαννακόπουλο Αλέξιο, Τεχνολόγο Δασοπονίας-Δασολόγο, για τη συμβολή του τόσο στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης όσο και στην συλλογή των δειγμάτων. Επίσης για την συλλογή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπίρτσα Περικλή, Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας Άγριας Πανίδας του Τμήματος Δασοπονίας & Διαχείρισης Φυσικού Περιβάλλοντος του ΤΕΙ Λάρισας καθώς και τον κ. Νταλαμπίρα Ζήση, Τεχνολόγο Ζωικής Παραγωγής. Για την παροχή του θετικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας στην παρούσα εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Βαλιάκο Γεώργιο, Κτηνίατρο και υποψήφιο διδάκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Παπανικολάου Βασίλειο, Μοριακό Βιολόγο και μεταδιδακτορικό ερευνητή του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Ινστιτούτου Βιοϊατρικής Έρευνας και Τεχνολογίας για την βοήθειά του και την άριστη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια τέλεσης του πειραματικού μέρους της διπλωματικής εργασίας.

Κατάσταση Πινάκων Διπλωματικής Εργασίας

Πίνακας 1. Επιδημίες και αναφορές του ιού του Δυτικού Νείλου στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις όμορες χώρες.....σελ.29

Πίνακας 2 : Ορισμός κρούσματος ασθενούς με λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου.....σελ.32

Πίνακας 3: Περιοχές δειγματοληψίας και είδη πτηνών.....σελ.51

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της RT-PCR.σελ.54

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση της RT-PCR.....σελ.56

Πίνακας 6: Αποτελέσματα εξέτασης των δειγμάτων με τη μέθοδο RT-PCR....σελ.58

Κατάσταση Διαγραμάτων Διπλωματικής Εργασίας

Διάγραμμα 1: Αριθμός κρουσμάτων ασθενών με εργαστηριακή διάγνωση λοίμωξης από τον ΙΔΝ κατά την επιδημία του 2010 και 2011 στην Ελλάδα.....σελ.35

Ιός του Δυτικού Νείλου (ΙΔΝ)

Ιστορική αναδρομή-γενικά στοιχεία

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (ή West Nile Virus, WNV) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1937, από το αίμα γυναίκας με εμπύρετο συνδρομή σε μια περιοχή της Ουγκάντας δυτικά του Νείλου, από όπου πήρε και το όνομά του (Smithburn et al., 1940). Η μελέτη όμως, των φυλογενετικών εξελικτικών ομάδων του ιού σε συνδυασμό με ιστορικά γεγονότα, έχει φέρει στο φώς στοιχεία τα οποία υποδεικνύουν ότι είναι πιθανό ο ιός να έχει εμφανιστεί ως ξεχωριστή οντότητα εδώ και χίλια περίπου χρόνια και μάλιστα έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι μπορεί να αποτέλεσε το αίτιο θανάτου του Μεγάλου Αλεξάνδρου (Galli et al., 2004). Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι προκαλούσε μια ήσσονος σημασίας ίωση, πλέον συνιστά μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας. Μετά την πρώτη ανίχνευση του ιού στην Αφρική έχει απομονωθεί από κλινικά δείγματα από την Ευρώπη (Hubalek and Halouzka, 1999), την Ασία (Zeller and Schuffenecker, 2004) και την Αυστραλία (MacKenzie et al., 1994). Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 η επίπτωση της νευρικής μορφής της νόσου, που ο ιός προκαλεί, έχει αυξηθεί και η γεωγραφική εξάπλωση του ιού έχει επεκταθεί περαιτέρω με επιδημίες στην Ευρώπη (Murgue et al., 2002) και την εισαγωγή του στην Αμερικανική ήπειρο (Lanciotti et al., 1999; Hayes and Gubler, 2006). Είναι ζωνοσογόνος παράγοντας, ανήκει στους αρμποϊούς (ομάδα ιών που μεταδίδεται με αρθρόποδα) και έχει ταξινομηθεί στο γένος *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*. Ορολογικά κατατάσσεται στο αντιγονικό σύμπλεγμα της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας (*Japanese Encephalitis*) το οποίο περιλαμβάνει στενά σχετιζόμενους ιούς, υπεύθυνους για σοβαρές εγκεφαλίτιδες στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα το παραπάνω σύμπλεγμα απαρτίζεται από τον ιό Japanese Encephalitis από την Ασία, τον ιό Murray Valley Encephalitis από την Αυστραλία και τον ιό Saint-Louis Encephalitis που είναι ενδημικός στην Αμερική. Το παραπάνω σύμπλεγμα περιλαμβάνει ακόμη τον ιό Caciracore από την Βραζιλία, τον ιό Alfuy από την Αυστραλία και τους ιούς Koutango, Yaounde και Usutu από την Αφρική (Calisher et al., 1989; Murphy et al.,

1995; Heinz et al., 2000). Επίσης ο ιός Kunjin, ο οποίος είναι ενδημικός στην Αυστραλία και την Μαλαισία θεωρείται υπότυπος του WNV (Hall et al., 2001).

Ταξινόμηση του ιού

Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι μέλος της οικογένειας *Flaviviridae* και ανήκει στο γένος *Flavivirus*. Τα μέλη του γένους των Φλαβοϊών σχετίζονται με τα μέλη των άλλων δύο γενών (*Pestivirus* και *Hepacivirus*) της οικογένειας *Flaviviridae* (Heinz et al., 2000). Αν και όλοι οι ιοί της οικογένειας *Flaviviridae* έχουν παρόμοια γονιδιακή οργάνωση και παράγουν μια μοναδική πολυπρωτεΐνη, διαφέρουν ωστόσο στα *cis*-δρώντα στοιχεία τα οποία ρυθμίζουν την αντιγραφή και μεταγραφή του ιικού RNA. Επιπροσθέτως τα γονιδιώματα των μελών του γένους *Flavivirus* στα 3' και 5' άκρα τους περιέχουν αλληλουχίες κυκλοποίησης, οι οποίες δεν απαντώνται στα γονιδιώματα των μελών των άλλων δύο γενών της οικογένειας. Τα 73 μέλη του γένους των Φλαβοϊών υποδιαιρούνται σε 12 αντιγονικές ορολογικές ομάδες (Poidinger et al., 1996). Ο ιός του ΔΝ είναι μέλος της ορολογικής ομάδας της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας. Ο ιός Kunjin, ο οποίος είναι ενδημικός στην Αυστραλία και στην Ασία, θεωρείται πλέον υπότυπος του ΙΔΝ (Scherret et al., 2001). Αν και όλα τα στελέχη του ΙΔΝ που έχουν απομονωθεί αποτελούν συνολικά έναν ανεξάρτητο ορότυπο, έχουν ομαδοποιηθεί περαιτέρω σε οκτώ εξελικτικές ομάδες στη βάση των υποκαταστάσεων και ελλείψεων των αμινοξέων υπογραφής της αλληλουχίας της πρωτεΐνης του φακέλου του ιού (Berthet et al., 1997). Από τις ομάδες αυτές δυο θεωρούνται οι βασικές εξελικτικές ομάδες του ιού, η ομάδα 1 (Lineage 1) και η ομάδα 2 (Lineage 2), οι οποίες παρουσιάζουν νουκλεοτιδική διαφορά σε ποσοστό μέχρι 30%. Η ομάδα 1, περιλαμβάνει στελέχη από την Αφρική, περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου, την Ανατολική Ευρώπη, τις Ινδίες και την Αμερική, ενώ η ομάδα 2, περιλαμβάνει στελέχη που ενδημούν στην υπο-Σαχάρια Αφρική και τη Μαδαγασκάρη (Murgue et al., 2002; Berthet et al., 1997; Lanciotti et al., 2000; Scherret et al., 2002; Lanciotti et al., 2002). Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι τα στελέχη της ομάδας 1 ήταν πιο παθογόνα από τα στελέχη της ομάδας 2, η φυλογενετική ανάλυση και δεδομένα από μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι υψηλής

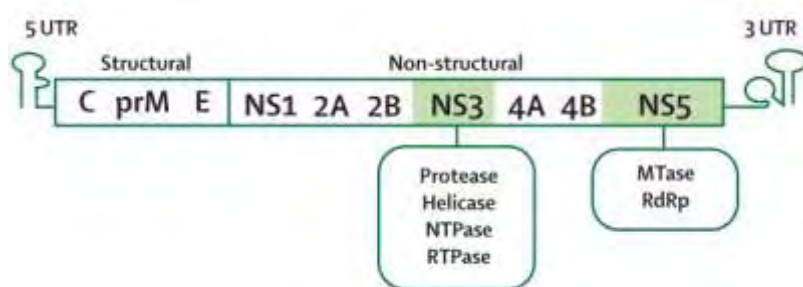
παθογονικότητας στελέχη υπάρχουν και στις δύο ομάδες, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τις πρόσφατες επιδημίες του ιού στην Ελλάδα (2010-2011) αλλά και από προηγούμενες στην Ρωσία (2007) και την Νότια Αφρική (2007-2008) (Venter et al., 2009).

Το γονιδίωμα και οι πρωτεΐνες του ιού

Ο ΙΔΝ είναι μονόκλωνος, θετικής πολικότητας RNA ιός 11.000 περίπου νουκλεοτιδίων (Lanciotti et al., 1999). Το γονιδίωμα του λειτουργεί ως το μοναδικό ιικό mRNA και αποτελεί το εκμαγείο για τη σύνθεση του αρνητικού συμπληρωματικού RNA κλώνου. Το άκρο 3' του γονιδιώματος καταλήγει με ένα συντηρημένο δινουκλεοτίδιο CU_{OH} (Rice et al., 1985; Brinton et al., 1986). Οι Φλαβοϊοί είναι οι μόνοι γνωστοί θετικής πολικότητας RNA ιοί θηλαστικών, οι οποίοι δεν έχουν πολυαδενυλιωμένη ουρά-περιοχή (poly(A) tract) στο 3' άκρο τους. Μια κυπελοειδής δομή τύπου 1 (m⁷GpppAmp) είναι προσαρτημένη στο άκρο 5' του γονιδιώματος, στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων (Cleaves and Dublin, 1979). Η 5' μη κωδικοποιημένη περιοχή (Noncoding region ή NCR) του γονιδιώματος του ιού έχει μήκος 96 νουκλεοτιδίων, ενώ το μήκος της 3' μη κωδικοποιημένης περιοχής κυμαίνεται από 337 έως 649 νουκλεοτίδια. Η ευμετάβλητη 3' NCR, βρίσκεται στο 3' κωδικόνιο τερματισμού της κωδικοποιημένης περιοχής (Shurtleff et al., 2001).

Στο γονιδίωμα των περισσότερων στελεχών του ιού που έχουν απομονωθεί υπάρχει ένα και μοναδικό ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο (Open Reading Frame-ORF) μεγέθους 10.301 νουκλεοτιδίων, που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη η οποία αναλύεται, κατά τη διάρκεια της μετάφρασής της αλλά και μετά από αυτή, από το ιικό σύμπλεγμα των πρωτεασών της σερίνης (NS2b-NS3) και ποικίλων άλλων κυτταρικών πρωτεασών σε 10 ώριμες ικές πρωτεΐνες (Εικ.1) (Nowak et al., 1989; Lindenbach et al., 2007) από τις οποίες οι 3 είναι δομικές, και οι 7 μη δομικές (Deubel et al., 2001). Οι τρεις δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι η πρωτεΐνη του καψιδίου (C), η πρωτεΐνη της μεμβράνης (prM/M) και η πρωτεΐνη του φακέλου (E), κωδικοποιούνται μέσα στο τμήμα 5' του γενωμικού ανοικτού αναγνωστικού

πλασίου, ενώ οι επτά μη δομικές πρωτεΐνες (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5) κωδικοποιούνται μέσα στο τμήμα 3' (Rice et al., 1985). Από τις δομικές πρωτεΐνες οι E (53 kDa) και M (8 kDa) είναι υπεύθυνες για πολλές από τις ιδιότητες του ιού, όπως η επιλογή ξενιστή, ο ιστικός τροπισμός, ο πολλαπλασιασμός και η ενεργοποίηση της B- και T-κυτταρικής ανοσιακής απάντησης. Η πρωτεΐνη η οποία είναι η κύρια υπεύθυνη για την πυροδότηση της ανοσολογικής αντίδραση του οργανισμού έναντι του ιού είναι η E. Αποτελεί την αιμογλουτινίνη του ιού και προκαλεί την παραγωγή του κύριου όγκου των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (Neutralizing Antibodies ή Nabs) κατά τη διάρκεια της λοίμωξης (Campbell et al., 2002; Sanchez et al., 2005). Από τις μη δομικές πρωτεΐνες ανοσογόνο δράση έχουν οι NS1 και NS3 (Lobigs et al., 1994; Lee et al., 1995; Matveeva et al., 1995).

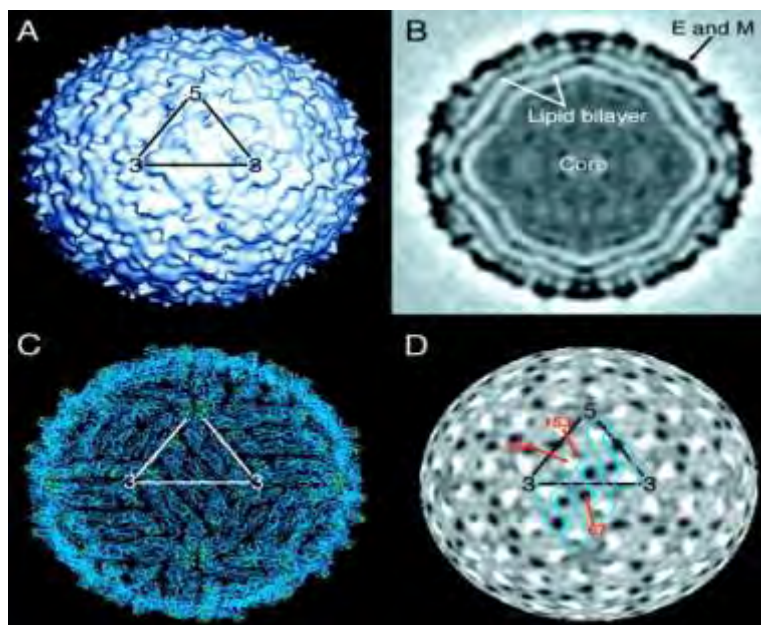


Εικόνα 1. Το γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου πάνω στο οποίο είναι αποτυπωμένες οι δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται καθώς και οι τερματικές δομές του.

Δομή και μορφολογία του ιού

Η σύνθεση του ιϊκού σωματιδίου συνίσταται από τις τρεις δομικές πρωτεΐνες, το RNA γονιδίωμα του ιού και τη διστρωματική λιπιδική μεμβράνη που προέρχεται από τον ξενιστή. Το ιικό σωματίδιο του ιού είναι μικρό, διαμέτρου περίπου 50nm, σφαιρικό και περιβάλλεται από φάκελο, ενώ η πυκνότητα κατακρήμνισης του είναι περίπου $1,2 \text{ g/cm}^{-3}$. Στα ανώριμα ιϊκά σωματίδια οι prM και E πρωτεΐνες υφίστανται ως τριμερή ετεροδιμερών τα οποία σχηματίζουν ακίδες (Εικ 2. Mukhopadhyay et al., 2003). Σ' αυτή τη διαμόρφωση, κατά την διάρκεια της εξόδου του ιϊκού σωματιδίου

με τη διαδικασία της εξωκύττωσης, το συντετηγμένο πεπτίδιο της πρωτεΐνης E καλύπτεται από το pr τμήμα της prM πρωτεΐνης και με αυτό τον τρόπο προστατεύεται από την πρόωρη σύντηξη με τις κυτταρικές μεμβράνες στα ήπιας οξύτητας τμήματα της εκκριτικής οδού του κυττάρου (Heinz et al., 1994; Zhang et al., 2003b). Μετά τον διαχωρισμό του τμήματος pr από την prM πρωτεΐνη, με τη βοήθεια μιας κυτταρικής furin-like πρωτεάσης του δικτύου *trans*-Golgi, τα ώριμα ιικά σωματίδια προσλαμβάνουν μια εικοσαεδρική συμμετρία, καθώς τα 60 τριμερή της πρωτεΐνης E υφίστανται δομική αλλαγή, περιστροφή και αναδιάταξη προκειμένου να σχηματίσουν 90 αντιπαράλληλα διμερή (Stadler et al., 1997; Kuhn et al., 2002; Mukhopahyay et al., 2003; Zhang et al., 2007). Τα διμερή της πρωτεΐνης E, της επιφάνειας του ώριμου ιικού σωματιδίου, εμφανίζουν σχετικά επίπεδη διάταξη έναντι της διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης του φακέλου. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης M παραμένει ένθετο στο φάκελο του ώριμου ιικού σωματιδίου και εμπεριέχει ένα βραχύ εξωκυτταρικό τμήμα και δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Murray et al., 1993). Η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού τη prM πρωτεΐνης ποικίλει και μερικές prM πρωτεΐνες απαντώνται ακέραιες στα ιικά σωματίδια των περισσότερων πληθυσμών του ιού (Heinz et al., 1994).



Εικόνα 2. Η δομή του βιρίου του ΙΔΝ όπως έχει αποδοθεί με τη χρήση του κρυοηλεκτρονικού μικροσκοπίου (cryo-EM). **(Α)** Μια οπτική της επιφάνειας του ιού με μια ασύμμετρη μονάδα του εικοσαέδρου όπως φαίνεται από το τρίγωνο. Η πενταπλοί και τριπλοί άξονες εικοσαεδρικής συμμετρίας είναι επισημασμένοι. **(Β)** Μία κεντρική εγκάρσια τομή η οποία δείχνει τις ομόκεντρες στοιβάδες της πυκνότητας. **(C)** Η διάταξη της πρωτεΐνης E του ΙΔΝ μέσω της ομόλογης μοντελοποίησης (ο Ca-σκελετός αποτυπώνεται με μπλέ χρώμα). Τα κατάλοιπα 307 και 330, τα οποία συνδέονται με εξουδετερωτικά μονοκλωνικά αντισώματα, αποτυπώνονται με πράσινο χρώμα. Το κατάλοιπο Asn¹⁵⁴, το οποίο είναι γλυκοσυλιωμένο, αποτυπώνεται με ροζ χρώμα. **(D)** Αποτύπωση των διαφορετικών πυκνοτήτων μεταξύ του dengue virus και του ΙΔΝ. Η θετική πυκνότητα (από τον dengue virus) αποτυπώνεται με μαύρο χρώμα και η αρνητική πυκνότητα (από τον ΙΔΝ) αποτυπώνεται με λευκό χρώμα. Με τις μπλέ γραμμές επισημαίνονται τα περιγράμματα τριών ομοδιμερών της πρωτεΐνης E.

Το τμήμα pr της πρωτεΐνης prM του ΙΔΝ, εμπεριέχει μια θέση N-γλυκοζυλίωσης στο κατάλοιπο 15. Οι πρωτεΐνες E των περισσότερων στελεχών του ιού του ΔΝ είναι γλυκοζυλιωμένες σε μια μοναδική θέση N-γλυκοζυλίωσης (κατάλοιπο 154). Σε άλλα στελέχη του ιού, λόγω μιας μετάλλαξης σ' αυτή τη θέση, η πρωτεΐνη E δεν είναι γλυκοζυλιωμένη (Adams et al., 1995; Berthet et al., 1997). Η γλυκοζυλίωση αμφοτέρων των πρωτεϊνών prM και E επηρεάζει τη μολυσματικότητα και την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων, τα αποτελέσματα όμως ποικίλουν με βάση το στέλεχος του ιού και τον τύπο του κυττάρου του ξενιστή (Hanna et al., 2005). Οι E και prM είναι τύπου I δομικές πρωτεΐνες της μεμβράνης με άγκυρες καρβοξυλικού άκρου. Τα υπολείμματα της κυστεΐνης στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης E, είναι ιδιαίτερα συντηρημένα και διαμορφώνουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (Nowak and Wengler, 1987). Η πρωτεΐνη E συντίθεται από τρεις τομείς οι οποίοι συνδέονται με ευκάμπτους δεσμούς. Ο τομέας III σχηματίζει μια πτυχή τύπου ανοσοσφαιρινών και έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι αλληλεπιδρά με παράγοντες της επιφάνειας του κυττάρου και διευκολύνει την είσοδο του ιού σ' αυτό. Ο τομέας II είναι δακτυλοειδής και περιέχει 13 συντηρημένα, υδρόφοβα κατάλοιπα του εσωτερικού βρόχου σύνδεσης. Ο τομέας I είναι μια δομή β-βαρελιού (β-barrel) η οποία συνδέει τους τομείς II και III (Mukhopadhyay et al., 2005).

Το καψίδιο του ιικού σωματιδίου με διάμετρο περίπου 30nm, αποτελείται αποκλειστικά από την πρωτεΐνη C, ενώ δεν έχει προκύψει κάποια συγκεκριμένη συμμετρία με τη διαδικασία της αναδόμησης και απεικόνισης με τη χρήση του κρυοηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Zhang et al., 2003a). Η πρόδρομος μορφή της πρωτεΐνης C, περιέχει μια υδρόφοβη περιοχή στο καρβοξυλικό άκρο, η οποία είναι η

αλληλουχία σηματοδότησης για την μετάθεση της πρωτεΐνης prM στην πολυπρωτεΐνη διαμέσου ενδοπλασματικού δικτυωτού. Η ώριμη C πρωτεΐνη είναι αποτέλεσμα του διαχωρισμού της άγκυρας του καρβοξυλικού άκρου από την ιϊκή πρωτεάση. Η δομή των C διμερών, όπως αποκαλύπτεται με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance-NMR) και της κρυσταλλογραφίας, συνίσταται από μονομερή τα οποία περιέχουν τέσσερις α-έλικες (Jones et al., 2003; Dokland et al., 2004; Ma et al., 2004). Οι περιοχές πρόσδεσης του RNA βρίσκονται στο καρβοξυλικό και στο αμινοτελικό άκρο και διαχωρίζονται από μια υδρόφοβη περιοχή. Το διμερές της πρωτεΐνης C, το οποίο θεωρείται ότι είναι το βασικό στοιχείο συγκρότησης των πυρηνικών καψιδίων, έχει πολύ υψηλό καθαρό θετικό ηλεκτρικό φορτίο, με τα μισά βασικά κατάλοιπα τοποθετημένα στη μια πλευρά και την συντηρημένη υδρόφοβη περιοχή να σχηματίζουν μια απολική επιφάνεια στην αντίθετη πλευρά του διμερούς (Ma et al., 2004). Είναι πιθανό ότι η φορτισμένη επιφάνεια του διμερούς της C πρωτεΐνης συνδέεται με το γενωμικό RNA χωρίς σαφή τρόπο, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιστόνων και του κυτταρικού DNA, ενώ η υδρόφοβη επιφάνεια του συνδέεται με την εσωτερική πλευρά της λιπιδικής μεμβράνης του ιού (Dokland et al., 2004; Ma et al., 2004).

Γενετική ποικιλομορφία του ιού

Οι Φλαβοϊοί απαντώνται σε όλες τις ηπείρους εκτός από την Ανταρκτική (Gould et al., 2003), αλλά κανείς δεν παρουσιάζει τόσο ευρεία εξάπλωση παγκοσμίως όσο ο ιός του ΔN. Μετά την πρώτη του ανίχνευση στην Αφρική έχει απομονωθεί από κλινικά δείγματα από την Ευρώπη (Hubalek and Halouzka, 1999), την Ασία (Zeller and Schuffenecker, 2004) και την Αυστραλία (MacKenzie et al., 1994). Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 η επίπτωση της νευρικής μορφής της νόσου, που ο ιός προκαλεί, έχει αυξηθεί και η γεωγραφική εξάπλωση του ιού έχει επεκταθεί περαιτέρω με επιδημίες στην Ευρώπη (Murgue et al., 2002) και την εισαγωγή του στην Αμερικανική ήπειρο (Lanciotti et al., 1999; Hayes and Gubler, 2006). Καθώς ο ιός εξαπλώνεται τόσο αυξάνεται το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη μελέτη της

γενετικής και αντιγονικής ποικιλομορφίας του, προκειμένου να γίνει κατανοητή η σχέση μεταξύ της γεωγραφικής κατανομής των στελεχών του ιού του Δυτικού Νείλου και των διαφορών τους καθώς και να καθοριστούν τα πρότυπα και οι επιδράσεις της εξέλιξης του ιού σε τοπική και παγκόσμια κλίμακα.

