



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ**

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ**

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ: 2022 – 2024

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«Μοριακή ανίχνευση του ιού Usutu σε ομάδες (pools) κοινών κουνουπιών
του γένους *Culex pipiens* από την Ελλάδα, 2020-2023»**



Αναστασία Παναγοπούλου

Αριθμός Μητρώου: mdy22113

**Επιβλέπουσα: Ελένη Πατσουλά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Παρασιτολογίας και Εντομολογίας Δημόσιας Υγείας**

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2024



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF PUBLIC HEALTH
DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH
POLICY**

**POSTGRADUATE PROGRAM IN PUBLIC HEALTH (MSc)
SPECIALISATION: INFECTIOUS DISEASES – PUBLIC HEALTH
LABORATORIES**

ACADEMIC YEAR: 2022 – 2024

Master Thesis

**«Molecular detection of Usutu virus in pools of common mosquitoes of
the genus *Culex pipiens* from Greece, 2020-2023»**



Anastasia Panagopoulou

Registration Number: mdy22113

**Supervisor: Eleni Patsoula, Associate Professor of Public Health
Parasitology and Entomology**

Athens, September 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ: 2022 – 2024

«Μοριακή ανίχνευση του ιού Usutu σε ομάδες (pools) κοινών κουνουπιών του γένους *Culex pipiens* από την Ελλάδα, 2020-2023»

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική επιτροπή:

A/a	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΠΑΤΣΟΥΛΑ ΕΛΕΝΗ	ΑΝ.ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΜΔΕ, ΜΕΛΟΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	
2	ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ/ ΜΕΛΟΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	
3	ΤΕΓΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ	ΕΔΙΠ/ΜΕΛΟΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Αναστασία Παναγοπούλου του Χρήστου, με αριθμό μητρώου mdy22113 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

*Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα



Copyright © , Αναστασία Παναγοπούλου, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η έγκρισή της δεν υποδηλώνει απαραίτητα και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας.

Βεβαιώνω ότι η παρούσα Διπλωματική Εργασία είναι αποτέλεσμα προσωπικής μου εργασίας και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές που αναφέρω έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά όπου απαιτείται και έχω παραθέσει τις πηγές τους στο σχετικό τμήμα της βιβλιογραφίας. Υπογραφή:



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός Usutu (USUV) είναι ένας αρμποϊός που σχετίζεται στενά με τον ενδημικό στην Ελλάδα ιό του Δυτικού Νείλου (WNV). Είναι μέλος της οικογένειας των Flaviviridae, που ανήκει στο σύμπλεγμα ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας. Από τότε που έγινε η αρχική εμφάνιση του USUV στην Ευρώπη, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες σχετικά με την κυκλοφορία του. Στη φύση, ο κύκλος μετάδοσής του περιλαμβάνει κουνούπια, κυρίως του γένους *Culex* και άγρια πτηνά που λειτουργούν ως δεξαμενές για τον ιϊκό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, ο USUV έχει απομονωθεί από ανθρώπους, άλογα και λοιπά θηλαστικά. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα που αποκαλύπτει την παρουσία και την κυκλοφορία του USUV σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό κουνουπιών. Πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος, εφαρμόζοντας μια ευαίσθητη και ειδική μεθοδολογία PCR αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου ανάγνωσης (real-time RT-PCR) σε 1.500 δείγματα RNA που απομονώθηκαν από ομάδες (pools) κουνουπιών *Culex pipiens*. Κάθε ομάδα περιείχε από 2 - 100 ενήλικα θηλυκά κουνούπια που συλλέχθηκαν τη χρονική περίοδο 2020 – 2023, από τις περιοχές της Αττικής, της Θεσσαλίας και της Κεντρικής Μακεδονίας. Από τα 1.500 δείγματα, η παρουσία USUV ανιχνεύθηκε σε τέσσερα δείγματα, ένα από το έτος 2022 και τα άλλα τρία από το έτος 2020. Τα αποτελέσματα της RT-PCR επαληθεύτηκαν περαιτέρω με συμβατική PCR και επιβεβαιώθηκαν με την αλληλούχιση κατά Sanger. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν τη συν-κυκλοφορία του USUV και του WNV στην Ελλάδα, σε περιοχές με ετήσια καταγραφή σημαντικού αριθμού κρουσμάτων WNV σε ανθρώπους. Αρκετές μελέτες έχουν αποκαλύψει τη συν-κυκλοφορία των δύο ιών, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, καθώς ένα από τα τέσσερα θετικά pools για USUV ήταν επίσης θετικό για WNV. Τα προκαταρκτικά μας ευρήματα υποδεικνύουν την ανάγκη διενέργειας περαιτέρω μελετών και ερευνών στον τομέα του USUV στην Ελλάδα, τόσο σε κουνούπια, όσο και σε ανθρώπους και λοιπούς ξενιστές. Μια προσέγγιση Ενιαίας Υγείας θα μπορούσε να βελτιώσει την παρακολούθηση της εξάπλωσής του στην Ευρώπη και να βοηθήσει τις αρχές δημόσιας υγείας να εφαρμόσουν περαιτέρω στοχευμένα μέτρα επιτήρησης και ελέγχου.