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη της γενετικής και αντιγονικής ποικιλομορφίας του ΙΔΝ σε παγκόσμια κλίμακα είναι εκτεταμένη. Πριν την απόκτηση εκτενών γενετικών δεδομένων για τα μέλη της ορολογικής ομάδας της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, μελέτες διασταυρούμενης εξουδετέρωσης έδειξαν στενή αντιγονική συσχέτιση μεταξύ του ιού του ΔΝ, του ιού Kunjin (KUNV) και του ιού Kountago (KOUV) (Calisher et al., 1989; DeMadrid and Porterfield, 1974). Ο ιός του ΔΝ χωρίστηκε σε τρεις μεγάλες, γεωγραφικά προσδιοριζόμενες (Αφρική, Ινδίες και Ευρώπη και Μέση Ανατολή) ομάδες, με τη χρήση πολυκλωνικών ορών και μονοκλωνικών αντισωμάτων (Blackburn et al., 1987; Hammam et al., 1965). Η φυλογενετική ανάλυση που βασίστηκε σε μια νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος 1000 περίπου ζευγών βάσεων του άκρου 3' της NS5 αλληλουχίας, πολλών από αυτούς τους ιούς, επιβεβαίωσε τα προηγούμενα ευρήματα και οι γονότυποι που προέκυψαν συμφωνούσαν με τον καθορισμό των αντιγονικών ομάδων, όπως είχαν περιγραφεί παλαιότερα (Kuno et al., 1998). Στα πλαίσια μιας μελέτης, η οποία πραγματοποιήθηκε σύντομα μετά την εισαγωγή του ΙΔΝ στην Αμερική, αναλύθηκε ολόκληρο το γένωμα αρκετών στελεχών του ιού συμπεριλαμβανομένου και πρότυπων στελεχών (Lanciotti et al., 2002). Ως αποτέλεσμα αυτής της μελέτης, προτάθηκαν δύο βασικές εξελικτικές ομάδες του ιού. Η ομάδα 1 περιλαμβάνει τρεις υποομάδες, βάση των περιοχών που απομονώθηκαν τα αντίστοιχα στελέχη: (α) την υποομάδα της Αφρικής, Μέσης Ανατολής, Ευρώπης και Αμερικής (β) την υποομάδα της Αυστραλίας, γνωστή και ως KUNV και (γ) την υποομάδα στελεχών τα οποία απομονώθηκαν στην Ινδία. Η εξελικτική ομάδα 2 περιορίζεται κυρίως στην υπο-Σαχάρια Αφρική και μπορεί περιστασιακά να προκαλέσει επιδημίες εγκεφαλίτιδας (Petersen and Roehrig, 2001). Υπάρχει τουλάχιστον μια αναφορά στελεχών και από τις δυο εξελικτικές ομάδες, που απομονώθηκαν από την ίδια περιοχή, όπως για παράδειγμα στην Ουγγαρία το 2003-2004. Στην περίπτωση της Ουγγαρίας το 2003, ένας ιός της ομάδας 1 σχετίστηκε με την πρόκληση εγκεφαλίτιδας σε χήνες (Glavits et al., 2005) και ήπιας εγκεφαλίτιδας και μηνιγγίτιδας σε ανθρώπους (Ferenczi et al.,

2005), ενώ το επόμενο έτος ένας ιός της ομάδας 2 απομονώθηκε από ένα γεράκι (*Accipiter gentilis*) με εγκεφαλίτιδα, στην ίδια περιοχή (Bakonyi et al., 2006).

Ο ΚΟΥV δεν έχει συμπεριληφθεί σε πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες, αλλά η σχέση του με τις δυο βασικές εξελικτικές ομάδες έχει αντιγονικά αποδειχθεί (Varelas-Wesley and Calisher, 1982; Calisher et al., 1989). Ο Charrel και οι συνεργάτες του (Charrel et al., 2003) αναθεώρησαν τη φυλογενετική ταξινόμηση των στελεχών του ΙΔΝ του Παλαιού Κόσμου, συμπεριλαμβάνοντας αλληλουχίες του ΚΟΥV και απέδειξαν ότι αποτελεί μακρινό στέλεχος του ΙΔΝ, σε συμφωνία με παλαιότερες αντιγονικές μελέτες. Τα δεδομένα που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη δεν συνέτειναν στην ενσωμάτωση του ΚΟΥV σε μια από τις δύο βασικές εξελικτικές ομάδες του ΙΔΝ, αλλά μαζί με άλλα δεδομένα από γενετικές και αντιγονικές μελέτες πρότειναν ότι ο συγκεκριμένος ιός αποτελεί από μόνος του τόσο μια διαφορετική ομάδα όσο και διαφορετικό αντιγονικό υπότυπο. Σε δημοσιεύσεις που ακολούθησαν, προτάθηκαν επιπλέον εξελικτικές ομάδες του ιού του Δυτικού Νείλου, όπως η ομάδα 3 ή ιός του Rabensburg (Bakonyi et al., 2005), επίσης ένα Ρωσικό στέλεχος το οποίο έχει καταχωρηθεί ως εξελικτική ομάδα 4 (Lvov et al., 2004) και μια σειρά Ινδικών στελεχών τα οποία αποτελούν την ομάδα 5 (Bondre et al., 2007). Το στέλεχος Sarawak Kunjin, το οποίο παρουσιάζει αξιοσημείωτες διαφορές με τους άλλους ιούς Kunjin, έχει προταθεί ως ομάδα 6. Επιπλέον, μια έβδομη ομάδα έχει προταθεί για τον ιό African Kountango, ο οποίος σχετίζεται στενά με το ΙΔΝ (Mackenzie et al., 2009) και τέλος μια όγδοη ομάδα έχει προταθεί στη βάση αλληλουχιών που απομονώθηκαν από κουνούπια *Cx. ripiens* στη βόρεια Ισπανία το καλοκαίρι του 2006 (Vazquez et al., 2010). Αν και οι προτάσεις που έχουν διατυπωθεί για τις επιπλέον εξελικτικές ομάδες του ΙΔΝ υποστηρίζονται επαρκώς από τα υπάρχοντα δεδομένα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, εξακολουθεί να υπάρχει σύγχυση όσον αφορά την αρχική κατάταξη αυτών των ομάδων ως νέα είδη ιών ή υποτύπων του ΙΔΝ. Πολλοί συγγραφείς έχουν προτείνει κριτήρια βασισμένα στην απόσταση των νουκλεοτιδίων. Για παράδειγμα ο Kuno και οι συνεργάτες του (Kuno et al., 1998) πρότειναν ότι η ταύτιση ανά ζεύγος αλληλουχιών μεγαλύτερη του 84%, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, θεωρείται το ποσοτικό κριτήριο για την κατάταξη ενός ιού σε ένα είδος, ενώ ο Charrel και οι συνεργάτες του πρότειναν αντίστοιχα μια τιμή μεγαλύτερη από 79% (Charrel et al., 2003). Με την εφαρμογή είτε του ενός είτε του άλλου από τα

παραπάνω κριτήρια, ο ΚΟΥΒ (ταύτιση ~76%) και ο ιός Rabensburg (ταύτιση 77%) δεν θα μπορούσαν να ταξινομηθούν ως στελέχη του ιού του Δυτικού Νείλου.

Πολλαπλασιασμός-αντιτύπωση του ιού

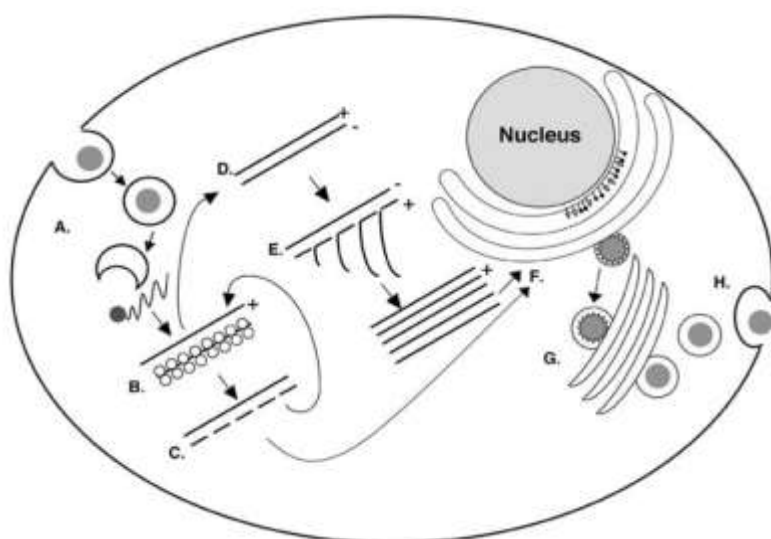
Ο ιός του ΔΝ μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε διάφορους τύπους κυτταροκαλλιιεργειών μιας μεγάλης ποικιλίας ειδών πτηνών, θηλαστικών, αμφίβιων και εντόμων. Κυτταροπαθολόγο αποτέλεσμα όμως, δεν παρατηρείται σε όλες τις κυτταροκαλλιιεργειες, παρ' όλο που η αντιτύπωση του ιού είναι επαρκής (Brinton, 1986).

Μετά την προσκόλληση στον υποδοχέα, ο ιός εισέρχεται στα κύτταρα, τόσο των θηλαστικών όσο και των εντόμων, με ενδοκύττωση μέσα σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη (Chu and Ng, 2004; Chu et al., 2006). Το όξινο περιβάλλον του ενδοσώματος ενεργοποιεί το μη αναστρέψιμο σχηματισμό τριμερών της πρωτεΐνης E. Αυτό οδηγεί στη σύντηξη της ιϊκής μεμβράνης με τη μεμβράνη του ενδοσωματικού κυστιδίου και στην απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 3Α; Allison et al., 1995; Heinz and Allison, 2000). Το γενωμικό RNA απελευθερώνεται στη συνέχεια από το καψίδιο, με έναν άγνωστο μηχανισμό και μεταγράφεται (Εικ.3Β). Η πολυπρωτεΐνη διασπάται, κατά τη διάρκεια της μετάφρασής της και μετά από αυτή, σε πολλαπλές θέσεις προκειμένου να προκύψουν οι ώριμες ιϊκές πρωτεΐνες (Εικ.3C). Η μεταγραφή των κυττάρων του ξενιστή, δεν διακόπτεται σε περίπτωση μόλυνσής τους από Φλαβοϊούς. Αποτελέσματα πειραμάτων διαφορικής φυγοκέντρωσης (Grun and Brinton, 1987; Chu and Westaway, 1992) και αποικισμού (Westaway et al., 1999; Mackenzie et al., 2007), υποδηλώνουν ότι τα αντιγραφικά συμπλέγματα του RNA των Φλαβοϊών, σχετίζονται με τις περιπυρηνικές μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτυωτού. Η RNA εξαρτώμενη ιϊκή RNA πολυμεράση (RdRp), NS5, αντιγράφει συμπληρωματικούς, αρνητικής πολικότητας (-) κλώνους από το θετικής πολικότητας (+) εκμαγείο του γενωμικού RNA (Εικ. 3D). Αυτοί οι (-) RNA κλώνοι λειτουργούν ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέου γενωμικού RNA (Εικ. 3E). Ο αρνητικής πολικότητας RNA κλώνος, συντίθεται καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου αντιγραφής του ιού, αλλά η σύνθεση του

ϊκού RNA είναι ασύμμετρη, καθώς η σύνθεση του γενωμικού RNA είναι περισσότερο από δέκα φορές πιο αποτελεσματική, από ότι η σύνθεση του (-) RNA κλώνου (Cleaves et al., 1981). Μόλις εδραιωθεί, η σύνθεση του ιϊκού RNA μπορεί να συνεχίζεται ακόμη και εν τη απουσία πρωτεϊνικής σύνθεσης, υποδηλώνοντας έτσι ότι δεν απαιτούνται πρόδρομες ιϊκές πολυπρωτεΐνες (Cleaves et al., 1981; Chu and Westaway, 1987). Δεδομένα τα οποία προέκυψαν από ένα αντίτυπο του ιού Kunjin, έδειξαν ότι η μετάφραση αποτελεί προϋπόθεση της αντιγραφής του γενωμικού RNA (Khromykh et al., 1999) και ότι η αντιγραφή του RNA αποτελεί προϋπόθεση της εγκαψιδίωσης (Khromykh et al., 2001). Ωστόσο, η μετάφραση θα πρέπει να υπερτερεί της αντιγραφής του RNA έτσι ώστε να παράγονται νεοσυντιθέμενα ιϊκά σωματίδια, τα οποία να περιέχουν 180 αντίγραφα κάθε δομικής πρωτεΐνης και ένα γένωμα.

Η διαδικασία συγκρότησης των ιϊκών σωματιδίων είναι άμεσα συνδεδεμένη με τις μεμβράνες του αδρού ενδοπλασματικού δικτυωτού (Εικ. 3F). Αν και ο φάκελος του ιού προέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη, λίγα είναι γνωστά γι' αυτή τη διαδικασία γιατί τα ενδιάμεσα προϊόντα της εκβλάστησης και τα ελεύθερα νουκλεοκαψίδια του κυτταροπλάσματος σπάνια έχουν παρατηρηθεί σε κύτταρα μολυσμένα με Φλαβοϊούς. Επίσης παρά το γεγονός της επιτυχούς συγκρότησης, στο εργαστήριο, σωματιδίων παρόμοιων με νουκλεοκαψίδια, από διμερή της πρωτεΐνης C και RNA ή DNA (Kiermayr et al., 2001), η συγκρότηση ιϊκών σωματιδίων στα κύτταρα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα συντονισμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ διμερών της πρωτεΐνης C και γενωμικού RNA καθώς και μεταξύ των πρώτων και των ετεροδιμερών των πρωτεϊνών E και prM, παρά ως αποτέλεσμα εκβλάστησης προσχηματισμένων νουκλεοκαψιδίων. Η δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης E, η οποία είναι η σηματοδοτική αλληλουχία για τη μετάθεση της πρωτεΐνης NS1 στην πολυπρωτεΐνη, προσφάτως αναφέρθηκε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην συγκρότηση των ιϊκών σωματιδίων (Orlinger et al., 2006). Τα ενδοκυτταρικά ανώριμα ιϊκά σωματίδια τα οποία περιέχουν ετεροδιμερή των πρωτεϊνών E και prM συσσωρεύονται σε κυστίδια και στη συνέχεια μεταφέρονται δια μέσου της εκκριτικής οδού του κυττάρου του ξενιστή, όπου τροποποιούνται οι γλυκάνες των πρωτεϊνών E και prM (Εικ. 3G). Έχει αναφερθεί ότι η δράση της c-Yes κινάσης της οικογένειας Src είναι απαραίτητη για την μεταφορά των συγκροτημένων

ανώριμων ιικών σωματιδίων, από το ενδοπλασματικό δικτυωτό μέσα στην εκκριτική οδό των μολυσμένων, με τον ΙΔΝ, κυττάρων (Hirsch et al., 2005). Το αμινοτελικό άκρο της prM πρωτεΐνης, των ανώριμων ιικών σωματιδίων, διαχωρίζεται μέσα στο δίκτυο *trans*-Golgi, από μια κυτταρική furin-like πρωτεάση (Stadler et al., 1997) και στη συνέχεια τα βίρια μεταφέρονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσα σε κυστίδια και απελευθερώνονται με εξωκύτωση (Εικ. 3H; Mason, 1989). Η διαδικασία της εξωκύτωσης ώριμων ιικών σωματιδίων, από τα μολυσμένα κύτταρα, αρχίζει δέκα έως δώδεκα ώρες μετά την μόλυνση και η μέγιστη εξωκυτταρική ιϊκή συγκέντρωση παρατηρείται συνήθως μετά τις εικοσιτέσσερις ώρες.



Εικόνα 3. Ο κύκλος αντιγραφής του ΙΔΝ. (Α) Προσκόλληση του ιικού σωματιδίου στο κύτταρο και είσοδος με ενδοκύτωση ακολουθούμενη από σύντηξη της μεμβράνης του ιού με τη μεμβράνη του ενδοκυτταρικού κυστιδίου και απελευθέρωση του νουκλεοκαπιδίου και του γενωμικού RNA. (Β) Μετέφραση του γενωμικού RNA. (C). Συν- και μετά-μεταγραφική πρωτεολυτική διαδικασία της πολυπρωτεΐνης. (D) Σύνθεση του (-) RNA κλώνου από το (+) γενωμικό RNA. (E) Παραγωγή νεοσυντιθέμενου (+) RNA από τον (-) RNA κλώνο. (F) Σύνδεση των δομικών ιικών πρωτεϊνών με τις μεμβράνες των κυτταροπλασματικών κυστιδίων, εγκαπιδίωση του γενώματος του νεοσυντιθέμενου RNA και συγκρότηση ανώριμων ιικών σωματιδίων. (G) Μεταφορά των ανώριμων ιικών σωματιδίων δια μέσου της εκκριτικής οδού στην επιφάνειά του κυττάρου. (H) Απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιικών σωματιδίων με σύντηξη της πλασματικής μεμβράνης με τις μεμβράνες των κυτταροπλασματικών κυστιδίων.

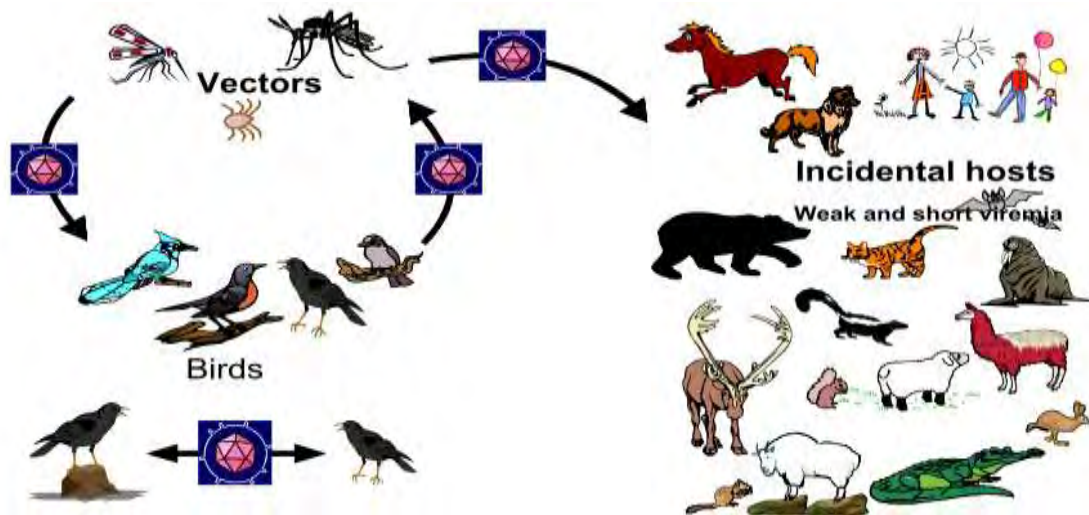
Μετάδοση και διασπορά του ιού

Κύκλος μετάδοσης του ιού

Ο ιός του Δυτικού Νείλου διατηρείται στη φύση με δυο ξεχωριστούς επιδημιολογικούς κύκλους (Hubalek and Halouzka, 1999; Higgs et al., 2004). Σε πρώτη φάση, κατά τον ενζωοτικό ή φυσικό κύκλο, ένα ορنيθοφιλικό κουνούπι, ικανό για τη μετάδοση του ιού, μολύνεται νύσσοντας ένα μολυσμένο αποδημητικό πτηνό (Rappole et al., 2000) και στη συνέχεια μετά από μερικές ημέρες μπορεί να μολύνει άλλα πτηνά, αποδημητικά και ενδημικά, λειτουργώντας παράλληλα και ως φορέας του ιού. Ορنيθοφιλικά είδη κουνουπιών είναι τα είδη *Culex univittatus*, *Cx. tarsalis*, *Cx. ripiens*. Ο ενζωοτικός κύκλος λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένο περιβάλλον όπως, υγρά τοπία, δέλτα ποταμών και γενικότερα βιοτόπους τους οποίους επιλέγουν τα μεταναστευτικά πτηνά για ανάπαυση και τροφή, ερχόμενα έτσι σε επαφή με ορنيθοφιλικά κουνούπια τα οποία μπορούν να τους μεταδώσουν τον ιό. Σε δεύτερη φάση, κατά τον επίζωοτικό ή αστικό κύκλο, ένα δεύτερο κουνούπι μολύνεται νύσσοντας ένα ενδημικό ή αποδημητικό πτηνό και μέσα σε λίγες ημέρες μπορεί να μολύνει ανθρώπους, άλογα και άλλα θηλαστικά (Campbell et al., 2002) (Εικ. 4). Οι κύριοι φορείς μετάδοσης του ιού στους ανθρώπους θεωρούνται τα κουνούπια του είδους *Culex ripiens* (Fonseca et al., 2004). Αυτός ο κύκλος λαμβάνει χώρα σε αστικές ή αγροτικές περιοχές όπου οι ανθρώπινες δραστηριότητες ευνοούν την ανάπτυξη εστιών συγκέντρωσης και αναπαραγωγής κουνουπιών ικανών προς μετάδοση του ιού σε ανθρώπους. Τα πτηνά, τα οποία θεωρούνται ο κύριος ξενιστής του ιού στη φύση, αποτελούν μαζί με τα κουνούπια των παραπάνω ειδών τους δυο βασικούς παράγοντες ολοκλήρωσης του κύκλου μετάδοσης του ιού (Hayes et al., 1989; Rappole et al., 2000; Zeller et al., 1999). Επίσης έχει επιβεβαιωθεί εργαστηριακά η μετάδοση του ιού από κρότωνα σε πτηνά και άλλα θηλαστικά (Lawrie et al., 2004).

Ένα θηλυκό κουνούπι υπολογίζεται ότι σε κάθε γεύμα απομυζά περίπου 0.5-1 μl αίματος από τον ξενιστή. Βάσει του παραπάνω δεδομένου για να είναι ένας ξενιστής μολυσματικός, κάτι το οποίο εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως το είδος και

ο πληθυσμός των κουνουπιών, πρέπει να έχει ένα ελάχιστο τίτλο ιαιμίας 1000-2000 IU/ml, το οποίο συνήθως υπολογίζεται ότι είναι $10^{5.5}$ - 10^7 μονάδες σχηματισμού πλάκων (Plaque Forming Units-PFU) ml^{-1} (Bowen and Nemeth, 2007; Reisen et al., 2005). Για παράδειγμα, για να καταστούν μολυσματικά τα κουνούπια του είδους *Cx. pipiens pipiens*, τα οποία θεωρούνται λιγότερο αποτελεσματικοί φορείς, πρέπει το πτηνό-ξενιστής να έχει αναπτύξει υψηλότερους τίτλους ιαιμίας (Reisen and Brault, 2007). Ο ιός, όπως υποδηλώνει η ανίχνευση των ειδικών έναντι αυτού αντισωμάτων, μπορεί επίσης να μολύνει ένα μεγάλο αριθμό σπονδυλωτών και μη ζώων, όπως θηλαστικά, αμφίβια και ερπετά, τα οποία όμως δεν αναπτύσσουν ιαιμία ικανή για να μεταδώσουν τον ιό σε άλλα κουνούπια (Miller et al., 2003; Hublek and Halouzka, 1999; Hublek., 2000; Lichtensteiger et al., 2003). Παρόλα, αυτά πειραματικά δεδομένα έχουν αποδείξει ότι κάποια είδη ζώων όπως τα τρωκτικά, τα κουνέλια και οι σκίουροι, αναπτύσσουν ιαιμία ικανή να μολύνει κουνούπια (Bowen and Nemeth, 2007). Επίσης, αλιγάτορες μολυσμένοι με τον ιό μπορούν να αναπτύξουν παρατεταμένη ιαιμία, ικανή για την μόλυνση κουνουπιών με αποτέλεσμα να μπορούν κατ' αυτό τον τρόπο να διαδραματίσουν ένα ρόλο διατήρησης της μετάδοσης του ιού στη φύση (Klenk et al., 2004). Τα άλογα και οι άνθρωποι είναι ευαίσθητοι στη λοίμωξη από τον ιό, καθώς μπορεί να εμφανίσουν νόσο με συμμετοχή του ΚΝΣ, η οποία μπορεί να αποβεί θανατηφόρος. Όμως, όπως τα περισσότερα θηλαστικά, η ιαιμία που αναπτύσσουν δεν είναι αρκετή για τη μετάδοση του ιού σε άλλα κουνούπια, έτσι δεν μπορούν να συνεισφέρουν στον κύκλο μετάδοσης.



Εικόνα 4: Κύκλος μετάδοσης του Ιού του Δυτικού Νείλου

Το θηλυκό κουνούπι είναι αυτό το οποίο μολύνεται καθώς αναζητά αίμα για να τραφεί προκειμένου να αναπτυχθούν τα αυγά του. Μετά τον εντοπισμό του κατάλληλου ξενιστή, το κουνούπι διερευνά με τα στοματικά του μόρια το δέρμα του ξενιστή μέχρι να εντοπίσει κάποιο αγγείο από το οποίο θα μπορέσει να μυζήσει αίμα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το κουνούπι εναποθέτει σίελο, ο οποίος περιέχει διάφορες βιοενεργές ουσίες προκειμένου να διευκολύνει στη συνέχεια την απομύζηση του αίματος. Τέτοιες ουσίες όπως αγγειοδιασταλτικά, αναστολείς πήξης του αίματος και αναλγητικές ουσίες μπορούν να καταστήσουν πιο αποτελεσματική τη μόλυνση του ξενιστή με τον ιό (Ribeiro et al., 2004; Ribeiro and Francischetti, 2003; Titus et al., 2006). Ο ιός στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται στον εντερικό σωλήνα και τους σιελογόνους αδένες του θηλυκού κουνουπιού και ακολούθως μπορεί να μεταδοθεί διαδοχικά σε πολλά άλλα πτηνά και θηλαστικά, με το σίελο μέσω των νυγμάτων, καθώς η μόλυνση που αναπτύσσουν τα κουνούπια είναι επίμονη και διαρκεί καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Τα πολλαπλά γεύματα αίματος συνεισφέρουν στην αυξημένη μετάδοση του ιού όχι μόνο λόγω της διαδοχικής μόλυνσης πολλών ξενιστών, αλλά και μέσω της ενίσχυσης της γονιμότητας και της αύξησης της διάρκειας ζωής των κουνουπιών (Kramer and Ebel, 2003).

Ο ιός έχει απομονωθεί από περίπου 60 είδη κουνουπιών, όμως λιγότερα από 10 ανήκουν στους κύριους διαβιβαστές του (Hayes et al., 2005b). Οι ορνιθοφιλικόι

φορείς οι οποίοι νύσσουν και μολύνουν και θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου ονομάζονται φορείς γέφυρες και είναι οι κύριοι υπεύθυνοι της μετάδοσης του ιού από τα πτηνά στους ανθρώπους. Τα πτηνά μετά την περίοδο ιαιμίας, η οποία διαρκεί περίπου 3-6 ημέρες, αναπτύσσουν ισόβια ανοσία έναντι του ιού. Τουλάχιστον 198 είδη άγριων αποδημητικών πτηνών εμπλέκονται στον ιικό κύκλο, με καθένα από αυτά να παρουσιάζει το δικό του ρόλο στον πολλαπλασιασμό του ιού, αλλά και το δικό του βαθμό ευαισθησίας στη μόλυνση (Komar et al., 2003). Στην Ευρώπη η θνητότητα των πτηνών από τον ΙΔΝ είναι πολύ μικρή, αντίθετα με ότι συμβαίνει από το 1998 στο Ισραήλ, αλλά και στη Βόρεια Αμερική, που είναι ιδιαίτερα υψηλή (Hubalek et al., 1999 ;Malkinson et al., 2002; Banet-Noach et al., 2003; Steele et al., 2000).

Ένας άλλος τρόπος μετάδοσης του ιού, ο οποίος έχει αποδειχθεί πειραματικά σε πτηνά και θηλαστικά, είναι δια μέσου της στοματικής οδού (Austgen et al., 2004; Sbrana et al., 2005; Komar et al., 2003). Επίσης, ο ιός έχει ανιχνευθεί σε κόπρανα πτηνών ακόμα και 10 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους, ενώ κοράκια τα οποία μολύνθηκαν πειραματικά με τον ΙΔΝ, βρέθηκε ότι αποβάλλουν μεγάλες ποσότητες του ιού δια μέσου της αμάρας τους. Μάλιστα, πρόσφατες αναφορές σποραδικών θανάτων κορακιών στην Καλιφόρνια και την Νέα Υόρκη κατά τη διάρκεια του Χειμώνα, όπου η δραστηριότητα των ενήλικων κουνουπιών είναι μειωμένη ή δεν υφίσταται, έχει ερμηνευτεί ως ένδειξη οριζόντιας μετάδοσης μεταξύ των πτηνών αυτού του είδους (Reisen et al., 2006; Dawson et al., 2007). Τέλος μεγάλης σημασίας για την επιδημιολογία του ιού αποτελεί η εργαστηριακή επιβεβαίωση της κάθετης μετάδοσης του ιού στα κουνούπια (Baqar et al., 1993; Dohm et al., 2002).

Τα κουνούπια που εμπλέκονται στη μετάδοση του ιού

Ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει ανιχνευθεί σε περισσότερα από 60 είδη κουνουπιών στις ΗΠΑ (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/mosquitoSpecies.htm>), όμως, η απομόνωση του ιού ή η ανίχνευση του γενώματός του σε ένα κουνούπι δεν σημαίνει απαραίτητα ότι αυτό αποτελεί φορέα ικανό για τη μετάδοση του. Παράλληλα, η ικανότητα μετάδοσης του ιού έχει ερευνηθεί, σε συνθήκες εργαστηρίου, σε διάφορα

είδη κουνουπιών (Goddard et al., 2002; Sardelis et al., 2001; Turell et al., 2005). Αλλά ακόμη και αν απομονωθεί ο ιός από ένα είδος κουνουπιού και αποδειχθεί εργαστηριακά ότι μπορεί να τον μεταδώσει, παράγοντες όπως, η προτίμηση ξενιστή και η πυκνότητα των κουνουπιών στο περιβάλλον του ξενιστή, είναι καθοριστικοί της σπουδαιότητας του συγκεκριμένου είδους ως φορέα του ιού (Turell et al., 2005). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι πληθυσμοί κουνουπιών του ίδιου είδους αλλά με διαφορετική γεωγραφική εντόπιση, μπορεί να διαφέρουν ως προς την ικανότητα μετάδοσης Φλαβοϊών (Bennett et al., 2002; Reisen et al., 2005; Vaidyanathan and Scott, 2007).

Ο Turell και οι συνεργάτες του (2005) έδειξαν ότι διάφορα κουνούπια του είδους *Culex*, τα οποία προτιμούν να τρέφονται από πουλιά είναι ικανοί φορείς του ΙΔΝ. Έτσι, είδη κουνουπιών όπως τα, *Cx. stigmatosoma*, *nigripalpus*, *ripiciens*, *quincefasciatus*, *restuans* και *tarsalis*, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και στον πολλαπλασιασμό του ιού κατά τη διάρκεια του ενζωτικού κύκλου μετάδοσης. Παράλληλα, παρατήρησαν ότι τα κουνούπια των ειδών *Oclerotatus canadensis* και *O. cantator* και *Aedes vexans* λειτουργούν πιθανότατα ως φορείς γέφυρες του ιού. Η έναρξη επιδημιών του ιού του ΔΝ σε ανθρώπους προϋποθέτει την διάχυση (spillover) από τον κύκλο μετάδοσης του ιού μεταξύ πτηνών και κουνουπιών με κατάλληλους φορείς διαβιβαστές «γέφυρες», οι οποίοι τρέφονται τόσο από πτηνά όσο και από θηλαστικά. Αυτή ακριβώς η διατροφική συμπεριφορά των κουνουπιών του είδους *Ae. Albopictus*, στη Βόρειο Αμερική τα καθιστά ικανά να λειτουργήσουν ως φορείς διαβιβαστές του ιού στους ανθρώπους (Turell et al., 2005). Μάλιστα, τα αποτελέσματα μιας μελέτης αξιολόγησης του κινδύνου μόλυνσης των ανθρώπων, στην ίδια περιοχή, έδειξαν ότι τα κουνούπια των ειδών *Cx. ripiciens* και *restuans* ίσως είναι οι σημαντικότεροι φορείς διαβιβαστές του ιού.

Στη βόρεια Ευρώπη έχουν απομονωθεί γενετικά δύο είδη *Cx. ripiciens*, το *Cx. p. ripiciens*, το οποίο τρέφεται κυρίως από πτηνά και το *Cx. p. molestus*, το οποίο τρέφεται κυρίως από θηλαστικά. Τα δυο αυτά είδη κουνουπιών θεωρούνται σημαντικοί φορείς του ιού στην Ευρώπη. Το 2004 ο Fonseca και οι συνεργάτες του μετά από ανάλυση μικροδορυφορικών δεικτών που πραγματοποίησαν σε περισσότερα από 600 κουνούπια του είδους *Cx. ripiciens*, τα οποία συλλεχτήκαν από

πληθυσμούς με παγκόσμια κατανομή, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα είδη *Cx. p. ripiens* και *Cx. p. molestus* εισήχθησαν ξεχωριστά στις ΗΠΑ και ότι η μικτή διατροφική συμπεριφορά (απομύζηση αίματος τόσο από πτηνά όσο και από θηλαστικά) του *Cx. ripiens*, της βόρειας Αμερικής, είναι αποτέλεσμα του υβριδισμού των δύο παραπάνω ειδών μετά την εισαγωγή τους στο Δυτικό Ημισφαίριο. Επιπλέον πρότειναν ότι στο παραπάνω γεγονός οφείλεται μερικώς, η εκρηκτική και παρατεταμένη επιδημία που έλαβε χώρα στις ΗΠΑ το 1999, συγκρινόμενη με τα πιο περιορισμένα ξεσπάσματα του ιού στην Ευρώπη.

Στην Ελλάδα μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περίπου 60 είδη κουνουπιών τα οποία ανήκουν σε οκτώ διαφορετικά γένη. Στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας, όπου εξελίχθηκε η επιδημία από τον ΙΔΝ το καλοκαίρι του 2010, βρίσκονται διάφορα είδη κουνουπιών *Culex* spp., με κυριότερα το *Cx. ripiens* και το *Cx. modestus* (με πολυπληθέστερο το πρώτο), καθώς και τα *Aedes caspius*, *Anopheles hyrcanus*, *Coquillettidia richiardii* κ.α. (Εικ.5). Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από την Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, η κατανομή των κρουσμάτων σε σχέση με την οικολογία των κουνουπιών και τα αποτελέσματα των συλλήψεων τους σε ειδικές παγίδες αλλά και η διαδικασία του 'human landing collection' ενοχοποίησαν το *Cx. ripiens* ως τον κύριο διαβιβαστή του ιού στην περιοχή. Παράλληλα, το στέλεχος του ιού του ΔΝ που ενοχοποιήθηκε για την επιδημία του 2010 και άνηκε στην εξελικτική ομάδα 2 του ιού, απομονώθηκε από κουνούπια του είδους *Culex ripiens* (Papa et al., 2011).

Προνύμφες



Ακμαία



Aedes: ορυζώνες, φυσικά συστήματα



Anopheles: ορυζώνες, φυσικά συστήματα



Culex: αστικό σύστημα

Εικόνα 5. Τα κυρίαρχα γένη κουνουπιών στην Ελλάδα και οι κύριες θέσεις αναπαραγωγής τους.

Ο ρόλος των κουνουπιών στη διαχείμαση του ιού

Η επιδημία του ιού του Δυτικού Νείλου στη Βόρεια Αμερική το 1999 έλαβε χώρα σε μια εύκρατη περιοχή, όπου τα κουνούπια του είδους *Culex* spp. εισέρχονται σε μια λανθάνουσα κατάσταση γνωστή ως διάπαυση, ανταποκρινόμενα στη μείωση της φωτοπερίοδου και της θερμοκρασίας καθώς πλησιάζει ο Χειμώνας (Eldridge, 2004). Βάσει αυτού του δεδομένου υπήρχε η ελπίδα ότι ο ιός δεν θα επιβίωνε κατά τη διάρκεια του Χειμώνα. Τα περισσότερα κουνούπια του είδους *Culex* spp. ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα που λαμβάνουν, κατά τη διάρκεια του προνυμφικού και νυμφικού τους σταδίου, από τη διακύμανση της φωτοπερίοδου και εισέρχονται στην κατάσταση της διάπαυσης λίγο μετά την ενηλικίωσή τους. Η ανάπτυξη των αυγών των θηλυκών κουνουπιών παύει και σε περίπτωση που έχει ληφθεί ένα γεύμα αίματος πριν τη διάπαυση, τότε αυτό χρησιμοποιείται για την αποθήκευση λίπους και όχι για τα αυγά τους (Eldridge, 2004). Έτσι, τα θηλυκά κουνούπια τα οποία έλαβαν ένα γεύμα αίματος από μολυσμένο ξενιστή, πριν τη διάπαυση ή μολύνθηκαν κάθετα,

θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως φορείς διαχείμασης του ΙΔΝ κατά τη διάρκεια της διάπauσής τους, εάν επιζήσουν (Goddard et al., 2003; Miller et al., 2000; Reisen et al., 2002; Turell et al., 2001; Eldridge, 2004). Τα αποτελέσματα μιας έρευνας που πραγματοποιήθηκε σε διαχειμάζοντα κουνούπια που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Νέας Υόρκης τον Ιανουάριο-Φεβρούριο του 2000, έδειξαν ότι υπήρχε η πιθανότητα επιβίωσης του ιού μέχρι την επόμενη Άνοιξη (Nasci et al. 2001), κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε το καλοκαίρι του ίδιου έτους καθώς ο ιός μεταδόθηκε σε μια μεγάλη περιοχή βορειοανατολικά των ΗΠΑ (http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount00_detailed.htm).

Ο Reisen και οι συνεργάτες του (2006) διερεύνησαν τρεις πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους θα μπορούσε ο ιός να επιβιώνει καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, σε εύκρατα κλίματα: (1) συνεχής ενζωοτική μετάδοση του ιού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, (2) κάθετη μετάδοση του ιού σε κουνούπια του είδους *Culex* spp. και (3) χρόνια μόλυνση πτηνών. Μετά από σχετική έρευνα και αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι και οι τρεις μηχανισμοί θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη διατήρηση του ιού κατά τη διάρκεια του έτους.

Τρόποι μετάδοσης του ιού στον άνθρωπο

Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις μόλυνσης ανθρώπων με τον ΙΔΝ είναι αποτέλεσμα νύγματος μολυσμένου κουνουπιού. Μετάδοση όμως, του ιού έχει επίσης περιγραφεί ως αποτέλεσμα μετάγγισης αίματος (Pealer et al., 2003), θηλασμού (Gould and Fikrig, 2004; Harrington et al., 2003; Gould, 2003), μεταμόσχευσης οργάνων (Iwamoto et al., 2003), κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα στο έμβρυο (Alpert et al., 2003), επαγγελματικής έκθεσης σε εργαζόμενους σε μικροβιολογικά εργαστήρια (Campbell and Lanciotti, 2002), εισπνοής του ιού (Nir, 1959) και έκθεσης του επιπεφυκότα (Fonseca et al., 2005). Τέλος έχει αναφερθεί μια περίπτωση μόλυνσης σε κέντρο αιμοκάθαρσης, αλλά χωρίς να έχουν εξακριβωθεί τα ακριβή αίτια (Centers for Disease Control and Prevention, 2004)

Προσβολή από τον ιό του Δυτικού Νείλου

Κλινικές εκδηλώσεις στον άνθρωπο

Μετά την είσοδο στον οργανισμό η αρχική αντιγραφή του ιού γίνεται στα δενδριτικά κύτταρα του Langerhan (Byrne et al., 2001). Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια μεταναστεύουν στο εγγύτερο επιχώριο λεμφογάγγλιο και στη συνέχεια ακολουθεί μια φάση αιμίας που έχει ως αποτέλεσμα τη μόλυνση των περιφερικών οργάνων, όπως ο σπλήνας και οι νεφροί. Ο ιός πολλαπλασιάζεται στο κυτταρόπλασμα και ακολούθως συγκεντρώνεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτυωτού, από όπου στη συνέχεια απελευθερώνεται με εξωκύττωση (Deubel et al., 2001). Μέχρι το τέλος της πρώτης εβδομάδας, ο ιός δεν ανιχνεύεται από το αίμα και τα περιφερικά όργανα. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ο ιός μπορεί να εισέλθει στο κεντρικό νευρικό σύστημα και να πολλαπλασιαστεί στα νευρικά κύτταρα με αποτέλεσμα την πρόκληση λεμφοκυτταρικής περιαγγειακής φλεγμονής στον προμήκη μυελό, στο στελέχος του εγκεφάλου και στο νωτιαίο μυελό (Sampson et al., 2000).

Το 80% περίπου του πληθυσμού των ανθρώπων που μολύνεται με τον ιό δεν παρουσιάζει συμπτώματα ενώ μόνο το 20% εκδηλώνει μια αυτοπεριοριζόμενη νόσο η οποία καλείται πυρετός του ιού του Δυτικού Νείλου (WNF). Λιγότερο από το 1% των ασθενών (περίπου 1/150), εμφανίζουν νόσο του ΚΝΣ, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί με τρεις διαφορετικές νοσολογικές οντότητες: (α) μηνιγγίτιδα (WNM), (β) εγκεφαλίτιδα (WNE) και (γ) οξεία χαλαρή παράλυση (WNP), ενώ περίπου 10% αυτών καταλήγουν (Davis et al., 2006).

Άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών είναι πιο ευαίσθητα να εμφανίζουν νόσο του ΚΝΣ, ενώ η θνητότητα σε άτομα ηλικίας άνω των 70 ετών μπορεί να φτάσει ακόμη και το 25%. Στις ΗΠΑ, η επίπτωση νευρολογικής νόσου αυξάνει περίπου 1,5 φορά για κάθε δέκα έτη ζωής, φτάνοντας ο κίνδυνος για ένα άτομο ηλικίας 80-90 ετών να είναι έως και 30 φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με ένα παιδί ηλικίας κάτω των 10 ετών (O'Leary et al., 2004).

Ο πυρετός του ιού του Δυτικού Νείλου εκδηλώνεται 2 έως 14 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού και τα συχνότερα συμπτώματά του περιλαμβάνουν πυρετό, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα στο στήθος, την πλάτη και τα άνω άκρα, πονοκέφαλο μυϊκή αδυναμία ή μυαλγία, συμπτώματα από το γαστρεντερικό όπως ανορεξία, ναυτία και έμετος και αδυναμία αυτοσυγκέντρωσης (Davis et al., 2006; Debiasi and Tyler, 2006; Hayes et al., 2005a; Hayes and Gubler, 2006; Petersen et al., 2003). Οι περισσότεροι ασθενείς αναρρώνουν μετά από 3 έως 6 ημέρες. Το 30% περίπου των ασθενών που αναπτύσσουν νόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος εκδηλώνουν μηνιγγίτιδα με συμπτωματολογία που περιλαμβάνει πυρετό, ναυτία με ή χωρίς έμετο, ρίγη, αυχενική δυσκαμψία, πονοκέφαλο, φωτοφοβία, αδυναμία συγκέντρωσης, ακόμη και μυοκλωνία. Το υπόλοιπο 70% εκδηλώνει εγκεφαλίτιδα με συμπτώματα όπως πυρετό, αδυναμία, σύγχυση ή μεταβολή της νοητικής κατάστασης, ίλιγγο καθώς και συμπτωματολογία συστηματικής νόσου που περιλαμβάνει αρθραλγία, εξάνθημα και συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα (Davis et al., 2006; Debiasi and Tyler, 2006; Petersen et al., 2003; Huhn et al., 2005; Sejvar et al., 2003; Tyler et al., 2006) ενώ πολλοί από τους ασθενείς παρουσιάζουν επίσης τρομώδης κίνηση, μυοκλωνία και συμπτώματα όπως του Πάρκινσον (Tyler, 2004). Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα ποσοστά, μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι οι σχετική συχνότητα εμφάνισης των παραπάνω εκδηλώσεων από το ΚΝΣ είναι, 55-60% εγκεφαλίτιδα, 35-40% μηνιγγίτιδα και περίπου 5-10% οξεία χαλαρή παράλυση (Sejvar, 2007). Στην Ευρώπη τα τελευταία χρόνια καταγράφεται μια αύξηση του αριθμού και της σοβαρότητας των συμπτωμάτων στους ανθρώπους με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις πρόσφατες επιδημίες του ιού στην Ελλάδα (2010-2011).

Ο ιός του Δυτικού Νείλου στα πτηνά και τα άλογα

Στις ΗΠΑ περισσότερα από 300 είδη πουλιών έχουν εντοπισθεί με λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου, κατά τη διάρκεια επιδημιολογικής επιτήρησης νεκρών πουλιών (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/west-nile/birdspecies.htm>), με το μεγαλύτερο ποσοστό να καταγράφεται ανάμεσα στα κορακοειδή και πιο συγκεκριμένα στα κοράκια και τις μπλε κίτσες. Σημαντικές μειώσεις σε

συγκεκριμένους πληθυσμούς πτηνών στις ΗΠΑ, συμπεριλαμβανομένου των κορακιών έχουν αποδοθεί στον ΙΔΝ (LaDeau et al., 2007). Μελέτες βασιζόμενες στην πειραματική μόλυνση ευαίσθητων ειδών πτηνών με το στέλεχος NY99 του ιού ή άλλα παρόμοια στελέχη, έχουν περιγράψει την ευρύτατη διασπορά του ιού σε πολλά περιφερικά όργανα και στο νευρικό σύστημα, η οποία συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά ιαμίας (Clark et al., 2006; Komar et al., 2003; Nemeth et al., 2006; Weingartl et al., 2004; Wunschmann et al., 2004). Αυτά τα πτηνά μπορούν να εκκρίνουν μεγάλο ιικό φορτίο στα κόπρανά τους, συνεισφέροντας κατ' αυτό τον τρόπο στην άμεση μεταξύ των πτηνών μετάδοση του ιού καθώς και στην περιβαλλοντική του εξάπλωση (Kipp et al., 2006; Komar et al., 2003). Η διάρκεια μόλυνσης και νόσησης είναι γενικά σύντομη, ενώ, όπως έχουν δείξει πειραματικές μελέτες, πολλά ευαίσθητα πτηνά καταλήγουν κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας, συχνά 24-48 ώρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στις ΗΠΑ, η μόλυνση των πτηνών στην Ευρώπη είναι συνήθως ασυμπτωματική, πιθανότατα λόγω της συνύπαρξης του ιού και των ξενιστών του στον Παλαιό Κόσμο.

Στα άλογα, τα οποία ομοίως με τους ανθρώπους αποτελούν ευαίσθητο ξενιστή του ιού, ορολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ασυμπτωματική μόλυνση είναι συχνή (Guthrie et al., 2003; Nielsen et al., 2008), αλλά σε περίπτωση νευρολογικής νόσου το ποσοστό θνητότητας είναι αρκετά υψηλό (30%–40%) (Ward et al., 2006). Τα συμπτώματα σε σοβαρές περιπτώσεις περιλαμβάνουν, αταξία, αδυναμία, κατάκλιση και μυϊκή δεσμίδωση (Ostlund et al., 2001; Dauphin et al., 2004; Durand et al., 2004; Schuler et al., 2004; Ward et al., 2004).