Λέξεις κλειδιά: φλαβοϊός, USUV, *Culex pipiens*, κλιματική αλλαγή, Ελλάδα

ABSTRACT

Usutu virus (USUV) is an arbovirus closely related to endemic in Greece West Nile virus (WNV). It is a member of the Flaviviridae family, which belongs to the Japanese encephalitis complex. Since USUV emergence in Europe, a number of studies, regarding its circulation have been conducted. In nature, its transmission cycle involves mosquitoes, mainly of the *Culex* genus, and wild birds acting as reservoirs for viral proliferation. Moreover, USUV has been isolated from humans, horses and other mammals. This is the first study performed in Greece revealing the presence and circulation of USUV in a specific mosquito population. Molecular screening was performed, implementing a sensitive and specific reverse transcription real-time PCR (real-time RT-PCR) protocol in 1,500 RNA samples isolated from *Culex pipiens* mosquito pools. Each pool contained from 2 - 100 adult female mosquitoes collected for the time-period 2020 – 2023, from the regions of Attica, Thessaly and Central Macedonia. Out of the 1,500 samples, the presence of USUV was detected in four samples, one from the year 2022 and the other three from 2020. The RT-PCR results have been further verified by conventional PCR and confirmed by Sanger Sequencing. These findings indicate the co-circulation of USUV along with WNV in Greece, in areas with a significant number of WNV human cases recorded on an annual basis. Several studies have revealed co-circulation of the two viruses, consistent with the present study, since one out of the four USUV positive pools was also found positive for WNV. Our preliminary findings highlight the need for further studies and research in the field of USUV in Greece, both in mosquitoes, humans and other hosts. A One Health approach could improve the monitoring of its spread in Europe and assist public health authorities to implement further targeted surveillance and control measures.

Key words: flavivirus; USUV; *Culex pipiens*; climate change; Greece

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	I
ABSTRACT	II
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	V
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	VI
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	VIII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
1. Κουνούπια.....	5
1.1 Γενικά.....	5
1.2 Βιολογικός κύκλος	6
1.3 Διατροφικές συνήθειες	8
1.4 Κουνούπια και ασθένειες.....	9
1.5 Κλιματική αλλαγή και κουνούπια	17
1.6 Τρόποι καταπολέμησης	22
2. <i>Culex pipiens</i>	24
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	24
2.2 Γεωγραφική κατανομή.....	25
2.3 <i>Culex pipiens</i> και Ασθένειες	27
3. Ιός Usutu.....	31
3.1 Γενικά.....	31
3.2 Ξενιστές – Διαβιβαστές του ιού Usutu	32
3.3 Γονιδίωμα	34
3.4 Βιολογικός κύκλος	35
3.5 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά	36
3.6 Επιδημιολογικά δεδομένα	38
3.7 Συν-κυκλοφορία του ιού Usutu και του ιού του Δυτικού Νείλου	41
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	44
4. ΣΚΟΠΟΣ.....	45
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46
5.1 Δείγματα και περιοχή μελέτης	46
5.2 Απομόνωση RNA	47
5.3 Real-time RT-PCR.....	48
5.4 Δημιουργία cDNA	50
5.5 Συμβατική PCR	51
5.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης	52
5.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR	52