Πρόληψη και έλεγχος

Θεραπεία και εμβόλια

Ειδική θεραπεία για τον άνθρωπο ή τα άλογα δεν υπάρχει. Δεδομένης όμως, της σοβαρότητας της νόσου, φαρμακολογικές στρατηγικές, μπορούν δυνητικά να μετριάσουν τη σφοδρότητα της νόσου (Samuel et al., 2007). Πρόκληση σ' αυτό τον τομέα μπορεί να αποτελέσει η ανάπτυξη θεραπειών οι οποίες θα διαπερνούν επιτυχώς τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και θα στοχεύουν τους νευρώνες.

Για τα άλογα, κυκλοφορούν δυο διαφορετικά εμβόλια ενώ υπό μελέτη βρίσκονται άλλα 10 περίπου. Στους ανθρώπους, αν και διάφοροι τύποι εμβολίων κατά του ΙΔΝ βρίσκονται υπό εξέλιξη, η διάθεση ενός εγκεκριμένου εμβολίου για την αποτελεσματική και ασφαλής προφύλαξη έναντι του ιού δεν αναμένεται σύντομα.

Μέτρα ελέγχου

Η αντιμετώπιση της ασθένειας στους ανθρώπους περιορίζεται στην πρόληψη, η οποία περιλαμβάνει απλά μέτρα αποφυγής των δηγμάτων κουνουπιών και προστασίας από αυτά, ενώ σε μεγαλύτερη κλίμακα αυτή γίνεται με την ορθολογική εντομοκτονία χρησιμοποιώντας ουσίες και μέσα φιλικά προς το περιβάλλον.

Επιδημιολογία του ιού

Παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα

Ο ιός του Δυτικού Νείλου απομονώθηκε για πρώτη φορά από μια εμπύρετο ασθενή, σε μια περιοχή της Ουγκάντας δυτικά του Νείλου, το 1937 (Smithburn et al., 1940). Αρχικά θεωρήθηκε ότι προκαλεί μια ασυμπτωματική, αυτοπεριοριζόμενη νόσο, με τους ενήλικες να παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ανοσίας (Taylor et al., 1956). Έτσι μέχρι την πρώτη μεγάλη επιδημία του ιού το 1996 στην Ρουμανία, δεν θεωρούνταν ιδιαίτερα σημαντική νόσος για τους ανθρώπους και τα άλογα, λόγω της σποραδικής του εμφάνισης (Tsai et al., 1998). Την τελευταία όμως δεκαετία, παρατηρείται μια αύξηση της συχνότητας και της σφοδρότητας της νόσου.

Ο ιός είναι ενδημικός στην Ευρώπη (Hublek and Halouzka, 1999; Krisztalovics et al., 2008), στην Μέση Ανατολή, στην Αφρική (Fagbami., 1978; Dauphin et al., 2004), στην Ασία, στην Αυστραλία (Scherret et al., 2001) και στην Βόρεια Αμερική. Η πρώτη εισαγωγή του ιού στο Δυτικό ημισφαίριο έλαβε χώρα το 1999 στην πόλη της Νέας Υόρκης (Asnis et al., 2001; Briese et al., 1999; Nash et al., 2001) (CDC, 1999), πιθανότατα από μολυσμένα πτηνά ή κουνούπια (Gubler, 2007; Rappole et al., 2000; Rappole and Hubalek, 2003). Στην Ευρώπη, οι επιδημίες είναι διασκορπισμένες σε διάφορες χώρες και χρονικά περιοριζόμενες. Συνήθως εμφανίζονται ξαφνικά, χωρίς κανείς να τις αναμένει, ακόμη και αν υπάρχουν όλες οι συνθήκες εκείνες που ευνοούν την εμφάνισή τους. Εξαίρεση, ίσως, αποτελούν οι πρόσφατες (2010-2011) εξάρσεις του ιού στην Ελλάδα, όπου και ο χρόνος εμφάνισης αλλά πολύ περισσότερο οι κλιματολογικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία) ήταν οι πλέον κατάλληλες για τον πολλαπλασιασμό του ιού και ταυτίζονται απόλυτα με την επιδημιολογία του, δικαιολογώντας έτσι και την έκταση και το μέγεθος της επιδημίας. Στις ΗΠΑ, αντίθετα με την Ευρώπη, από το 1999 που καταγράφηκαν τα πρώτα περιστατικά στη Νέα Υόρκη, ο ΙΔΝ εξαπλώθηκε σε όλη τη χώρα και κάθε χρόνο είναι υπεύθυνος για μεγάλης έκτασης επιδημίες σε ανθρώπους και άλογα (Dauphin et al., 2004; Hubalek and Halouzka, 1999).

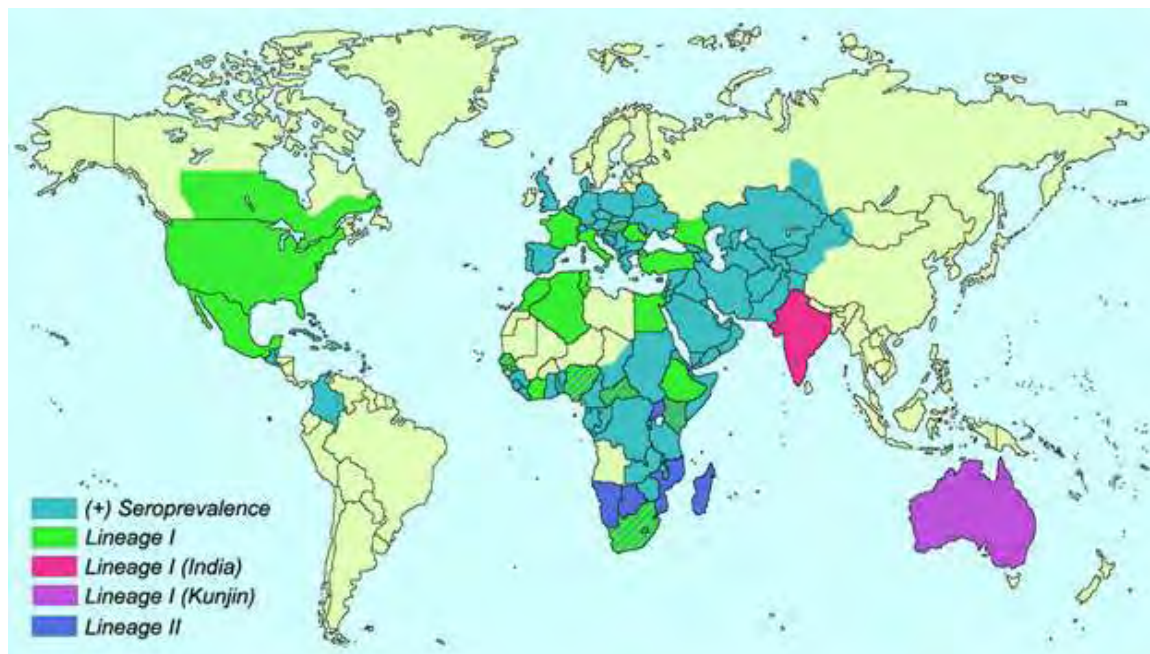
Ο ρόλος των μεταναστευτικών πτηνών στην μετάδοση και εισαγωγή του ιού του Δυτικού Νείλου από χώρες που ο ιός ενδημεί σε μη ενδημικές χώρες έχει καταγραφεί και μελετηθεί τόσο σε επιδημίες του ιού στην Ευρώπη όσο και στο Δυτικό ημισφαίριο. Με βάση αυτή την υπόθεση μπορεί να εξηγηθεί το γεγονός ότι τα ξεσπάσματα του ιού λαμβάνουν χώρα σε υγροτόπους ή κοντά σε αυτούς και σε αστικές περιοχές, όπου συνυπάρχουν πληθυσμοί μεταναστευτικών πτηνών, κουνουπιών και ενδημικών πτηνών. Ομοίως μπορεί να εξηγηθεί και ο χρόνος έναρξης των επιδημιών, αν υποτεθεί ότι ο ιός εισάγεται με τα μεταναστευτικά πτηνά, τον Απρίλιο και το Μάιο, κατά την διάρκεια της μετανάστευσής τους προς το Βορρά, στη συνέχεια ο ιός διασπείρεται και πολλαπλασιάζεται διαμέσου της μόλυνσης των πληθυσμών των ενδημικών πτηνών και ακολούθως εμφανίζεται στους ανθρώπους και τα άλογα σε ένα χρονικό διάστημα από τον Ιούλιο μέχρι τον Σεπτέμβριο (Rappole and Hubalek, 2003).

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στη Βόρεια Αμερική, στην Ευρώπη η μόλυνση των πτηνών με τον ιό είναι συνήθως ασυμπτωματική, πιθανότατα λόγω της συνύπαρξης του ιού και των ξενιστών του στον Παλαιό Κόσμο. Παρά ταύτα, ένα στέλεχος του ιού της εξελικτικής ομάδας 1 πανομοιότυπο με εκείνο που εισήχθη στη Νέα Υόρκη το 1999, οδήγησε σε κλινική νόσο πελαργούς οι οποίοι μολύνθηκαν με αυτό, κατά τη μετανάστευσή τους από την κεντρική Ευρώπη δια μέσου του Ισραήλ το 1998 (Malkinson et al., 2002). Το 2003, ένα στέλεχος του ΙΔΝ παρόμοιο γενετικά με τα στελέχη του Ισραήλ που απομονώθηκε το 1998 και της Νέας Υόρκης το 1999, προκάλεσε μια έξαρση εγκεφαλίτιδας σε χήνες στην Ουγγαρία (*Anser anser domesticus*), οδηγώντας έτσι στην υπόθεση ότι και τα τρία αυτά στελέχη προήλθαν από την κεντρική Ευρώπη (Bakonyi et al., 2006). Το 2004 και 2005, στην ίδια περιοχή της Ουγγαρίας, καταγράφηκαν αρκετοί θάνατοι γερακιών των ειδών *Accipiter gentilis* και *Accipiter nisus*, οι οποίοι αποδόθηκαν σε ένα Αφρικανικό στέλεχος του ΙΔΝ της εξελικτικής ομάδας 2, το οποίο ήταν η πρώτη φορά που απομονώθηκε εκτός της Αφρικανικής Ηπείρου (Erdelyi et al., 2007). Το παραπάνω γεγονός υποδηλώνει μεταφορά στελεχών του ιού, με μεταναστευτικά πτηνά, μεταξύ Ευρώπης και Αφρικής.

Η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του ιού που έχουν απομονωθεί, έχει αναδείξει δύο βασικές γενεαλογικές ομάδες (Berthet et al., 1997). Η ομάδα 1 (Lineage 1), περιλαμβάνει στελέχη που ευθύνονται για την πλειονότητα των εξάρσεων του ιού στην Ευρώπη και την Αμερική, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε άλογα και έχουν επίσης απομονωθεί από, την Ινδία, την βόρεια και κεντρική Αφρική, την Αυστραλία (ιός Kunjin) και το Ισραήλ (Bondre et al., 2007; Morales et al., 2006). Η ομάδα 2 (Lineage 2) περιλαμβάνει στελέχη που είναι ενδημικά στην κεντρική και νότιο Αφρική και τη Μαδαγασκάρη (Berthet et al., 1997; Burt et al., 2002) και μόλις πρόσφατα έχουν βρεθεί εκτός αυτών των περιοχών: το 2004 και 2005 στην Ουγγαρία, το 2007 στην Ρωσία, το 2008 στην Αυστρία, το 2010 στην Ελλάδα και τη Ρουμανία και το 2011 στην Ιταλία (Bagnarelli et al., 2011; Sirbu et al., 2011; Bakonyi et al., 2005; Platonov et al., 2008) (KEELPNO, 2010). Κύριοι υπεύθυνοι για την διασπορά των στελεχών της ομάδας 2 από την Αφρική στις παραπάνω χώρες αλλά και την γενικότερη διασπορά του ιού από ενδημικές σε μη ενδημικές χώρες, θεωρούνται τα μεταναστευτικά πτηνά (Rappole et al., 2000). Τα στελέχη της ομάδας 2, αν και θεωρούνταν λιγότερο λοιμογόνα από αυτά της ομάδας 1 (Beasley et al., 2001), σήμερα θεωρούνται υπέθυνα για την εμφάνιση σοβαρών εγκεφαλίτιδων. Από την άλλη, τα στελέχη της ομάδας 1 έχουν σχετιστεί κυρίως με περιπτώσεις σοβαρών περιστατικών νευρικής νόσου, αλλά πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι στελέχη με φαινότυπο τόσο υψηλής όσο και χαμηλής λοιμογόνου δύναμης, υπάρχουν και στις δύο ομάδες (Beasley et al., 2001; Botha et al., 2008; Wang et al., 1997; Beasley et al., 2002). Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί η ύπαρξη οκτώ γενεαλογικών ομάδων από την κεντρική Ευρώπη, την Ρωσία και τις Ινδίες (Bakonyi et al., 2005; Lvov et al., 2004; Bondre et al., 2007; Kramer et al., 2008).

Από τα μέσα της δεκαετίας του 90', τρεις επιδημιολογικές τάσεις που αφορούν τον ιό του Δυτικού Νείλου έχουν καταγραφεί. Η πρώτη σχετίζεται με αύξηση της συχνότητας των επιδημιών σε άλογα και ανθρώπους, η δεύτερη με αύξηση των περιπτώσεων νόσου στους ανθρώπους με συμμετοχή του ΚΝΣ και η τρίτη με αυξημένα ποσοστά θανάτων σε πτηνά που συμπίπτουν με ξεσπάσματα της νόσου σε ανθρώπους, κυρίως στις ΗΠΑ και στο Ισραήλ (Petersen and Roehrig, 2001). Έως τώρα, μετάδοση του ιού του Δυτικού Νείλου έχει αναφερθεί στην Ευρώπη, την Μέση Ανατολή, την Αφρική, την Ινδία, την Ασία, την Αυστραλία, την Βόρεια και Κεντρική

Αμερική και την Καραϊβική (Εικ. 6) (Dauphin et al., 2004; Zeller and Schuffenecker, 2004).



Εικόνα 6: Χάρτης παγκόσμιας διασποράς του ιού του Δυτικού Νείλου

Τα τελευταία χρόνια, επιδημίες του ιού σε ανθρώπους, στο Ανατολικό ημισφαίριο, έχουν αναφερθεί κυρίως από τη Λεκάνη της Μεσογείου (Πίνακας 1): στην Αλγερία το 1994, στο Μαρόκο το 1996, στην Τυνησία το 1997 και το 2003, στη Ρουμανία από το 1996 μέχρι το 2004 (αδημοσίευτα δεδομένα: Ρουμανικό Εθνικό Ινστιτούτο Δημόσιας Υγείας) και από το 2008 έως το 2011, στην Τσεχία το 1997, στο Ισραήλ από το 1998 έως το 2000, το 2004 και το 2010-2011, στην Ρωσία το 1999, το 2005-2006 και το 2010-2011, στη Νότια Γαλλία το 2000 και το 2003, στην Ουγγαρία από το 2003 έως το 2010, στην Πορτογαλία και στην Ισπανία το 2004 και το 2010 και στην Ιταλία από το 2008 έως και το 2011 (Dauphin et al., 2004; Zeller and Schuffenecker, 2004; Schuffenecker et al., 2005; Bagnarelli et al., 2011; Rossini et al., 2008; Krisztalovics et al., 2008; Sirbu et al., 2011). Επιζωοτίες σε άλογα έχουν αναφερθεί στο Μαρόκο το 1996, το 2003 και το 2010, στην Ιταλία το 1998, το 2008

και το 2009, στο Ισραήλ το 2000 και στη Νότια Γαλλία το 2000, το 2003 το 2004 και το 2006 (Dauphin et al., 2004; Zeller and Schuffenecker, 2004; Schuffenecker et al., 2005; Zeller et al., 2004; Murgue et al., 2001; Barzon et al., 2009; Rizzo et al., 2009). Η πρόσφατη επιδημία του ιού στην Ελλάδα, τον Ιούλιο-Αύγουστο του 2010 (Para et al., 2011), θεωρείται η δεύτερη μεγαλύτερη των τελευταίων 15 ετών στην Ευρώπη, μετά από αυτή της Ρουμανίας το 1996. Κατόπιν αυτής μέχρι τον Οκτώβριο του ίδιου έτους είχαν αναφερθεί διαδοχικά περιστατικά του ιού σε ανθρώπους, σε κάποιες περιπτώσεις θανατηφόρα, από την Ρουμανία, την Ουγγαρία, την Τουρκία, την Ιταλία, την Πορτογαλία, τη Ρωσία και το Ισραήλ (Calistri et al., 2010). Το καλοκαίρι του 2011, συνεχίστηκε η εξάπλωση του ιού σε νοτιότερες περιοχές της Ελλάδας (Danis et al., 2011), ενώ νέα περιστατικά λοίμωξης ανθρώπων από τον ιό αναφέρθηκαν σε χώρες της Ευρωπαϊκής περιοχής του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (κυρίως από τη Ρουμανία, τη Ρωσία, την Αλβανία και το Ισραήλ). Στο Δυτικό ημισφαίριο τα περισσότερα περιστατικά σε ανθρώπους έχουν καταγραφεί και καταγράφονται στις ΗΠΑ από το 1999 και στον Καναδά.

Πίνακας 1. Επιδημίες και αναφορές του ιού του Δυτικού Νείλου στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις όμορες χώρες.

Χώρα	Έτος	Μορφή εμφάνισης κρουσμάτων	Εμπλεκόμενα Είδη/Κλινικά συμπτώματα		
			Ανθρώποι	Ιπποειδή	Πτηνά
Αίγυπτος	1951	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		Ναι
Αλγερία	1994	Επιδημία	Ναι		
Αυστρία	2008	Σποραδική εμφάνιση			Ναι
Ουκρανία	1985	Επιδημία	Ναι		
Τσεχία	1997		Ναι		
Γαλλία	1962-1965	Επιδημία	Ναι	Ναι	
	2000	Επιδημία		Ναι	
	2003-2004-2006	Σποραδική εμφάνιση	Ναι	Ναι	Ναι

Ελλάδα	2010-2011	Επιδημία	Ναι	Ναι	
Τουρκία	2010-2011	Επιδημία	Ναι		
Αλβανία	2011	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		
Βουλγαρία	2010	Επιδημία		Ναι	
Ουγγαρία	2004	Σποραδική εμφάνιση			Ναι
	2003-2010	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		
Ισραήλ	1951-1952	Επιδημία	Ναι		
	1997-2001	Επιδημία	Ναι	Ναι	Ναι
	2004	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		
	2010-2011	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		
Ιταλία	1998	Επιδημία		Ναι	
	2008-2011	Επιδημία	Ναι	Ναι	Ναι
Μαρόκο	1996	Σποραδική εμφάνιση/ Επιδημία	Ναι	Ναι	
	2003, 2010	Επιδημία		Ναι	
Πορτογαλία	1968	Επιδημία		Ναι	
	2004	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		
	2010	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		
Ρουμανία	από το 1996-	Επιδημία/ Σποραδική εμφάνιση	Ναι	Ναι	Ναι
Ρωσία	1963-1965	Επιδημία	Ναι		
	1999, 2010-2011	Επιδημία	Ναι		
	2005-2006	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		
Ισπανία	2004	Σποραδική εμφάνιση	Ναι		
	2007	Σποραδική εμφάνιση			Ναι
	2010	Επιδημία	Ναι	Ναι	
Τυνησία	1997, 2003	Επιδημία	Ναι		

Ναι: Παρουσία κλινικών συμπτωμάτων, **Όχι:** Απουσία κλινικών συμπτωμάτων

Οι πρόσφατες (2010-2011) εξάρσεις του ΙΔΝ στην Ελλάδα

Στις 5 Αυγούστου του 2010 το Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και παρέμβασης του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) ενημερώθηκε από το Νοσοκομείο Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης (ΝΕΠΘ) και το νοσοκομείο της Βέροιας για συρροή κρουσμάτων εγκεφαλίτιδας σε ανθρώπους, στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας. Εστάλησαν δείγματα στο Εργαστήριο Αναφοράς Αρμποιών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και την επόμενη ημέρα βγήκαν τα πρώτα θετικά αποτελέσματα για λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου. Αυτή ήταν και η πρώτη τεκμηριωμένη αναφορά εγκεφαλίτιδας σε ανθρώπους από τον συγκεκριμένο ιό στην Ελλάδα, ενώ σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ο ιός απομονώθηκε για πρώτη φορά και σε πτηνά (Valiakos et al, 2011a). Ωστόσο αντισώματα έναντι του ιού είχαν βρεθεί κατά τη διάρκεια ορολογικών μελετών σε κατοίκους της περιφέρειας της Κεντρικής Μακεδονίας, από τη δεκαετία του 1960 έως και το 2007. Επίσης από ορολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του ΑΠΘ, προέκυψαν δεδομένα για την παρουσία ήπιων στελεχών του ιού σε ιπποειδή, και πτηνά από τη δεκαετία του 1970. Ενώ σε πιο πρόσφατη οροεπιδημιολογική μελέτη που αφορούσε ολόκληρη την Ελλάδα κατά το διάστημα 2001-2004, βρέθηκαν οροθετικά ιπποειδή σε ποσοστό 4% (<http://www2.keelpno.gr/blog/?p=1913>).

Στα πλαίσια επιδημιολογικής επιτήρησης της λοίμωξης από τον ιό του ΔΝ, που οργανώθηκε από το Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης του ΚΕΕΛΠΝΟ, ζητήθηκε από όλους τους κλινικούς ιατρούς της χώρας να δηλώνουν εργαστηριακά επιβεβαιωμένα περιστατικά με λοίμωξη από τον ιό, με βάση τα δεδομένα που ισχύουν στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Πιν. 2)

Πίνακας 2 : Ορισμός κρούσματος ασθενούς με λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου.

<p>Λοίμωξη από ιό του Δυτικού Νείλου θεωρείται ότι έχει κάθε ασθενής που πληροί τουλάχιστον ένα από τα κλινικά (A) ΚΑΙ ένα από τα εργαστηριακά κριτήρια (B)</p>
<p>A) Κλινικά Κριτήρια Οποιοδήποτε άτομο με ένα από τα παρακάτω: α) Εγκεφαλίτιδα (οξεία διαταραχή επιπέδου συνείδησης με πυρετό) β) Άσηπτη μηνιγγίτιδα γ) Άλλες οξείες κλινικές εκδηλώσεις από το Κεντρικό ή το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (π.χ. παράλυση, πάρεση, σπασμοί, αισθητικές διαταραχές κ.λ.π.) δ) Πυρετός χωρίς κλινικές εκδηλώσεις από το νευρικό σύστημα και απουσία άλλης πιθανότερης διάγνωσης</p> <p>B) Εργαστηριακά κριτήρια Τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω: α) Απομόνωση ή ανίχνευση του ιού σε αίμα ή ENY ή άλλο ιστό (καλλιέργεια ή ανίχνευση γονιδιακού υλικού με τεχνικές PCR) β) Ανίχνευση στο ENY ειδικών αντισωμάτων IgM για τον ιό γ) Ανίχνευση στον ορό ενός από τα παρακάτω: <ul style="list-style-type: none">• υψηλός τίτλος αντισωμάτων IgM ή• αύξηση τίτλου αντισωμάτων IgG σε διαδοχικά δείγματα ορών</p>

Συνολικά, στη χώρα μας διαγνώστηκαν 262 κρούσματα, από τα οποία τα 191 (73%) ήταν κρούσματα με εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα (εγκεφαλίτιδα ή/και μηνιγγίτιδα) και 71 (27%) κρούσματα με ήπιες εκδηλώσεις (εμπύρετο κυρίως νόσημα). Σημειώθηκαν συνολικά 35 θάνατοι, όλοι όμως σε υπερήλικα άτομα τα οποία είχαν υποκείμενα νοσήματα. Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν τα 72 έτη, 59% ήταν 70 ετών και άνω και μόνο 5% ήταν κάτω των 30 ετών. Η μεγάλη πλειονότητα των κρουσμάτων εντοπίστηκε στην Κεντρική Μακεδονία, με επίκεντρο της επιδημίας τις πεδινές περιοχές των νομών Ημαθίας και Πέλλας ενώ επίσης ένα εργαστηριακά επιβεβαιωμένο κρούσμα αναφέρθηκε και στον νομό Αιτωλοακαρνανίας. Στην περιοχή της Θεσσαλίας επιβεβαιωμένα κρούσματα είχαμε μόνο από το νομό Λάρισας (Εικ. 7).



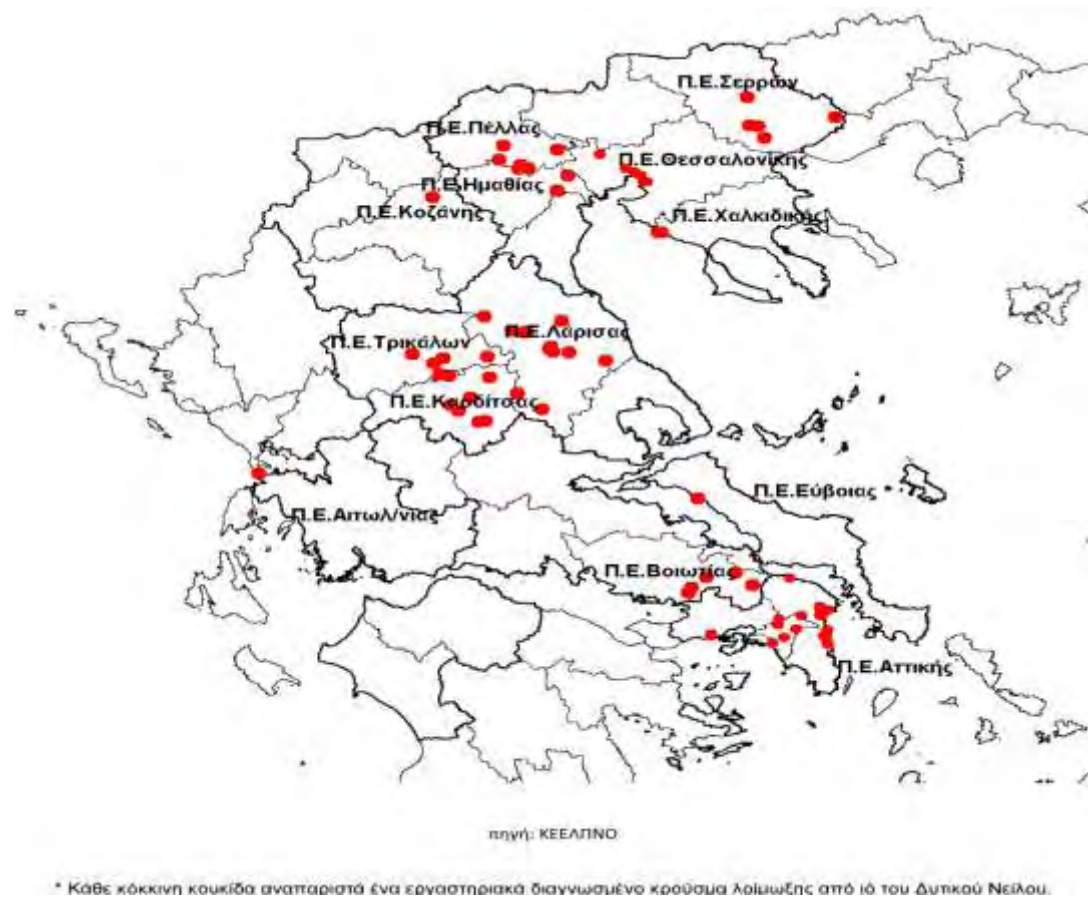
Πηγή: ΚΕΕΛΠΝΟ* Κάθε κόκκινη κουκίδα αναπαριστά ένα εργαστηριακά διαγνωσμένο κρούσμα.
 †Τα ποτάμια από κάτω και από αριστερά προς δεξιά είναι: Αχελώος, Εύηνος, Πηνειός, Αλιάκμονας, Λουδίας, Αξιός, Γαλλικός, Στρυμόνας, Νέστος.

Εικόνα 7: Χάρτης αποτύπωσης της προέλευσης των ασθενών που διεγνώσθησαν με λοίμωξη από τον ΙΔΝ κατά την έξαρση της νόσου στην Ελλάδα το 2010.

Τον Ιούλιο του 2011 έκαναν την εμφάνισή τους νέα κρούσματα λοίμωξης από τον ιό του ΔΝ στην Ελλάδα και μέχρι τον Νοέμβριο διεγνώσθησαν συνολικά 101 περιστατικά. Από τα 101 αυτά περιστατικά 76 εμφάνισαν συμπτώματα από το κεντρικό νευρικό σύστημα (εγκεφαλίτιδα ή/και μηνιγγίτιδα ή/και οξεία χαλαρή παράλυση) και 25 κρούσματα ήπιες εκδηλώσεις (εμπύρετο νόσημα). Σημειώθηκαν οκτώ θάνατοι σε ασθενείς άνω των 65 ετών οι οποίοι είχαν επιπλέον κάποιο υποκείμενο νόσημα. Η διάμεση ηλικία των ασθενών, ομοίως με το 2010, ήταν τα 70 έτη.

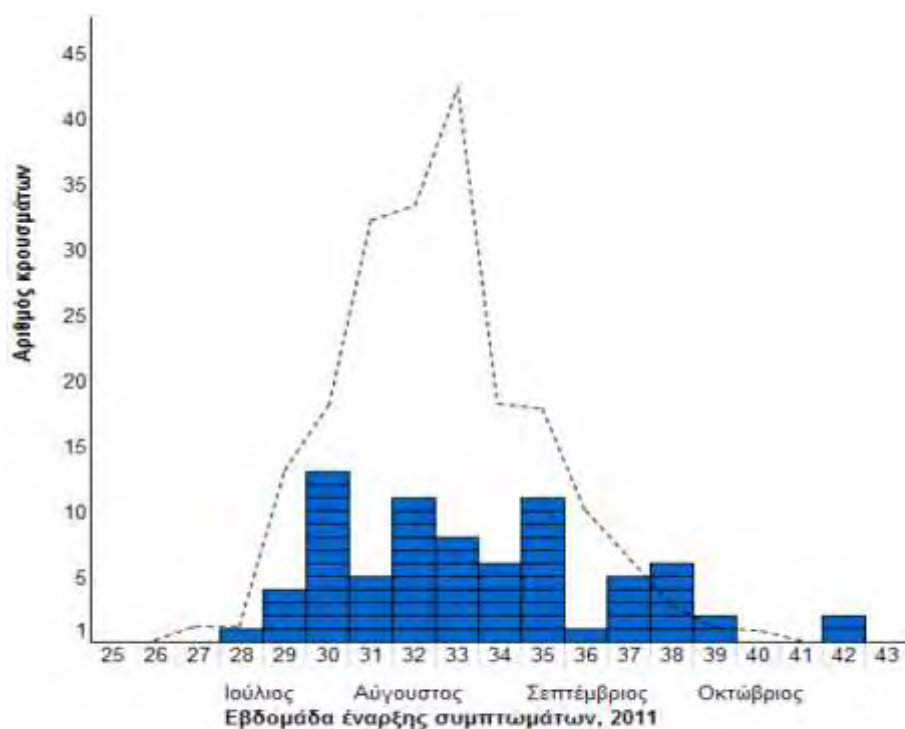
Αυτή τη φορά, όπως ήταν αναμενόμενο, τα κρούσματα δεν περιορίστηκαν μόνο στην Κεντρική και Δυτική Μακεδονία αλλά παρουσίασαν εξάπλωση προς νοτιότερες περιοχές της χώρας όπως η Θεσσαλία, η Εύβοια, η Βοιωτία και η Αττική (Εικ. 8).

Στην περιοχή της Θεσσαλίας, πιο συγκεκριμένα, τα κρούσματα που εκδηλώθηκαν προέρχονταν από τους νομούς Λάρισας, Καρδίτσας και Τρικάλων. Στο νομό Μαγνησίας δεν αναφέρθηκε κάποιο κρούσμα λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου.



Εικόνα 8: Χάρτης αποτύπωσης της προέλευσης των ασθενών που διεγνώστησαν με λοίμωξη από τον ΙΔΝ κατά την έξαρση του ιού στην Ελλάδα το 2011.

Η κατανομή των κρουσμάτων στο χρόνο ήταν διαφορετική ανάμεσα στις δυο επιδημίες (Διάγραμμα.1). Η έξαρση των περιστατικών στην επιδημία του 2010 κορυφώθηκε στα μέσα του Αυγούστου ακολουθώντας μια σχετικά κανονική κατανομή από την έναρξη καταγραφής των περιστατικών τη δεύτερη εβδομάδα του Ιουλίου έως την τελευταία αναφορά κρούσματος στις 5 Οκτωβρίου. Αντίθετα το 2011 δεν καταγράφηκε κορύφωση στην έξαρση των κρουσμάτων τα οποία είχαν μια ποιο ασαφή κατανομή στο χρόνο.



* Η στικτή γραμμή αναπαριστά τον αριθμό κρουσμάτων με εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα, που είχαν δηλωθεί κατά την περίοδο 2010. Κάθε μπλε τετραγωνίδιο αναπαριστά ένα κρούσμα που δηλώθηκε κατά την περίοδο 2011.

πηγή: ΚΕΕΛΠΝΟ

Διάγραμμα 1: Αριθμός κρουσμάτων ασθενών με εργαστηριακή διάγνωση λοίμωξης από τον ΙΔΝ κατά την επιδημία του 2010 και 2011 στην Ελλάδα.

Όπως προκύπτει από τα προαναφερθέντα, η επιδημία του ΙΔΝ στην Ελλάδα το 2010 περιορίστηκε κυρίως στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας. Το 2011, ο ιός εξαπλώθηκε σε πιο νότιες περιοχές της Χώρας όπως η Θεσσαλία (Καρδίτσα, Τρίκαλα και Λάρισα) και ακόμη πιο νότια στην Ανατολική Αττική και τη Βοιωτία. Παρόμοια πρότυπα εξάπλωσης του ιού έχουν παρατηρηθεί στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ, το κλίμα της οποίας είναι παρόμοιο με αυτό της Ελλάδας. Στην Καλιφόρνια ο ιός εισήχθη το 2003 και γρήγορα εξαπλώθηκε σε όλη την πολιτεία.

Εργαστηριακή διάγνωση

Ορολογικές δοκιμές

Στον ορό των ιπποειδών μπορούν να ανιχνευθούν IgM και IgG αντισώματα έναντι του ιού με την ανοσοενζυμική μέθοδο (capture enzyme-linked immunosorbent assay ή capture ELISA), την αναστολή της αιμοσυγκόλλησης (hemagglutination inhibition ή HI) ή με τη δοκιμή εξουδετέρωσης της κυτταροπαθογόνου δράσης σε μικροπλάκα (plaque reduction neutralisation ή PRN) (Beaty et all 1989; Hayes 1989). Οι μέθοδοι HI και PRN είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανίχνευση αντισωμάτων σε ορό πτηνών. Σε κάποιες ορολογικές μεθόδους, μπορεί να επισυμβούν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους Φλαβοϊούς, όπως με τον ιό της εγκεφαλίτιδας του St. Louis ή με τον ιό της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας. Η δοκιμή εξουδετέρωσης της κυτταροπαθογόνου δράσης σε μικροπλάκα είναι η πιο ειδική μεταξύ των ορολογικών μεθόδων. Τέλος, για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων των παραπάνω μεθόδων, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη τυχόν ιστορικό εμβολιασμού των αλόγων έναντι του ιού, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται η τεχνική PRN και η IgG ELISA. Η δεσμευτική των IgM αντισωμάτων ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση ορού πτηνών ή άλλων θηλαστικών αλλά με την προϋπόθεση ότι θα χρησιμοποιηθούν ειδικά για το κάθε είδος δεσμευτικά αντισώματα.

Δοκιμή της εξουδετέρωσης της κυτταροπαθογόνου δράσης σε μικροπλάκα (Plaque reduction neutralisation -PRN)

Η δοκιμή της εξουδετέρωσης της κυτταροπαθογόνου δράσης σε μικροπλάκα πραγματοποιείται με κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων Vero. Η δοκιμή πραγματοποιείται είτε σε φιάλες κυτταροκαλλιέργειας 25 cm², είτε σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (6-well plates) και στόχος είναι η επιβεβαίωση και ο καθορισμός

του τίτλου των εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Ο ορός μπορεί να ελεγχθεί σε αραιώσεις των 1/10 και 1/100 ή να τιτλοποιηθεί μέχρι τελικού σημείου.

Ταυτοποίηση του ιού

Καλλιέργεια

Τα κλινικά δείγματα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του ιού περιλαμβάνουν τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό στα ιπποειδή, (Ostlund et all., 2000; Ostlund et all., 2001) ενώ στα πτηνά μια ποικιλία ιστών μεταξύ των οποίων ο εγκέφαλος, η καρδιά και το ήπαρ (Steele et all., 2000). Γενικότερα ο ιός απομονώνεται ευκολότερα από κλινικά δείγματα πτηνών. Ο ιός μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε ευαίσθητες κυτταροκαλλιέργειες, από κυτταρικές σειρές νεφρών κουνελιών (RK-13) και από κύτταρα νεφρών των αφρικανικών πράσινων μαϊμούδων (Vero). Μπορεί να πολλαπλασιαστεί επίσης και σε εμβρυοφόρα αυγά. Ο ΙΔΝ εμφανίζει κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα σε ευαίσθητες κυτταροκαλλιέργειες. Ο ενδοεγκεφαλικός ενοφθαλμισμός λειοτριβιμένων μολυσμένων ιστών σε νεογέννητα ποντίκια μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση του ιού. Η επαλήθευση της απομόνωσης του ιού επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού στις μολυσμένες καλλιέργειες ή με μοριακές μεθόδους ανίχνευσης του γενώματος του ιού.

Ανοσολογικές μέθοδοι

Η ανοσοϊστοχημική (IHC) χρώση μονιμοποιημένων σε φορμόλη ιστών, αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδος ταυτοποίησης του ιού του ΔΝ στα πτηνά. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο συχνά ανιχνεύονται αντιγόνα του ιού σε ιστούς μολυσμένων πτηνών, όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι νεφροί, ο σπλήνας, το ήπαρ, το έντερο και οι πνεύμονες. Το ποσοστό επιτυχίας της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης αντιγόνων του ιού σε θετικά πτηνά, αυξάνεται με την εξέταση πολλαπλών ιστών. Η ειδικότητα της ανίχνευσης εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενα αντισώματα.

Μοριακές μέθοδοι

Η ανίχνευση του RNA του ιού με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εντοπισμού μολυσμένων ζώων, ιδιαίτερα κατά την εφαρμογή της μεθόδου της ένθετης PCR (nested PCR) (Johnson et al., 2001). Η μέθοδος ένθετης RT-PCR για την ανίχνευση τμήματος RNA του ιού του ΔΝ, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Ε του ιού εφαρμόστηκε επιτυχώς στην ανίχνευση του γονιδιώματος του ιού σε ιστούς ζώων κατά τη διάρκεια των επιδημιών στην Αμερική. Ο ιός της εγκεφαλίτιδας του St.Louis δεν ανιχνεύτηκε με αυτή τη μέθοδο. Οι ιοί της εξελικτικής ομάδας 1, που απομονώθηκαν από την Κίνα, τη Γαλλία, την Αίγυπτο, το Ισραήλ, την Ιταλία, την Κένυα, το Μεξικό και τη Ρωσία, αποδείχτηκε ότι μοιράζονται ένα τμήμα της περιοχής στόχου το οποίο είναι ιδιαίτερα συντηρημένο (Lanciotti et al., 2000). Η ανάλυση της αλληλουχίας της περιοχής στόχου του στελέχους που απομονώθηκε στην Ουγκάντα και ανήκει στην εξελικτική ομάδα 2 (GenBank M 12294), έδειξε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορούσε να ανιχνεύσει στελέχη αυτής της εξελικτικής ομάδας. Επίσης στη μελέτη δεν συμπεριελήφθησαν άλλα μέλη της ορολογικής ομάδας της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας. Η εφαρμογή παρόμοιων μοριακών μεθόδων, όπως η PCR σε πραγματικό χρόνο (real time PCR) και η RT-PCR σε ένα βήμα (one step RT-PCR) μειώνουν την πιθανότητα της διασταυρούμενης μόλυνσης στο εργαστήριο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία σε κλινικά δείγματα όπως οι ιστοί πτηνών (Lanciotti et al., 2000).

Μέθοδος RT-PCR

Το ένζυμο RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, κοινώς γνωστό και ως αντίστροφη μεταγραφάση, έχει την ικανότητα να συνθέτει DNA από RNA. Ο συνδυασμός της δράσης αυτού του ενζύμου με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είχε ως αποτέλεσμα τη γέννηση της γνωστής πλέον τεχνικής αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR). Η τεχνική αυτή, στις μέρες μας, έχει ευρεία εφαρμογή στη μοριακή διερεύνηση και διάγνωση των λοιμώξεων από RNA ιούς.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, αποτελεί το δεύτερο βήμα της παραπάνω τεχνικής και είναι επίσης μια ενζυματική αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο πολυμεράση στοχεύοντας στην ανίχνευση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, μέσω του εκθετικού πολλαπλασιασμού του.

Το πρώτο βήμα της RT-PCR (Αντίστροφη μεταγραφή του Ριβοζονουκλεϊκού οξέος)

Η διαδικασία της σύνθεσης δεοξυριβοζονουκλεϊκού οξέος (DNA) από εκμαγείο ριβοζονουκλεϊκού οξέος (RNA) ονομάζεται “αντίστροφη μεταγραφή” διότι αντιστρέφει την ροή των γενετικών πληροφοριών από το RNA στο DNA, αντίθετα δηλαδή με αυτό που συμβαίνει κατά την φυσιολογική μεταγραφή. Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής καταλύεται από μια DNA πολυμεράση, ένα ένζυμο το οποίο κωδικοποιείται από το γονιδίωμα των ρετροϊών και ευρέως ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο των ρετροϊών το οποίο μετατρέπει το μονής αλυσού RNA γονιδίωμα τους σε DNA.

Για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ολιγονουκλεοτιδικοί, τυχαίοι ή ειδικοί εκκινητές, ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα και τη διαδικασία που θα εφαρμοστεί. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται στο εκμαγείο του RNA και πολυμερίζονται από την παρουσία ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), κατάλληλου pH και αλατότητας, για να παράγουν

το συμπληρωματικό DNA (cDNA). Από τη στιγμή που θα παραχθεί το cDNA μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος της PCR προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανίχνευση του.

Το δεύτερο βήμα της RT-PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης)

Με τη χρήση της τεχνικής της PCR πραγματοποιείται, σε συνθήκες εργαστηρίου (in vitro), η σύνθεση ενός τμήματος DNA που αποτελεί το στόχο της αντίδρασης. Στη συνέχεια ακολουθεί ο εκθετικός πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος, με τελικό σκοπό την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εμφάνιση και αποτύπωσή του. Μετά το τέλος της διαδικασίας ο αριθμός αντιγράφων που παράγεται είναι μεγαλύτερος από 10^6 .

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εκμεταλλεύεται τη φυσική δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση, που αποτελεί το ένζυμο αντιγραφής του DNA κάθε κύτταρου κατά τη διαίρεση του. Ειδικότερα, στο διαιρούμενο κύτταρο, μετά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, το ένζυμο πολυμεράση συνθέτει την συμπληρωματική αλυσίδα του DNA με κατεύθυνση από το 5' προς το 3' άκρο, παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Στην αντίδραση PCR γίνεται η ίδια ενζυματική διεργασία από το ένζυμο πολυμεράση, σε συνθήκες in vitro.

Επιλογή του DNA στόχου

Στην περίπτωση των RNA ιών το DNA στόχος αντιπροσωπεύει το συμπληρωματικό DNA (cDNA) που έχει προκύψει μετά το τέλος του πρώτου βήματος της μεθόδου RT-PCR. Η επιλογή του DNA στόχου αποτελεί σημαντικό παράγοντα στο σχεδιασμό του πρωτοκόλλου της PCR. Βασική παράμετρος στην επιλογή του στόχου αποτελεί η γενετική σταθερότητα του τμήματος DNA που θα επιλεγεί να πολλαπλασιασθεί. Η γενετική αυτή σταθερότητα εξασφαλίζει ότι οι θέσεις σύνδεσης των εναρκτήριων αλληλουχιών θα έχουν πάντα την ίδια σύνθεση, έτσι ώστε ο υβριδισμός να είναι ειδικός και σταθερός. Η δομή της αλληλουχίας του DNA στόχου που θα πολλαπλασιαστεί είναι δυνατό να είναι άγνωστη, όμως θα πρέπει να είναι γνωστή η

αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του, ώστε να κατασκευαστούν συνθετικά οι εκκινητές.

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται στην τεχνική της shotgun-PCR, όπου από μια γνωστή περιοχή κατασκευάζεται ο εκκινητής, ο οποίος πολλαπλασιάζει την αλυσίδα σε γειτονικό μήκος 400-500 bp με άγνωστη αλληλουχία. Στη συνέχεια με την αλληλούχιση του DNA (DNA sequencing) γίνεται γνωστή η αλληλουχία της νέας αλυσίδας, η οποία με τη σειρά της χρησιμοποιείται ως μήτρα για την κατασκευή νέου εκκινητή, ο οποίος γίνεται βάση για νέο πολλαπλασιασμό της αμέσως επόμενης γειτονικής άγνωστης αλληλουχίας, κ.ο.κ.

Μίγμα αντίδρασης της PCR

Το μίγμα αντίδρασης της PCR, όπως προαναφέρθηκε, περιέχει τον DNA στόχο, τους εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, $MgCl_2$ που παρέχει τα ιόντα Mg^{++} που είναι απαραίτητα για την ενζυματική αντίδραση, το ένζυμο DNA πολυμεράση και ρυθμιστικό διάλυμα συγκεκριμένου pH κατάλληλου για τη δράση του ενζύμου.

Οι εκκινητές (primers) είναι τμήματα μονόκλωνου DNA μεγέθους 18-25 βάσεων, που υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένο σημείο του DNA στόχου και αποτελούν το σημείο έναρξης της επέκτασης της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η επέκταση πραγματοποιείται πάντα με κατεύθυνση από το 5' προς το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί μια σχετικά περίπλοκη διαδικασία, που συνήθως ολοκληρώνεται με τη χρήση προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Οι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη για το σχεδιασμό των καταλληλότερων εκκινητών είναι η αλληλουχία του DNA στόχου, η περιεκτικότητα και αναλογία στις τέσσερις βάσεις (A, T, C, G), το μήκος της αλυσίδας της εναρκτήριας αλληλουχίας (μήκος μικρότερο από 15 βάσεις ελαττώνει την ειδικότητα), η θερμοκρασία υβριδισμού (που θα πρέπει να βρίσκεται σε ένα εύρος 50-60°C και εξαρτάται από την περιεκτικότητα της κάθε βάσης), τα φυσικά χαρακτηριστικά (όπως ο πιθανός σχηματισμός διμερών και δευτεροταγών δομών τύπου φουρκέτας).

Το ένζυμο DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην *in vitro* αντίδραση είναι μία μορφή θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq). Το βασικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου ενζύμου είναι ότι διατηρείται ενεργό κατά τις επαναλαμβανόμενες υψηλές θερμοκρασίες (93-95°C) που απαιτούνται για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στόχου.

Τα ιόντα μαγνησίου Mg^{++} παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση των εκκινητών και στη συνολική ευαισθησία και ειδικότητα της αντίδρασης. Η χαμηλή συγκέντρωση ιόντων οδηγεί σε φτωχή ευαισθησία, ενώ αντίθετα πολύ υψηλή συγκέντρωση ελαττώνει την ειδικότητα της αντίδρασης. Για τις περισσότερες αντιδράσεις μια συγκέντρωση μεταξύ 0,5 και 3,0 mM θεωρείται επαρκής, όμως η τελική συγκέντρωση θα πρέπει να καθορίζεται εμπειρικά, με δοκιμές μικρότερης και μεγαλύτερης συγκέντρωσης, έτσι ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα.

Η συγκέντρωση των τριφωσφορικών δεοξυνουκλετιδίων θα πρέπει επίσης να καθορίζεται εμπειρικά, αν και σε γενικές γραμμές μια συγκέντρωση μεταξύ 20 και 200 mM θεωρείται ικανοποιητική. Ο εμπειρικός καθορισμός με έλεγχο μεγαλύτερων και μικρότερων συγκεντρώσεων θα πρέπει να διενεργείται παράλληλα με τον εμπειρικό καθορισμό της συγκέντρωσης των ιόντων μαγνησίου Mg^{++} .

Διαδικασία της PCR

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, όπως προαναφέρθηκε, απαιτούνται τα εξής:

- α) Η DNA πολυμεράση
- β) Το DNA στόχος που θα πολλαπλασιαστεί
- γ) Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) για τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA
- δ) Ζεύγος εκκινητών (primers), συμπληρωματικών προς την αλληλουχία της αρχής και του τέλους του DNA στόχου που θα πολλαπλασιαστεί (εναρκτήριες

αλληλουχίες). Το μέγεθος της αλληλουχίας των εκκινητών θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 15-25 bp

ε) Ρυθμιστικό διάλυμα ιόντων Mg^{++} .

Η αντίδραση αποτελείται από τρία στάδια:

α) Αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου DNA

β) Υβριδισμός (annealing) των εκκινητών

δ) Πολυμερισμός-επέκταση (extension) της συμπληρωματικής αλυσίδας. Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν ένα πλήρη κύκλο και κάθε αντίδραση PCR αποτελείται από 25-40 παρόμοιους κύκλους. Η διαδικασία άλλωστε της συνεχούς επανάληψης των τριών αυτών σταδίων ήταν αυτή που έδωσε στην αντίδραση το όνομα της.

Η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, πραγματοποιείται όταν η θερμοκρασία του διαλύματος της αντίδρασης φθάσει στους 93-95°C. Στη θερμοκρασία αυτή το δίκλωνο DNA διαχωρίζεται στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Στη συνέχεια, μετά την ελάττωση της θερμοκρασίας σε επίπεδα 45-65°C (στάδιο υβριδισμού) πραγματοποιείται ο υβριδισμός, δηλαδή η ένωση των εναρκτήριων αλληλουχιών στις συμπληρωματικές θέσεις των αλυσίδων του DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι ειδική για κάθε ζεύγους εναρκτήριων αλληλουχιών και εξαρτάται από τη σύνθεση (περιεκτικότητα σε G-C) και το μέγεθος των αλληλουχιών. Τέλος, μετά την εκ νέου αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C (στάδιο επέκτασης του DNA), το ένζυμο DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το ήδη υπάρχον DNA συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα, προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεοτίδια από το διάλυμα της αντίδρασης στο 3' άκρο της, με κατεύθυνση πάντα 5' προς 3'.

Με το τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του στόχου DNA είναι τέσσερις (δύο αρχικοί, δύο νέοι) και αποτελούν τα πρότυπα για σύνθεση νέου DNA στο δεύτερο κύκλο. Στο τέλος του δεύτερου κύκλου οι κλώνοι είναι οκτώ. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι έχουν ως αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του στόχου DNA, καθώς οι κλώνοι που σχηματίζονται

χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Έτσι επιτυγχάνεται μεγέθυνση 2ⁿ (όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων) με την αντίδραση PCR.

Το κύριο προϊόν της αντίδρασης PCR είναι το τμήμα του DNA που περιλαμβάνεται μεταξύ των εκκινητών. Τα άκρα του καθορίζονται από το 5' άκρο των εκκινητών και το μέγεθος του είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητών και της παρεμβλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου. Αυτό αποτελεί το προϊόν πολλαπλασιασμού του στόχου (βραχύ προϊόν – short product). Κατά τους πρώτους κύκλους της αντίδρασης όμως παράγονται και μακρύτερα αντίγραφα DNA, που το μέγεθος τους ξεπερνά το μεταξύ των εκκινητών τμήμα (μακρά προϊόντα – long products). Από τον τρίτο όμως κύκλο και στην συνέχεια η εκθετική αύξηση αφορά κυρίως τα προϊόντα πολλαπλασιασμού (βραχέα προϊόντα), ενώ τα μακρύτερα προϊόντα αν και παράγονται και αυτά, δεν αποτελούν παρά μικρό μόνο τμήμα του συνολικού τελικού αποτελέσματος της αντίδρασης και δεν παρεμβαίνουν στην τελική εικόνα.

Εμφάνιση και αποτύπωση του τελικού προϊόντος πολλαπλασιασμού

Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της PCR γίνονται ορατά και ελέγχονται με αρκετούς τρόπους, οι συχνότεροι των οποίων είναι:

α) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από σύνδεση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο

β) Υβριδισμός με ιχνηθέτη με φθορίζουσα, ανοσοενζυμική ή ραδιενεργό σήμανση.

Η μέθοδος με πήκτωμα αγαρόζης και βρωμιούχο αιθίδιο είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη, έχει όμως χαμηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τις μεθόδους ιχνηθέτη.

Η αγαρόζη είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από τα φύκια. Λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας της σε θεϊκές ομάδες έχει πολύ μικρό ηλεκτρικό φορτίο, με αποτέλεσμα να βρίσκει σημαντικές εφαρμογές στην ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων.

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι σχετικά απλή και σύντομη και έχει τη δυνατότητα να διαχωρίζει τα τμήματα του DNA που έχουν διαφορετικό μέγεθος. Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα άμεσου εντοπισμού της θέσης των τμημάτων DNA μέσα στο πήκτωμα, μετά από χρώση του DNA με αραιά διαλύματα βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής, που έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Έτσι, τα τμήματα του DNA μπορούν εύκολα να εντοπιστούν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, με τη χρήση ενός ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης και κατεύθυνσης και βασίζεται στο γεγονός ότι οι φωσφορικές ομάδες του DNA, έχουν αρνητικό φορτίο. Έτσι, στο ηλεκτρικό πεδίο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, το DNA έχει την τάση να μετακινηθεί από την κάθοδο προς την άνοδο, με σταθερή ταχύτητα ανεξάρτητα από την νουκλεοτιδική του σύσταση. Οι όποιες διαφορές προκύπτουν στην κινητικότητα των διαφορετικών τμημάτων DNA οφείλονται στην αντίσταση που εμφανίζεται κατά τη μετακίνηση τους διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, αντίσταση που είναι μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του προϊόντος πολλαπλασιασμού που ηλεκτροφορείται. Άρα, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των μορίων DNA, τόσο πιο δύσκολη θα είναι η μετακίνησή τους, ενώ αντίθετα, τα μόρια DNA με μικρό μοριακό μέγεθος περνούν ευκολότερα μέσα από το πήκτωμα και φτάνουν γρηγορότερα στην άνοδο

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα του DNA κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, πλην του μεγέθους του προϊόντος DNA, είναι:

- α) Η συγκέντρωση της αγαρόζης (όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση και συνεπώς πυκνότερο το πήκτωμα τόσο πιο αργή η μετακίνηση του DNA)
- β) Η διαμόρφωση του DNA (η υπερελικωμένη και η γραμμική διαμόρφωση των μορίων DNA του ίδιου μοριακού βάρους θα μετακινηθούν με διαφορετικό ρυθμό στην αγαρόζη)
- γ) Η διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου

δ) Η παρουσία χρωστικών (η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της κινητικότητας του DNA έως και 10%)

ε) Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης (η απουσία ιόντων μειώνει πολύ την κινητικότητα του DNA).

Υπάρχουν διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση. Συνήθως περιέχουν EDTA και μείγμα ιόντων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται συνήθως συμπυκνωμένα και φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την τελική χρήση τους, οπότε και αραιώνονται κατάλληλα.

Τα αποτελέσματα γίνονται ορατά μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τοποθετώντας την πηκτή αгарόζης κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Έτσι σε περίπτωση θετικών αποτελεσμάτων γίνονται εμφανείς ζώνες, οι οποίες είναι το ορατό αποτέλεσμα της συγκέντρωσης του τμήματος του DNA που πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR, συνδεδεμένου με τη χρωστική.

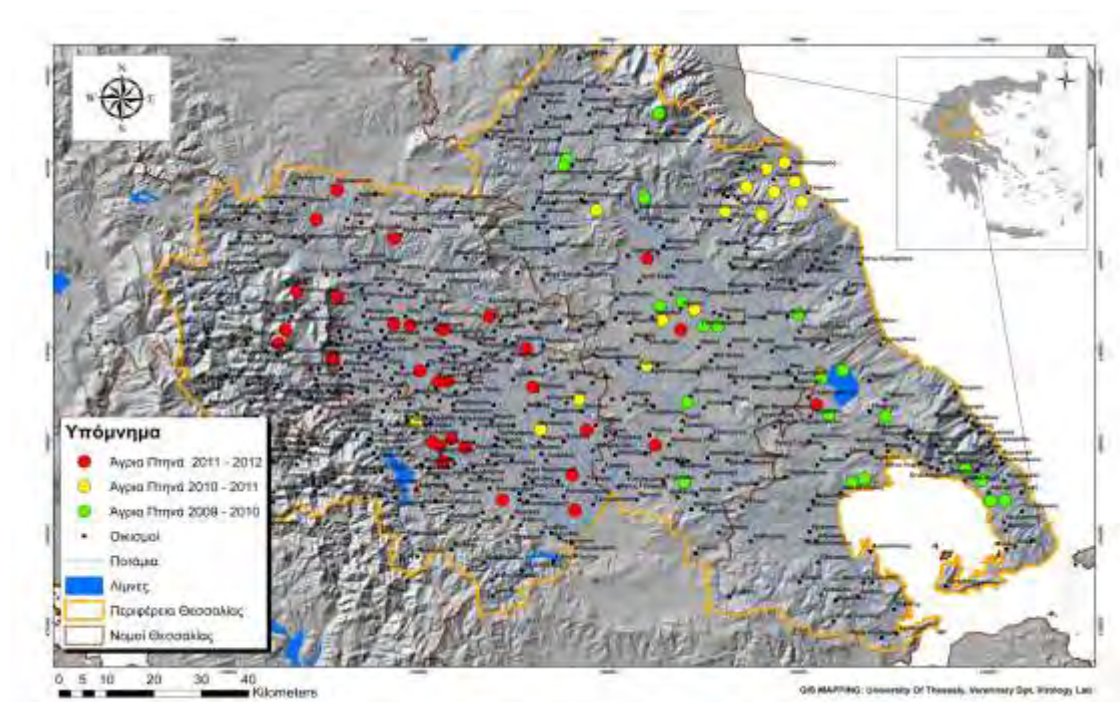
Πειραματικό μέρος

Υλικά και μέθοδοι

Χρονική περίοδος και περιοχή δειγματοληψίας

Για τους σκοπούς της παρούσας διπλωματικής εργασίας συλλέχθηκαν 65 δείγματα ιστών από πτηνά της περιοχής της Θεσσαλίας, τα οποία βρέθηκαν νεκρά ή κυνηγήθηκαν κατά το διάστημα των κυνηγετικών περιόδων (από 20 Αυγούστου έως

28 Φεβρουαρίου του επόμενου έτους) 2009/10, 2010/11 και 2011/12. Πιο συγκεκριμένα συλλέχθηκαν 17 άγρια πτηνά από το Ν. Λάρισας, 18 από το Ν. Καρδίτσας, 19 από το Ν. Τρικάλων και 11 από το Ν. Μαγνησίας (Εικ. 9).



Εικόνα 9: Χάρτης περιοχής δειγματοληψίας στον οποίο απεικονίζονται το ανάγλυφο της περιοχής, τα ποτάμια και οι λίμνες καθώς και ο αριθμός των δειγμάτων και ο χρόνος συλλογής τους.

Γεωγραφικές πληροφορίες και κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής δειγματοληψίας

Κλίμα

Οι κλιματικές περιοχές καθορίζονται στη Θεσσαλία από το ανάγλυφο δηλαδή από τον προσανατολισμό, το υψόμετρο και την έκθεση στους ανέμους. Με

βάση αυτό διακρίνονται τρεις κλιματικές περιοχές. Η πρώτη κλιματική περιοχή αποτελείται από τα παράλια του Αιγαίου. Χαρακτηριστικά αυτής της περιοχής είναι οι βόρειοι άνεμοι, σημαντική υγρασία ακόμη και κατά την ξηρή περίοδο. Οι χειμώνες είναι σαφώς ηπιότεροι από ότι στη λεκάνη της Θεσσαλίας. Η δεύτερη κλιματική περιοχή αποτελείται από τη θεσσαλική λεκάνη. Χαρακτηριστικά αυτής της περιοχής είναι ηπιότεροι άνεμοι δεδομένης της ύπαρξης των ορέων που την περικλείουν, θερμοκρασίες υψηλότερες από την πρώτη κλιματική περιοχή και χειμώνες πολύ βαρείς. Η Τρίτη κλιματική περιοχή αποτελείται από το νησιωτικό. Τμήμα, όπου το κλίμα μπορεί να θεωρηθεί ως μεσογειακό που χαρακτηρίζεται από ήπιο και βροχερό χειμώνα, σχετικά βροχερή άνοιξη, ζεστό και ξηρό καλοκαίρι και δροσερό και συνήθως βροχερό φθινόπωρο.

Ποταμοί

Το υδατογραφικό δίκτυο της Θεσσαλίας είναι αρκετά πλούσιο. Υπάρχουν αρκετοί ποταμοί και χείμαρροι που πηγάζουν από τους ορεινούς όγκους της Θεσσαλίας και διασχίζουν την περιφέρεια εκβάλλοντας στο Αιγαίο πέλαγος. Η Περιφέρεια διασχίζεται από τον Πηνειό έναν από τους μεγαλύτερους ποταμούς της χώρας. Πιο συγκεκριμένα τα ποτάμια που διαρρέουν το νομό Καρδίτσας πηγάζουν από τα Άγραφα και γενικότερα από την Πίνδο. Τα κυριότερα ποτάμια είναι ο Ταυρωπός ή Μέγδοβας, ο Κερασιώτης και το Μεγάλο ποτάμι ο ποταμός Αχελώος που πηγάζει από την Πίνδο και είναι το φυσικό σύνορο με το νομό Άρτας. Από τα Άγραφα πηγάζει ο Σοφαδίτικος και ο Καρδιτσιώτικος που εκβάλλει στον Πηνειό. Τα ποτάμια που διαρρέουν το νομό Λάρισας είναι ο Πηνειός ο οποίος πηγάζει από τα Αντιχάσια και εκβάλλει στο Αιγαίο πέλαγος, ο Ελασσονίτικος, ο Τιταρήσιος που πηγάζει από το βουνό Τίταρος και ο Ενιπέας που πηγάζει από τον Όρθρυ. Επίσης το υδρολογικό πλέγμα του νομού συμπληρώνεται από τους Ξεριάς, Σμολιώτικος, Σαραντάπορος, Βουλγάρας και Παλιομάντανος. Ο νομός Μαγνησίας δε φέρει υδρολογικό πλέγμα, παρά μόνο μερικούς χείμαρρους στο νησιώτικο τμήμα. Το υδρολογικό σύστημα του νομού Τρικάλων είναι πλούσιο και περιλαμβάνει τον Πηνειό, τον Ασπροπόταμο που πηγάζει από τα βουνά της Πίνδου

και διασχίζει μέρος των συνόρων Άρτας-Τρικάλων και συνεχίζει στους νομούς Καρδίτσας και Αιτωλοακαρνανίας. Επίσης υπάρχουν αρκετά σημαντικά ποτάμια που θεωρούνται παραπόταμοι του Πηνειού, όπως ο Ληθαίος, ο Νεοχωρίτης, ο Πορταϊκός, ο Ντολερίτης και ο Μουργκάνης.

Λίμνες

Η Θεσσαλία διαθέτει τεχνητές λίμνες οι οποίες δημιουργήθηκαν για τη συγκράτηση υδάτινων πόρων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ύδρευση οικισμών σε χαμηλότερο υψόμετρο και την άρδευση καλλιεργήσιμων εδαφών. Φυσικές λίμνες εμφανίζονται μόνο στη Σκιάθο. Σημαντικές είναι οι τεχνητές λίμνες Ταυρωπού ή Πλαστήρα έκτασης 25.000 στρεμμάτων η οποία δημιουργήθηκε το 1959-1962 και βρίσκεται σε υψόμετρο 850 μ. στο νότιο-δυτικό τμήμα του νομού Καρδίτσας και αυτή στο Κεφαλόβρυσο στο νομό Λάρισας. Φυσικές λίμνες είναι η Στεφανάδα στην Αργιθέα Καρδίτσας και οι λίμνες Βρωμολίμνη, Στροφυλιά και Αγίου Γεωργίου στη Σκιάθο. Η ανασύσταση της λίμνης Κάρλας, στα όρια των νομών Λαρίσης και Μαγνησίας, βρίσκεται στη φάση πλήρωσής της με νερά από τον Πηνειό ποταμό μέσω του φράγματος της Γυρτώνης. Ο νομός Τρικάλων είναι ο μόνος από τους τέσσερις νομούς της Θεσσαλίας ο οποίος δε διαθέτει έως σήμερα ούτε φυσική ούτε τεχνητή λίμνη.

Βιότοποι-Υγρότοποι

Σε όλη την Περιφέρεια Θεσσαλίας αναπτύσσονται σημαντικοί βιότοποι. Στο νομό Καρδίτσας υπάρχουν δύο υγρότοποι. Ο ένας βρίσκεται στην τεχνητή λίμνη Πλαστήρα και ο δεύτερος στον ποταμό Αχελώο στα όρια των νομών Αιτωλοακαρνανίας και Καρδίτσας. Στο νομό Λάρισας ως υγρότοποι χαρακτηρίζονται, ο χώρος στο δέλτα Πηνειού στην περιοχή του Στομίου, ο ποταμός Πηνειός, ο ποταμός Ελασσονίτικος και ο ποταμός Τιταρήσιος. Στο νομό Μαγνησίας υπάρχει ο υγρότοπος της λίμνης Κάρλας. Ακόμα, στην περιοχή βρίσκεται το έλος του όρμου της Σούρπης. Τέλος, οι λίμνες της Σκιάθου, Βρωμολίμνη, Στροφυλιά

και Αγίου Γεωργίου, αποτελούν σημαντικούς βιότοπους για τη γλωρίδα και την πανίδα της περιοχής. Στο νομό Τρικάλων υπάρχει ο υγρότοπος του Ασπροποτάμου (Αχελώου) στα σύνορα των νομών Τρικάλων και Άρτας και ο υγρότοπος του ποταμού Ληθαίου (ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡ/ΣΜΟΥ)

Είδη πτηνών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε και από τους τέσσερις νομούς της Θεσσαλίας και η επιλογή των ειδών που συμπεριελήφθησαν, έγινε με γνώμονα το ρόλο τους στη διατήρηση και διασπορά του ιού του Δυτικού Νείλου, όπως αυτός αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα δόθηκε έμφαση κυρίως στα κορακοειδή, όπως οι καρακάξες και οι κουρούνες, καθώς αποτελούν ενδημικά είδη της ελληνικής επικράτειας, τα οποία είναι παρόντα τόσο σε αγροτικές περιοχές και υδροβιότοπους όσο και σε αστικές περιοχές και μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο τόσο στην τοπική διατήρηση του ιού όσο και στη διασπορά του σε γειτονικές περιοχές. Παράλληλα επιλέγησαν και μεταναστευτικά είδη πτηνών, όπως τα τρυγόνια και οι μεγκάτσες, τα οποία είναι ικανά να καλύπτουν μεγάλες αποστάσεις σε σύντομο χρονικό διάστημα όντας ιαμικά, μεταφέροντας κατ' αυτό τον τρόπο τον ιό σε απομακρυσμένες περιοχές (Owen et al., 2006; Ernek et al., 1977). Τέλος με σκοπό τον πιθανό εμπλουτισμό των δεδομένων που αφορούν την επιδημιολογία του ιού τόσο στην περιοχή όσο και στην ευρύτερη επικράτεια συμπεριελήφθησαν και άλλα ενδημικά είδη πτηνών καθώς και κάποια αρπακτικά (Πιν. 3).

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>).

Πίνακας 3: Περιοχές δειγματοληψίας και είδη πτηνών.

ΕΙΔΟΣ \ ΝΟΜΟΣ	ΛΑΡΙΣΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑ	ΤΡΙΚΑΛΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
Pica pica (Καρακάξα)	4	14	2	1
Corvus cornix (Σταχτοκουρούνα)	2			
Corvus corone (Κουρούνα)	1		1	
Corvus monedula(Κάργια)	4			
Corvus frugilegus (Χαβαρόνι)	1			
Garrulus glandarius (Κίσσα)			1	
Streptopelia turtur (Τρυγόνι)	2	1		
Scolopax rusticola (Μπεκάτσα)	2		2	
Coturnix coturnix (Ορτύκι)			1	
Turdus philomelos (Γσίχλα)				8
Turdus pilaris (Κεδρότσιχλα)		1	1	
Turdus viscivorus (Γερακότσιχλα)			2	
Cuculus canorus (Κούκος)	1			
Sturnus vulgaris (Ψαρόνι)			1	
Turdus merula (Κότσυφας)			3	2
Alectoris graeca (Πετροπέρδικα)			4	
Falco tinnunculus (Βραχοκικνίεζο)			1	
Asio otus (Νανόμπουφος)		1		
Tyto alba (Πεπλόγλαυκα)		1		

Επιλογή του κλινικού δείγματος για την απομόνωση του ΙΔΝ

Όσον αφορά τον ιό του ΔΝ ισχύει ως γενικότερη παραδοχή ότι οι ιστοί των πτηνών έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ιϊκού φορτίου από τους αντίστοιχους των ιπποειδών. Ιστοί όπως ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός είναι οι ιστοί εκλογής για την ανίχνευση του ιού από τα άλογα. Στα πτηνά ο ιός μπορεί να απομονωθεί και να ανιχνευθεί από ιστούς όπως ο εγκέφαλος, οι νεφροί, η καρδιά, το ήπαρ, οι πνεύμονες, ο σπλήνας και το έντερο των πτηνών (Panella et al., 2001). Στην παρούσα εργασία τα όργανα που επιλέχθηκαν, όπου αυτό ήταν εφικτό, με σκοπό την δημιουργία ομογενοποιημάτων ήταν το ήπαρ, οι νεφροί, η καρδιά, ο σπλήνας και ο εγκέφαλος από κάθε πτηνό.

Επεξεργασία και χειρισμός του κλινικού δείγματος

Η απομόνωση και ο χειρισμός του RNA πραγματοποιήθηκαν με στείρο εξοπλισμό, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεσή του σε ριβονουκλεάσες (RNases). Το RNA είναι πολύ ευαίσθητο στην παρουσία αυτών των ενζύμων τα οποία καταλύουν τη διαδικασία αποδόμησης του σε μικρότερα δομικά στοιχεία. Διαδικασία που άλλωστε αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στους ιούς. Έτσι, για την αποφυγή της περαιτέρω επιβάρυνσης των δειγμάτων με RNases, μετά τη συλλογή τους οι ιστοί των πτηνών τοποθετήθηκαν στους -20°C και μεταφέρθηκαν άμεσα (εντός εικοσιτεσσάρων ωρών) στο εργαστήριο. Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

Με στόχο την ανάκτηση υψηλής ποιότητας ακέραιου cDNA κατά την εκχύλιση του ολικού RNA, που χρησιμοποιήθηκε ως βάση, χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη η οποία έχει την ικανότητα να αποδομεί τις κυτταρικές δομές και τις πρωτεΐνες των ιστών, με αποτέλεσμα την ταχεία αποσύνδεση των νουκλεοπρωτεϊνών από τα νουκλεϊκά οξέα και την αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών.

RT-PCR σε ένα βήμα (One step RT-PCR)

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να ανιχνεύσουμε συγκεκριμένο τμήμα του RNA του γονιδιώματος των Φλαβοϊών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε ένα βήμα (One step Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-One-step RT PCR) όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα (Weissenböck et al., 2002)

Με την συγκεκριμένη παραλλαγή της RT-PCR μειώνεται η πιθανότητα επιμόλυνσης των δειγμάτων και παράλληλα απλοποιείται η διαδικασία της αντίδρασης καθώς η αντίστροφη μεταγραφή και η επακόλουθη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιούνται στο ίδιο σωλήνα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι επειδή χρησιμοποιούνται ειδικοί του γονιδίου εκκινητές, με τον τρόπο αυτό ενισχύεται η ευαισθησία αυτής καθώς όλη η δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης κατευθύνεται σε ένα συγκεκριμένο στόχο και όχι στο συνολικό RNA που υπάρχει στο σωλήνα. Με αυτό τον τρόπο πολλαπλασιάζεται η συνολική ποσότητα του συμπληρωματικού DNA, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα ανίχνευσης ακόμη και απειροελάχιστων ποσοτήτων αρχικού RNA.

Επιλογή του RNA στόχου

Η επιλογή του επιθυμητού τμήματος RNA έγινε με σκοπό την ανίχνευση οποιοδήποτε Φλαβοϊού. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών (Πιν. 4) για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος του γονιδιώματος των φλαβοϊών, μεγέθους 1084 ζευγών βάσεων, το οποίο είναι μέρος του γονιδίου που κωδικοποιεί τη μη δομική πρωτεΐνη NS5 και παράλληλα είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των ιών αυτής της οικογενείας (Weissenböck et al., 2002).

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της RT-PCR

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΣΗ*	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ
FL1-f	5'-TACAACATGATGGGVAARAGAGAGA-3'	9031-9055	1084 bp
FL1-r	5'-AGCATGTCTTCYGTBGTCCATCCAYT-3'	10115-10091	
*Γονιδιακή θέση για το στέλεχος WNV (NC 001563)			

Στόχος ήταν ο εντοπισμός, σε πρώτη φάση, του συμπληρωματικού DNA του συγκεκριμένου τμήματος RNA και η ακόλουθη ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων αυτού. Στη συνέχεια η απομονωθείσα αλληλουχία θα συγκρίνονταν με άλλες καταχωρημένες στη βάση δεδομένων Genbank, κάνοντας χρήση του Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Η σύγκριση αυτή θα καθιστούσε δυνατή την ταυτοποίηση του ιού και σε περίπτωση ταύτισης του με τον Ιό του Δυτικού Νείλου, την αναγνώριση της πιθανής εξελικτικής ομάδας στην οποία ανήκει.

Απομόνωση ολικού RNA

Μετά την απόψυξη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού RNA, από ομογενοποιημένα ιστών βάρους 140μg, με τη χρήση του QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Εφαρμογή της μεθόδου αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε ένα βήμα

Η μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA και ακολούθως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen GmbH). Συγκεκριμένα για κάθε μίγμα αντίδρασης χρειάστηκαν (Πιν. 5):

- α) Απομονωθέν RNA
- β) Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM MgCl₂
- γ) Ελεύθερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια κάθε αζωτούχου βάσεως (dNTPs)
- δ) Ανασυνδυασμένη RNasin-αναστολέας ριβονουκλεασών (Promega, Madison, WI)
- ε) Εκκινητής FL1-f
- στ) Ανίστροφος εκκινητής FL1-r
- ζ) Μίγμα ενζύμων
- η) DEPC-treated water

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 25 μL.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση της RT-PCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ - ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
RNA	2,5 μ L
5X ρυθμιστικό διάλυμα (2,5 mM MgCl ₂)	5 μ L
dNTPs	0,4 mM
recombinant RNasin	10 U
Εκκινητής FL1-f	20 pmole
Ανίστροφος εκκινητής FL1-r	20 pmole
Enzyme mix	1 μ L
DEPC-treated water	14,6 μ L

Για την μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA και τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου ακολουθήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες:

- α) Αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε θερμοκρασία 50 °C για 30 λεπτά
- β) Αρχική αποδιάταξη του σχηματισθέντος DNA σε θερμοκρασία 95 °C για 15 λεπτά
- γ) Θερμική αποδιάταξη του σχηματισθέντος DNA σε θερμοκρασία 94 °C για 30 δευτερόλεπτα
- δ) Υβριδισμός των εκκινητών σε θερμοκρασία 60 °C για 30 δευτερόλεπτα
- ε) Πολυμερισμός του DNA σε θερμοκρασία 72 °C για ένα λεπτό

Ο κύκλος που αναφέρεται στα τρία τελευταία στάδια επαναλήφθηκε διαδοχικά 45 φορές.

Η όλη διαδικασία ολοκληρώθηκε με την παραμονή του μίγματος αντίδρασης για 10 λεπτά στους 72 °C με σκοπό την τελική επιμήκυνση του DNA.

Στη συνέχεια, μετά το τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση ποσότητας 18 μL προϊόντος PCR στο οποίο προστέθηκε 2 μL χρωστικής (bromophenol blue). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120 Volt για 30 λεπτά. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε γέλη αγαρόζης 1% στην οποία προστέθηκε 0,05% βρωμιούχο εθίδιο (7,5 μL/100ml).

Η αντίδραση της OneStep RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή DNA Engine της BioRad.

Για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της PCR και τη σαφέστερη απεικόνιση και κατανόηση τους, χρησιμοποιήθηκε γνωστό θετικό και αρνητικό δείγμα και δείκτης μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder).

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος του ιού του ΔN που απομονώθηκε από μια καρακάξα (*Pica pica*), η οποία συλλέχτηκε από την περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας κατά την επιδημία του ΙΔN που ξέσπασε στην Ελλάδα το καλοκαίρι του 2010 (Valiakos et al, 2011a).

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό. Η επεξεργασία του αρνητικού μάρτυρα ήταν ακριβώς η ίδια όπως για τα κλινικά δείγματα.

Τέλος, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετήθηκε σε ειδικό μηχάνημα υπεριώδους ακτινοβολίας προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA.

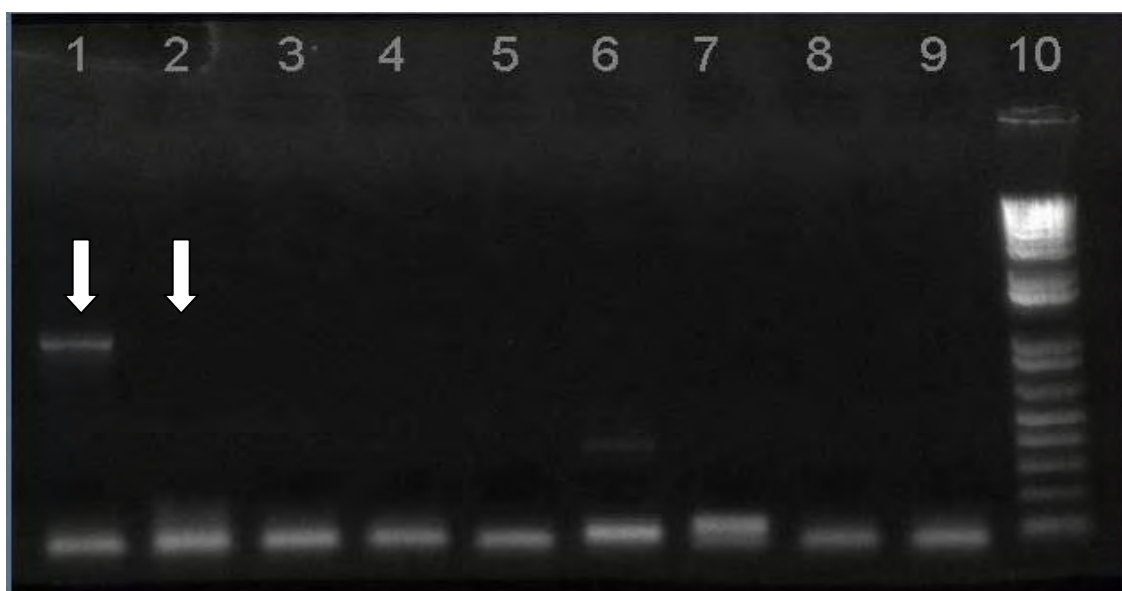
Αποτελέσματα

Σε κανένα από τα 65 δείγματα που ελέγχθησαν με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του επιλεγμένου τμήματος του γονιδιώματος των Φλαβοϊών (Πιν. 6).

Πίνακας 6: Αποτελέσματα εξέτασης των δειγμάτων με τη μέθοδο RT-PCR.

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΘΗΣΑΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ FLAVIVIRUS ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
RT-PCR	65	0

Ο θετικός μάρτυρας εμφάνισε μια ευδιάκριτη ζώνη στο αναμενόμενο, βάση του μοριακού δείκτη, μέγεθος (1084 bp), ενώ καμία ζώνη δεν εμφάνισε αντίστοιχα ο αρνητικός μάρτυρας (Εικ. 10).



Εικόνα 10: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της RT-PCR. Στη θέση 1 απεικονίζεται ο θετικός μάρτυρας και στη θέση 2 ο αρνητικός.

Συμπεράσματα-συζήτηση

Η επανεμφάνιση περιστατικών λοίμωξης ανθρώπων από τον ιό του Δυτικού Νείλου το καλοκαίρι του 2011 στην Ελλάδα, ένα χρόνο μετά την μεγάλη επιδημία του ιού που έλαβε χώρα τον Αύγουστο του 2010 στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας

και η εξάπλωση του τη δεύτερη χρονιά σε νοτιότερες περιοχές της χώρας, ανάμεσα στις οποίες και η Θεσσαλία, υποδηλώνει ότι η παρουσία του ιού έχει πλέον εδραιωθεί στην Ελλάδα και η μετάδοσή του είναι πολύ πιθανό να συνεχιστεί και στο μέλλον.

Το στέλεχος του ιού το οποίο απομονώθηκε από κουνούπια του είδους *Cx. pipiens*, κατά τη διάρκεια της επιδημίας του 2010, ανήκει στην εξελικτική ομάδα 2 και παρουσιάζει μια μετάλλαξη στη θέση 249 της πρωτεΐνης NS3 (Para et al., 2011). Ένα στέλεχος του ιού υψηλής γενετικής ομοιότητας με το προηγούμενο, απομονώθηκε από μια καρακάξα που συλλέχτηκε στην κεντρική Μακεδονία το Σεπτέμβριο του 2010, ενώ τον Ιούλιο του 2011 ένα πανομοιότυπο στέλεχος με την ίδια μετάλλαξη απομονώθηκε από μια όρνιθα στο νομό Θεσσαλονίκης (Valiakos et al., 2011a; Chaskoroulou et al., 2011). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ενεργό κυκλοφορία του ιού, τουλάχιστον στη Βόρεια Ελλάδα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα στελέχη με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού στα κορακοειδή (Brault et al., 2007). Το παραπάνω δεδομένο αποτέλεσε ένα επιπλέον κριτήριο επιλογής όσον αφορά τα είδη των πτηνών στα οποία προσπαθήσαμε να εστιάσουμε, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, με σκοπό την μοριακή ανίχνευση του ΙΔΝ.

Το γεγονός ότι ο ιός δεν εντοπίστηκε σε κανένα από τα 65 πτηνά που εξετάστηκαν με τη μέθοδο της RT-PCR, δεν έρχεται σε αντίθεση με τα επιδημιολογικά δεδομένα και την παρουσία του ιού στην περιοχή της Θεσσαλίας, όπως καταγράφηκε από την έναρξη της επιδημίας του ΙΔΝ τον Αύγουστο του 2010 και την μετέπειτα συνέχιση της εξάπλωσης του το καλοκαίρι του 2011. Η μη ανίχνευση του γενώματος ιού από τους εξετασθέντες ιστούς δεν αποκλείει παλαιότερη μόλυνση των συγκεκριμένων πτηνών από το ιό. Όπως έχει αποτυπωθεί σε παλαιότερες μελέτες, ένας ανοσοεπαρκής ξενιστής μετά τη μόλυνσή του από κάποιο Φλαβοϊό, εμφανίζει αρχικά ένα στάδιο ιαιμίας το οποίο ακολουθείται από ταχύτατη ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού και σε περίπτωση που ο ξενιστής επιβιώσει, ακολουθεί η κάθαρση του ιού από τον οργανισμό (Monath and Tsai, 2002). Στην περίπτωση του ΙΔΝ, μετά τη μόλυνση του πτηνού, ακολουθεί μια σύντομη περίοδος ιαιμίας, η διάρκεια της οποίας κυμαίνεται από 3 έως 6 ημέρες, ανάλογα με το είδος του πτηνού (Komar et al., 2003). Η αρχική μόλυνση ενεργοποιεί τόσο την επίκτητη όσο και την ειδική ανοσία

(Chambers and Diamond, 2003; Samuel and Diamond, 2006), οι οποίες είναι συνήθως αρκετές για την εξάλειψη του ιού από το αίμα, κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από τη μόλυνση. Η πλήρης κάθαρση του ιού από το σύνολο σχεδόν των περιφερικών οργάνων, επέρχεται με την πάροδο χρονικού διαστήματος δυο περίπου εβδομάδων (Diamond et al., 2003; Shrestha et al., 2004; Komar et al., 2003). Υπάρχουν όμως, πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι κάποια πτηνά μπορούν να αναπτύξουν χρόνια νεφρική μόλυνση ως αποτέλεσμα μόλυνσης από τον ιό. Σε μια μελέτη τους ο Reisen και οι συνεργάτες του το 2006 ανέφεραν ότι σε 28 (34%) από τα 82 πτηνά τα οποία είχαν μολυνθεί πειραματικά με τον ιό του Δυτικού Νείλου ανιχνεύθηκε το RNA του ιού σε ένα ή περισσότερα όργανα, με τη μέθοδο RT-PCR, ακόμη και έξι εβδομάδες μετά την αρχική τους μόλυνση. Τα όργανα των πτηνών στα οποία ανιχνεύθηκε ο ιός ήταν ο σπλήνας, οι νεφροί και οι πνεύμονες.

Αντισώματα έναντι του ιού ανιχνεύονται στον ορό των πτηνών λίγες ημέρες μετά την μόλυνση και διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Έτσι η παράλληλη ύπαρξη ορολογικών δεδομένων από τα εξετασθέντα πτηνά θα ήταν ιδιαίτερα διαφωτιστική σε περίπτωση που αυτά είχαν έρθει κάποια στιγμή σε επαφή με τον ΙΔΝ. Η αδυναμία όμως, συλλογής δειγμάτων ορού κατά τη δειγματοληψία κατέστησε αδύνατη την παράλληλη εξέταση των πτηνών για αντισώματα έναντι του ιού. Ωστόσο, ορολογικά δεδομένα από πτηνά τα οποία συλλέχθηκαν το 2011 κατά τις κυνηγετικές περιόδους 2010/2011 και 2011/2012 από τη Θεσσαλία (Ν. Λάρισας, Ν. Τρικάλων και Ν. Καρδίτσας) δείχνουν αυξημένα επίπεδα οροεπιπολασμού σε καρακάξες της περιοχής (Valiakos et al., 2011b).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι τα εξετασθέντα πτηνά τα οποία συλλέχτηκαν από την περιοχή της Θεσσαλίας κατά τις κυνηγετικές περιόδους 2009/10, 2010/11 και 2011/12, δεν είχαν ενεργή μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου και κατά την περίοδο τουλάχιστον της δειγματοληψίας τους δεν ήταν ικανά για τη μετάδοση και διασπορά του ιού.

Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, σε συνδυασμό με την ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων (sequencing), αποτελεί ένα πολύ σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για τη μοριακή διερεύνηση του ιού του Δυτικού Νείλου και μπορεί να μας δώσει σημαντικά στοιχεία για την επιδημιολογία

του ιού στη χώρα μας. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να εκτιμηθεί η γεωγραφική κατανομή ενδεχόμενων διαφορετικών στελεχών του ιού, η προέλευση της επιδημίας σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές καθώς και η δυναμική επέκτασης επιμέρους επιδημιών. Λόγω όμως της γρήγορης κάθαρσης του ιού από τον οργανισμό των πτηνών, δεν μπορεί να αποτελέσει από μόνη της επαρκή μέθοδο ελέγχου για τη διαπίστωση του επιπολασμού του ιού στον πληθυσμό των πτηνών, ειδικά στα πλαίσια μιας εξελισσόμενης επιδημίας όπως αυτή που λαμβάνει χώρα στην Ελλάδα τα τελευταία δύο χρόνια. Ο συνδυασμός του ορολογικού ελέγχου ενδημικών (κυρίως κορακοειδών) και αποδημητικών πτηνών καθώς και πτηνών-δεικτών (sentinel), με την εφαρμογή της RT-PCR, στα πλαίσια μιας παθητικής ή/και ενεργητικής επιτήρησης του ιού, μπορεί να μας δίνει κάθε χρονική στιγμή σημαντικές πληροφορίες για τον επιπολασμό του ιού στα πτηνά και παράλληλα να επιτρέπει την ανίχνευση πτηνών τα οποία παρουσιάζουν ενεργή μόλυνση κατά τη χρονική περίοδο της εξέτασής τους και είναι ικανά να μεταδίδουν και να διασπείρουν τον ιό. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα την έγκαιρη κινητοποίηση των αρμόδιων υγειονομικών και κτηνιατρικών αρχών για την ενημέρωση του κοινού και τη λήψη των απαραίτητων μέτρων πρόληψης και αντιμετώπισης στα πλαίσια ελέγχου της εξάπλωσης του ιού, με στόχο τη μείωση του κινδύνου μόλυνσης των ανθρώπων.

Βιβλιογραφία

Adams, S.C., Broom, A.K., Sammels, L.M., Hartnett, A.C., Howard, M.J., Coelen, R.J., Mackenzie, J.S, and Hall, R.A. 1995. Glycosylation and antigenic variation among Kunjin virus isolates. *Virology* 206: 49–56.

Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., and Heinz, F.X. 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* 69: 695–700.

Alpert S.G, Ferguson J, Noel LP 2003. Intrauterine West Nile virus: ocular and systemic findings. *Am J Ophthalmol* 136(4):733–5.

Asnis D.S., Conetta R., Waldman G., Teixeira A.A. 2001. The West Nile virus encephalitis outbreak in the United States (1999–2000): from Flushing, New York, to beyond its borders, *Ann. NY Acad. Sci.* 951:161–171.

Austgen LE, Bowen RA, Bunning ML, Davis BS, Mitchell CJ, Chang GJ 2004. Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 10(1):82–6.

Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, Monchetti A, Tavio M, Del Gobbo R, Capobianchi M, Menzo S, Nicoletti L, Magurano F, Varaldo P (2011): Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill*, 43:1-4.

Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 11: 225–231.

Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 12: 618–623.

Banet-Noach C, Malkinson M, Brill A, Samina I, Yadin H, Weisman Y, et al 2003. Phylogenetic relationships of West Nile viruses isolated from birds and horses in Israel from 1997 to 2001. *Virus Genes* 26(2):135–41.

Baqar S, Hayes CG, Murphy JR, Watts DM 1993. Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 48: 757-62.

Beasley D.W.C., Li L., Suderman M., Barrett A., (2002). Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype, *Virology* 296:17–23.

Beasley D.W.C., Li L., Suderman M.T., Barrett A.D., (2001). West Nile virus strains differ in mouse neuro-virulence and binding to mouse or human brain membrane receptor preparations, *Ann. NY Acad. Sci.* 951:332–335.

Beaty B.J., Calisher C.H. & Shope R.E. (1989). Arboviruses. In: *Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial infections*, Sixth Edition, Schmidt N.H. & Emmons R.W., eds. American Public Health Association, Washington DC, USA, 797–856.

Bennett, K.E., Olson, K.E., Munoz, M., de, L., Fernandez-Salas, I., Farfan-Ale, J.A., Higgs, S., Black, W.C.I., and Beaty, B.J. (2002). Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg* 67, 85–92.

Berthet, F.X., Zeller, H.G., Drouet, M.T., Raugier, J., Digoutte, J.P., and Deubel, V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol* 78 (Pt 9), 2293–2297.

Blackburn NK, Thompson DL, Jupp PG (1987). Antigenic relationship of West Nile strains by titre ratios calculated from cross-neutralization test results. *Epidemiol Infect* 99: 551– 557.

Bondre V.P., Jadi R.S., Mishra A.C., Yergolkar P.N., Arankalle V.A., 2007. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage, *J. Gen. Virol.* 88:875–884.

Botha E.M., Markotter W., Wolfaardt M., Paweska J.T., Swanepoel R., Palacios G., et al., (2008). Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains, *Emerg. Infect. Dis.* 14:222–230.

Bowen, R.A., and Nemeth, N.M. (2007). Experimental infections with West Nile virus. *Curr Opin Infect Dis* 20, 293–297.

Brinton, M.A., Fernandez, A.V., and Disposito, J.H. 1986. The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* 153: 113 – 121.

Brinton, M.A. 1986. Replication of flaviviruses. In *Togaviridae and Flaviviridae, The viruses.* (Schlesinger, S. and Schlesinger, M., eds.), Plenum, New York. 329–376.

Brault AC, Huang CY, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN(2007). A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet.* 39:1162–6.

Briese T., Jia X.Y., Huang C., Grady L.J., Lipkin W.I. 1999. Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis, *Lancet* 354:1261–1262.

Byrne, S.N., G.M. Halliday, L. J. Johnston, and N. J. King. 2001. Interleukin-1 but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J. Investig. Dermatol.* 117:702–709.

Burt F.J., Grobbelaar A.A., Leman P.A., Anthony F.S., Gibson G.V.F. & Swanepoel R. (2002). Phylogenetic relationships of Southern African West Nile virus isolates. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 820–826.

Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70 (Pt 1): 37–43.

Chambers TJ and Diamond MS (2003) Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Adv Virus Res* 60: 273–342.

Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ 2002. West Nile virus. *Lancet Infect Dis* 2(9):519–29.

Campbell G, and Lanciotti R., (2002). Laboratory-acquired West Nile virus infections, United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51(50):1133–5.

Chaskopoulou A, Dovas C, Chaintoutis S, Bouzalas I, Ara G, Papanastassopoulou M (2011) Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Euro Surveill* 16 (31). doi:19933 [pii].

Charrel RN, Brault AC, Gallian P, Lemasson JJ, Murgue B, Murri S, Pastorino B, Zeller H, de Chesse R, de Micco P, de Lamballerie, X (2003). Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology* 315: 381–388.

CDC, (1999). Outbreak of West Nile-like viral encephalitis – New York, 1999, *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 48:845–849.

Chu, J.J., and Ng, M.L. 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 78: 10543–10555.

Chu, J.J., Leong, P.W., and Ng, M. L. 2006. Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells. *Virology* 349: 463–475.

Chu, P.W., and Westaway, E.G. 1992. Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with the replication of Kunjin virus RNA. *Arch Virol* 125: 177–191.

Chu, P.W., and Westaway, E. G. 1987. Characterization of Kunjin virus RNA-dependent RNA polymerase: reinitiation of synthesis in vitro. *Virology* 157: 330–337.

Clark, L., Hall, J., McLean, R., Dunbar, M., Klenk, K., Bowen, R., and Smeraski, C.A. (2006). Susceptibility of greater sage-grouse to experimental infection with West Nile virus. *J Wildl Dis* 42, 14–22.

Cleaves, G.R., Ryan, T.E., and Schlesinger, R.W. 1981. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology* 111: 73–83.

Cleaves, G.R., and Dubin, D.T. 1979. Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology* 96: 159–165.

Danis K., Papa A., Papanikolaou E., Dougas G., Terzaki I., Baka A., Vrioni G., Kapsimali V., Tsakris A., Kansouzidou A., Tsiodras S., Vakalis N., Bonovas S., Kremastinou J. Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Euro Surveill* 2011; 16.

Dauphin, G., Zientara, S., Zeller, H., and Murgue, B. (2004). West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27, 343–355.

Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, et al 2006. West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol* 60:286Y300

Dawson JR, Stone WB, Ebel GD, Young DS, Galinski DS, Pansabene JP, Franke MA, Eidson M, Kramer LD (2007) Crow deaths caused by West Nile virus during winter. *Emerg Infect Dis* 13: 1912–1914.

Debiasi RL, Tyler KL 2006. West Nile virus meningoencephalitis. *Nat Clin Pract Neurol* 2:264Y75

DeMadrid AT, Porterfield JS (1974). The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J Gen Virol* 23: 91– 96.

Deubel V, Fiette L, Gounon P, Drouet MT, Khun H, Huerre M, Banet C, Malkinson M, Despres P (2001) Variations in biological features of WN viruses. *Ann NY Acad Sci* 951:195–206

Diamond, M.S., B. Shrestha, A. Marri, D. Mahan, and M. Engle. 2003. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J. Virol.* 77:2578–2586.

Dohm DJ, Sardelis MR, Turell MJ 2002. Experimental vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 39: 640-4.

Dokland, T., Walsh, M., Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Ee, K.H., and Wang, S. 2004. West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure* 12: 1157–1163.

Durand, JP, Simon, F, Tolou, H 2004. [West Nile virus: in France again, in humans and horses]. *Rev Prat* 54:703–710.

Eldridge, B.F. (2004). Mosquitoes, the Culicidae, in *Biology of Disease Vectors*, W.C. Marquardt, ed. (Burlington, MA: Elsevier Academic), pp. 95–111.

Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Szeredi, L., Ratz, F., Skare, J., and Bakonyi, T. 2007. Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 181–188.

Ernek E, Kozuch O, Nosek J, Teplan J, Folk C, (1977). Arboviruses in birds captured in Slovakia. *Journal of Hygiene, Epidemiology and Immunology (Prague)* 21:3539.

Fagbami A. 1978. Human arthropod-borne virus infections in Nigeria. Serological and virological investigations and Shaki, Oyo State, *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 22:184–189.

Ferenczi E, Racz G, Faludi G, Czeglédi A, Mezey I, Berencsi G (2005). Natural foci of classical and emerging viral zoonoses. In: Berencsi G, Khan AS, Halouzka J (eds) *Emerging Biological Threat*. IOS, Amsterdam, pp 43–49.

Fonseca, D.M., Keyghobadi, N., Malcolm, C.A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R.C., and Wilkerson, R.C. (2004). Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303, 1535–1538.

Fonseca, K., Prince, G.D., Bratvold, J., Fox, J.D., Pybus, M., Preksaitis, J.K., and Tilley, P. 2005. West Nile virus infection and conjunctival exposure. *Emerg Infect Dis* 11: 1648–1649.

Galli M, Bernini F, Zehender G (July 2004). “Alexander the Great and West Nile virus encephalitis”. *Emerging Infect. Dis.* 10 (7): 1330-2; author reply 1332-3.

Glavits R, Ferenczi E, Ivanics E, Bakonyi T, Mato T, Zarka P, Palya V (2005). Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. *Avian Pathol* 34: 408–414.

Goddard, L.B., Roth, A.E., Reisen, W.K., and Scott, T.W. (2002). Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 8, 1385–1391.

Goddard, L.B., Roth, A.E., Reisen, W.K., and Scott, T.W. (2003). Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *J Med Entomol* 40, 743–746.

Gould E.A (2003). Implications for Northern Europe of the emergence of West Nile virus in the USA. *Epidemiol Infect* 131(1):583–9.

Gould EA, Lamballerie X, Zanotto PM, Holmes EC (2003) Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv Virus Res* 59: 277–314

Gould LH, Fikrig E 2004. West Nile virus: a growing concern? *J Clin Invest*;113(8):1102–7.

Grun, J.B., and Brinton, M.A. 1987. Dissociation of NS5 from cell fractions containing West Nile virus-specific polymerase activity. *J Virol* 61: 3641–3644.

Gubler D.J., 2007. Emerging infections: the continuing spread of West Nile virus in the Western Hemisphere, *Clin. Infect. Dis.* 45:1039–1046.

Guthrie, AJ, Howell, PG, Gardner, IA, Swanepoel, RE, et al 2003. West Nile virus infection of Thoroughbred horses in South Africa (2000–2001). *Equine Vet J* 35:601–605.

Hall R.A., Scherret J.H., Mackenzie J.S., (2001) Kunjin virus: an Australian variant of West Nile?, *Ann. NY Acad. Sci.* 951:153–160.

Hammam HM, Clarke DH, Price WH (1965). Antigenic variation of West Nile virus in relation to geography. *Am J Epidemiol* 82: 40–55.

Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, Lanciotti RS, Hand S, Currier M, et al 2003. West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion* 43(8):1018–22.

Hayes CG., 1989. West Nile Fever. In: Monath TP, ed. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Vol 5. Boca Raton, FL: CRC Press :59–88.

Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, et al 2005a. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 11: 1174Y79

Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O’Leary DR, Campbell GL 2005b. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 11(8):1167–73.

Hayes EB, Gubler DJ 2006 . West Nile virus: Epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu Rev Med* 57:181Y94

Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton HM, Moormann RJM, Rice CM, Thiel HJ (2000) Family Flaviviridae. In: Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D, Pringle CR, Wickner RB (eds) *Virus taxonomy*. 7th Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA, pp 859–878

Heinz, F.X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S.L., Mandl, C.W., and Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 198, 109–117.

Heinz, F.X., and Allison, S.L. 2000. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res* 55: 231–269.

Higgs, S., Snow, K. & Gould, E. A. (2004). The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98, 82–87.

Hirsch, A.J., Medigeshi, G.R., Meyers, H. L., DeFilippis, V., Fruh, K., Briese, T., Lipkin, W.I., and Nelson, J.A. 2005. The Src family kinase c-Yes is required for maturation of West Nile virus particles. *J Virol* 79: 11943–11951.

Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z 1999. West Nile fever in Czechland. *Emerg Infect Dis* 5(4):594–5.

Hublek Z (2000) European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: could it be relevant for the New World? *Viral Immunol* 13:415–426

Hublek Z, Halouzka J (1999) West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5:643–650.

Huhn GD, Austin C, Langkop C, et al 2005. The emergence of West Nile virus during a large outbreak in Illinois in 2002. *Am J Trop Med Hyg* 72:768Y76

Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, et al 2003. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 348(22):2196–203.

Johnson D.J., Ostlund E.N., Pedersen D.D. & Schmitt B.J. (2001). Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 739–741.

Jones, C.T., Ma, L., Burgner, J.W., Groesch, T.D., Post, C.B., and Kuhn, R.J. 2003. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* 77: 7143–7149.

KEELPNO, (2010). Daily Epidemiological Surveillance Report of cases of West Nile virus infection in Greece, 26 August 2010. [cited 27 August 2010]. Available from: http://www.keelpno.gr/keelpno/2010/id990/daily_report_20100826_en.pdf

Khromykh, A.A., Sedlak, P.L., and Westaway, E.G. 1999. trans-Complementation analysis of the flavivirus Kunjin ns5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. *J Virol* 73: 9247–9255.

Khromykh, A.A., Varnavski, A.N., Sedlak, P.L., and Westaway, E.G. 2001. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol* 75: 4633–4640.

Kiermayr, S., Kofler, R.M., Mandl, C.W., Messner, P., and Heinz, F.X. 2004. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J Virol* 78: 8078–8084.

Kipp, A.M., Lehman, J.A., Bowen, R.A., Fox, P.E., Stephens, M.R., Klenk, K., Komar, N., and Bunning, M.L. (2006). West Nile virus quantification in feces of experimentally infected American and fish crows. *Am J Trop Med Hyg* 75, 688–690.

Klenk, K., Snow, J., Morgan, K., Bowen, R., Stephens, M., Foster, F., Gordy, P., Beckett, S., Komar, N., Gubler, D., and Bunning, M. (2004). Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis* 10, 2150–2155.

Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., and Bunning, M. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 9, 311–322.

Komar O, Robbins MB, Klenk K, Blitvich BJ, Marlenee NL, Burkhalter KL, et al 2003. West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* 9(10):1299–302.

Kramer LD, Styer LM, Ebel GD, (2008). A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol.* 53:61-81.

Kramer, L.D., and Ebel, G.D. (2003). Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res* 60, 187–232.

Krisztalovics K., Ferenczi E., Molnar Z., Csohan A., Ban E., Zoldi V., Kaszas K. 2008. West Nile virus infections in Hungary, August–September 2008, *Euro Surveill.* 13:pii: 19030.

Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., et-al. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717–725.

Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 72: 73– 83.

LaDeau, S.L., Kilpatrick, A.M., and Marra, P.P. (2007). West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* 447, 710–713.

Lanciotti R.S., Kerst A.J., Nasci R.S., Godsey M.S., Mitchell C.J., Savage H.M., Komar N., Panella N.A., Allen B.C., Volpe K.E., Davis B.S. & Roehrig J.T. (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4066–4071.

Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD, Roehrig JT (2002) Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the middle East. *Virology* 298: 96–105.

Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall R, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J,

Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ (1999) Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286: 2333–2337

Lawrie CH, Uzcategui NY, Gould EA, Nuttall PA 2004. Ixodid and argasid tick species and West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* 10:653–7.

Lee T, Komiya T, Watanabe K, Aizawa C, Hashimoto H 1995. Immune response in mice infected with the attenuated Japanese encephalitis vaccine strain SA14-14-2. *Acta Virol* 39(3):161–4.

Lichtensteiger CA, Heinz-Taheny K, Osborne TS, Novak RJ, Lewis BA, Firth ML (2003) West Nile virus encephalitis and myocarditis in wolf and dog. *Emerg Infect Dis* 9:1303–1306

Lindenbach, B.D., Thiel, H.J., and Rice, C.M. 2007. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. Pp. 1101 – 1152 in D. M. Knipe, and Howley, P.M., ed. *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Lobigs M, Arthur CE, Mullbacher A, Blanden RV 1994. The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology* 202(1):195–201.

Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, Aristova VA, Dzharkenov AF, Samokhvalov EI, Savage HM, Shchelkanov MY, Galkina IV, Deryabin PG, Gubler DJ, Kulikova LN, Alkhovsky SK, Moskvina TM, Zlobina LV, Sadykova GK, Shatalov AG, Lvov DN, Usachev VE, Voronina AG (2004). West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol Suppl* 18: 85–96.

Ma, L., Jones, C.T., Groesch, T.D., Kuhn, R. J., and Post, C.B. 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3414–3419.

Mackenzie, J.M., Kenney, M.T., and Westaway, E.G. 2007. West Nile virus strain Kunjin NS5 polymerase is a phosphoprotein localized at the cytoplasmic site of viral RNA synthesis. *J Gen Virol* 88: 1163–1168.

Mackenzie JS, Williams DT (2009). The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health*. 56:338–56.

MacKenzie JS, Lindsay MD, Coelen RJ, Broom AK, Hall RA, Smith DW (1994) Arboviruses causing human disease in the Australasian zoogeographic region. *Arch Virol* 136:447–467

Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M.T., and Deubel, V. 2002. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 8: 392–397.

Mason, P.W. 1989. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 169: 354–364.

Matveeva VA, Popova RV, Kvetkova EA, Chernicina LO, Zlobin VI, Puchovskaya NM, et al 1995. Antibodies against tick-borne encephalitis virus (TBEV) non-structural and structural proteins in human sera and spinal fluid. *Immunol Lett* 46(1–2):1–4.

Miller, B.R., Nasci, R.S., Godsey, M.S., Savage, H.M., Lutwama, J.J., Lanciotti, R.S., and Peters, C.J. (2000). First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 62, 240–246.

Miller DL, Mael MJ, Baldwin C, Burtle C, Burtle G, Ingram D, Hines ME II, Frazier KS (2003) West Nile virus in farmed alligators. *Emerg Infect Dis* 9:794–799

Monath TP and Tsai TF (2002). Flaviviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Haydan FG (eds) *Clinical virology*, 2nd edn. ASM Press, Washington, pp 1097–1151.

Morales M.A., Barrandeguy M., Fabbri C., Garcia J.B., Vissani A., Trono K., Gutierrez G., Pigretti S., Menchaca H., Garrido N., Taylor N., Fernandez F., Levis S. & Enria D. (2006). West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1559–1561.

Mukhopadhyay, S., Kim, B.S., Chipman, P.R., Rossmann, M.G., and Kuhn, R.J. (2003). Structure of West Nile virus. *Science* 302, 248.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3: 13–22.

Murgue, B., Zeller, H., and Deubel, V. 2002. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol* 267: 195–221

Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J.P., and Zeller, H. 2001. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 7: 692–696.

Murphy, F.A., C.M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers. 1995. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol.* 10(Suppl.):1±586.

Murray, J.M., Aaskov, J.G., and Wright, P.J. 1993. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol* 74 (Pt 2): 175–182.

Nasci, R.S., Savage, H.M., White, D.J., Miller, J.R., Cropp, B.C., Godsey, M.S., Kerst, A.J., Bennett, P., Gottfried, K., and Lanciotti, R.S. (2001). West Nile virus in overwintering culex mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* 7, 742.

Nemeth, N., Gould, D., Bowen, R., and Komar, N. (2006). Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J Wildl Dis* 42, 1–13.

Nielsen, CF, Reisen, WK, Armijos, MV, Maclachlan, NJ, et al 2008. High subclinical West Nile virus incidence among non-vaccinated horses in northern

California associated with low vector abundance and infection. *Am J Trop Med Hyg* 78:45–52.

Nir, Y.D. 1959. Airborne West Nile virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 8: 537–539.

Nowak, T., Farber, P.M., Wengler, G., and Wengler, G. 1989. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169: 365 – 376.

Nowak, T., and Wengler, G. 1987. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology* 156: 127–137.

O’Leary, D.R., Marfin, A.A., Montgomery, S.P. , Kipp, A. M., Lehman, J.A., Biggerstaff, B.J., Elko, V.L., Collins, P.D., Jones, J.E., and Campbell, G.L. 2004. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4: 61–70.

Orlinger, K.K., Hoenninger, V.M., Kofler, R.M., and Mandl, C.W. 2006. Construction and mutagenesis of an artificial bicistronic tick-borne encephalitis virus genome reveals an essential function of the second transmembrane region of protein e in flavivirus assembly. *J Virol* 80: 12197–12208.

Ostlund E.N., Andresen J.E. & Andresen M. (2000). West Nile encephalitis. *Vet. Clin. North Am., Equine Pract.*, 16, 427–441.

Ostlund E.N., Crom R.L., Pedersen D.D., Johnson D.J., Williams W.O. & Schmitt B.J. (2001). Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 665–669.

Owen J, Moore F, Panella N, Edwards E, Bru R, Hughes M, Komar N. (2006). Migrating birds as dispersal vehicles for West Nile virus. *Ecohealth* 3: 79–85

Panella, N.A., Kerst, A.J., Lanciotti, R.S., Bryant, P., Wolf, B., Komar, N. (2001). Comparative West Nile virus detection in organs of naturally infected American crows (*Corvus brachyrhynchos*) *Emerg. Infect. Dis.* 7, 754-755.

Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S (2011). Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect* 17:1176–80.

Pealer, L.N., Marfin, A.A., Petersen, L.R., Lanciotti, R.S., Page, P.L., Stramer, S.L., Stobierski, M.G., Signs, K., Newman, B., Kapoor, H., Goodman, J.L., and Chamberland, M.E. (2003). Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med* 349, 1236–1245.

Petersen L.R, Marfin AA, Gubler DJ 2003. West Nile virus. *JAMA* 290: 524Y28

Petersen L.R., Roehrig J.T., (2001). West Nile virus: a reemerging global pathogen, *Emerg. Infect. Dis.* 7:611–614.

Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI (2008). Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitology Research.* 103 (Suppl 1):S45-53.

Poidinger, M., Hall, R.A., and Mackenzie, J.S. 1996. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology* 218: 417–421.

Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z (2000) Migratory birds and the spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Emerg Infect Dis* 6:319–328.

Rappole J.H., Hubalek Z., 2003. Migratory birds and West Nile virus, *J. Appl. Microbiol.* 94 Suppl:47S–58S.

Reisen, W., and Brault, A.C. (2007). West Nile virus in North America: Perspectives on epidemiology and intervention. *Pest Manage Sci* 63, 641–646.

Reisen, W.K., Fang, Y., and Martinez, V.M. (2005). Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol* 42, 367–375.

Reisen WK, Fang Y, Lothrop HD, Martinez VM, Wilson J, O'Connor P, Carney R, Cahoon-Young B, Shafii M, Brault AC (2006). Overwintering of West Nile virus in southern California. *J Med Entomol* 43: 344–355.

Reisen, W.K., Kramer, L.D., Chiles, R.E., Wolfe, T.M., and Green, E.-G.N. (2002). Simulated overwintering of encephalitis viruses in diapausing female *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 39, 226233.

Ribeiro, J.M.C., Charlab, R., Pham, V.M., Garfield, M.K., and Valenzuela, J.G. (2004). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 543–563.

Ribeiro, J.M.C., and Francischetti, I.M.B. (2003). Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-Sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48, 73–88.

Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., and Strauss, J.H. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229: 726–733.

Rizzo, C, Vescio, F, Declich, S, Finarelli, AC, et al. West Nile Virus transmission with human cases in Italy, August–September 2009. *Euro Surveill* 2009; 14 (pii: 19353).

Rossini, G., F. Cavrini, A. Pierro, P. Macini, A. Finarelli, C.Po, G. Peroni, A. Di Caro, M. Capobianchi, L. Nicoletti, M. Landini, and V. Sambri, 2008: First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 –case report. *Euro Surveill.* 13, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18926106 (last accessed on 10 September 2009).

Sampson BA, Ambrosi C, Charlot A, Reiber K, Veress JF, Armbrustmacher V (2000) The pathology of human West Nile virus infection. *Human Pathol* 31:527–531

Samuel, M.A., Morrey, J.D., and Diamond, M.S. (2007). Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. *J Virol* 81, 2614–2623.

Samuel MA and Diamond MS (2006) Pathogenesis of West Nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evolution. *J Virol* 80: 9349–9360.

Sardelis, M.R., Turell, M.J., Dohm, D.J., and O’Guinn, M.L. (2001). Vector competence of selected North American culex and Coquillettidia mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 7, 1018–1022.

Sbrana E, Tonry JH, Xiao SY, da Rosa AP, Higgs S, Tesh RB 2005. Oral transmission of West Nile virus in a hamster model. *Am J Trop Med Hyg* 72(3):325–9.

Scherret, J.H., Poidinger, M., Mackenzie, J.S., Broom, A.K., Deubel, V., Lipkin, W.I., Briese, T., Gould, E.A., and Hall, R.A. 2001. The relationships between West Nile and Kunjin viruses. *Emerg Infect Dis* 7: 697–705

Scherret JH, Mackenzie JS, Hall RA, Deubel V, Gould EA 2002. Phylogeny and molecular epidemiology of West Nile and Kunjin viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 267:373–90.

Schuffenecker I, Peyrefitte CN, el Harrak M, Murri S, Leblond A, Zeller HG, (2005). West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis*. 11:306–9.

Schuler, LA, Khaitsa, ML, Dyer, NW, Stoltenow, CL 2004. Evaluation of an outbreak of West Nile virus infection in horses: 569 cases (2002). *J Am Vet Med Assoc* 225:1084–1089.

Sejvar, J.J. (2007). The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clin Infect Dis* 44, 1617–1624.

Shrestha, B., and M.S. Diamond. 2004. Role of CD8⁺ T cells in control of West Nile virus infection. *J. Virol.* 78:8312–8321.

Shurtleff, A. C., Beasley, D. W., Chen, J. J., Ni, H., Suderman, M. T., Wang, H., Xu, R., Wang, E., Weaver, S. C., Watts, D. M., Russell, K. L., and Barrett, A. D. 2001. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology* 281:75–87.

Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Vazquez A, Tenorio A, Rebreanu R, Niedrig M, Nicolescu G, Pistol A (2011): Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill*, 2:1-5.

Smithburn K.C., Hughs T.P., Burke A.W., Paul J.H. 1940 A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20:471–492.

Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J., and Heinz, F.X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71, 8475 – 8481.

Steele K.E., Linn M.J., Schoepp R.J., Komar N., Geisbert T.W., Manduca R.M., Calle P.P., Raphael B.L., Clippinger T.L., Larsen T., Smith J., Lanciotti R.S., Panella N.A. & McNamara T.S. (2000). Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet. Pathol.*, 37, 208–224.

Taylor R., Work T., Hurlbut H., Risk F. 1956. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5:579–620.

Titus, R.G., Bishop, J.V., and Mejia, J.S. (2006). The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* 28, 131–141.

Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI 1998. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352(9130):767–71.

Turell, M.J., Dohm, D.J., Sardelis, M.R., O’Guinn, M.L., Andreadis, T.G., and Blow, J.A. (2005). An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J Med Entomol* 42, 57–62.

Turell, M.J., O’Guinn, M.L., Dohm, D.J., and Jones, J.W. (2001). Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 38, 130–134.

Tyler, K.L., Pape, J., Goody, R.J., Corkill, M., and Kleinschmidt-Demasters, B.K. (2006). CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus meningitis and encephalitis. *Neurology* 66, 361–365.

Tyler K.L. 2004. West Nile virus infection in the United States. *Arch Neurol* 61:1190Y95

Vaidyanathan, R., and Scott, T.W. (2007). Geographic variation in vector competence for West Nile virus in the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) complex in California . *Vector Borne Zoonotic Dis* 7, 193–198.

Valiakos G, Touloudi A, Iacovakis C, Athanasiou L, Birtsas P, Spyrou V, Billinis C (2011a) Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Euro Surveill* 16 (18). doi:19862 [pii].

Valiakos G., Touloudi A., Athanasiou L.V., Giannakopoulos A., Iacovakis C., Birtsas P., Spyrou V., Dalabiras Z., Petrovska L., Billinis C. (2011b). *Exposure of Eurasian magpies and turtle doves to West Nile virus during a major human outbreak, Greece, 2011*; *European Journal of Wildlife Research*, 23 December 2011, DOI: 10.1007/s10344-011-0603-1.

Varelas-Wesley I, Calisher CH (1982). Antigenic relationships of flaviviruses with undetermined arthropod-borne status. *Am J Trop Med Hyg* 31: 1273–1284.

Vazquez A., Sanchez-Seco M.P., Ruiz S., Molero F., Hernandez L., Moreno J., Magallanes A., Tejedor C.G., Tenorio A. Putative new lineage of west nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 549-552.

Venter M, Human S, Zaayman D, Gerdes GH, Williams J, Steyl J, et al 2009. Lineage 2 west nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. *Emerg Infect Dis* 15(6):877-84.

Wang J.J., Liao C.L., Chiou Y.W., Chiou C.T., Huang Y.L., Chen L.K., (1997). Ultrastructure and localization of E proteins in cultured neuron cells infected with Japanese encephalitis virus, *Virology* 238:30–39.

Ward, MP, Levy, M, Thacker, HL, Ash, M, et al 2004 . Investigation of an outbreak of encephalomyelitis caused by West Nile virus in 136 horses. *J Am Vet Med Assoc* 225:84–89.

Ward, MP, Schuermann, JA, Highfield, LD, Murray, K 2006. Characteristics of an outbreak 255 of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet Microbiol* 118:225–229.

Weingartl, H.M., Neufeld, J.L., Copps, J., and Marszal, P. (2004). Experimental West Nile virus infection in blue jays (*Cyanocitta cristata*) and crows (*Corvus brachyrhynchos*). *Vet Pathol* 41, 362–370.

Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N, (2002). Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 8(7):652-6.

Westaway, E.G., Khromykh, A.A., and Mackenzie, J.M. 1999. Nascent flavivirus RNA colocalized in situ with double-stranded RNA in stable replication complexes. *Virology* 258: 108–117.

Wunschmann, A., Shivers, J., Carroll, L., and Bender, J. (2004). Pathological and immunohistochemical findings in American crows (*Corvus brachyrhynchos*) naturally infected with West Nile virus. *J Vet Diagn Invest* 16, 329–333.

Zeller H, Zientara S, Hars J, Languille J, Mailles A, Tolou H, et al. (2004). West Nile outbreak in horses in southern France: September 2004. *Eurosurveillance Weekly*. 8:Oct 7, 2004.

Zeller HG., 1999. West Nile virus: a migrating arbovirus of current interest [French]. *Med Trop (Mars)* 59:490–4.

Zeller HG, Schuffenecker I, (2004). West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23:147–56.

Zhang, Y., Corve , J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D., Baker, T.S., Strauss, J.H., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* 22, 2604–2613.

Zhang, Y., Kaufmann, B., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2007). Structure of immature West Nile virus. *J Virol* 81, 6141–6145.

Zhang, W., Chipman, P.R., Corver, J., Johnson, P.R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T.S., Strauss, J.H., Rossmann, M.G., and Kuhn, R.J. (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* 10: 907–912.