5.8	Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	53
6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
7.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	63
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1 Είδη κουνουπιών που έχουν βρεθεί μολυσμένα με τον USUV	33
Πίνακας 5.1 Χρονιές και περιοχές συλλογής των δειγμάτων	47
Πίνακας 5.2 Αναλογίες αριθμού κουνουπιών, PBS και μεταλλικών σφαιριδίων	48
Πίνακας 5.3 Αλληλουχία των εκκινητών και του ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκαν	49
Πίνακας 5.4 Όγκος αντιδραστηρίων για την real-time RT-PCR	49
Πίνακας 5.5 Αντιδραστήρια 1ου σταδίου παραγωγής cDNA	50
Πίνακας 5.6 Αντιδραστήρια 2ου σταδίου παραγωγής cDNA	50
Πίνακας 5.7 Αλληλουχία εκκινητών για τη συμβατική PCR	51
Πίνακας 5.8 Όγκος αντιδραστηρίων συμβατικής PCR	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Εξωτερική μορφολογία κουνουπιού	5
Εικόνα 1.2 Ο βιολογικός κύκλος του κουνουπιού	8
Εικόνα 1.3 Φυσιολογικές διαδικασίες που διενεργούνται κατά τη διάρκεια ενός τσιμπήματος	9
Εικόνα 1.4 Χάρτης επίπτωσης ελονοσίας σε χώρες ανά τον κόσμο για το 2021	12
Εικόνα 1.5 Χάρτης επίπτωσης δάγκειου πυρετού για το 2021	14
Εικόνα 1.6 Κύκλοι μετάδοσης του κίτρινου πυρετού	15
Εικόνα 1.7 Διακύμανση της ανώτερης, μέσης και κατώτερης θερμοκρασίας του πλανήτη από το 1850 μέχρι σήμερα	18
Εικόνα 1.8 Χάρτης με τα χωροκατακτητικά είδη <i>Aedes</i> στην Ευρώπη	21
Εικόνα 2.1 Βιολογικός κύκλος των ειδών <i>Culex</i>	25
Εικόνα 2.2 Γεωγραφική κατανομή του <i>Culex pipiens</i> στον ευρωπαϊκό χώρο από το 2020 έως και το 2023	26
Εικόνα 2.3 Χάρτης της Ευρώπης με τα ανθρώπινα κρούσματα λοίμωξης από WNV το 2023	29
Εικόνα 3.1 Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις σχέσεις μεταξύ διαφορετικών φλαβοϊών ...	32
Εικόνα 3.2 (Α) Δομή του ιού (Β) Δομή της πολυπρωτεΐνης που κωδικοποιεί το RNA του USUV	35
Εικόνα 3.3 Βιολογικός κύκλος ενός φλαβοϊού	36
Εικόνα 3.4 Χάρτης όπου φαίνονται κρούσματα του ιού Usutu σε ανθρώπους, κουνούπια και πτηνά, όπως επίσης και το στέλεχος του ιού	37
Εικόνα 3.5 Γεωγραφική εξάπλωση του USUV σε χώρες της Ευρώπης	39
Εικόνα 3.6 Χάρτης στον οποίο φαίνονται οι χώρες που έχει εντοπιστεί ο ιός σε Αφρική και Ευρώπη	40
Εικόνα 3.7 Γεωγραφική κατανομή του WNV (με πράσινο χρώμα) και του USUV (με κόκκινο χρώμα) στην Ευρώπη	42
Εικόνα 5.1 Χάρτης σημείων που απεικονίζει τις περιοχές των δειγματοληψιών	46
Εικόνα 6.1 Διαγραμματική απεικόνιση των θετικών δειγμάτων για USUV. (Α) Καμπύλες των θετικών δειγμάτων από το 2020 (κωδικός χρωμάτων Β, κίτρινη καμπύλη, C, πράσινη καμπύλη και F, μπλε καμπύλη) σε σύγκριση με τον θετικό (κωδικός χρώματος G, μωβ καμπύλη) και τον αρνητικό μάρτυρα (κωδικός χρώματος G, μωβ ευθεία γραμμή). (Β) Καμπύλη θετικού δείγματος από το 2022 (κωδικός χρώματος C, πράσινη καμπύλη) σε σύγκριση με τον θετικό (κωδικός χρώματος H, φούξια καμπύλη) και τον αρνητικό μάρτυρα (κωδικός χρώματος H, φούξια ευθεία γραμμή)	55
Εικόνα 6.2 Διαγραμματική απεικόνιση δείγματος που δεν αξιολογήθηκε (κωδικός χρώματος C, πράσινη καμπύλη) συγκριτικά με τον θετικό (κωδικός χρώματος G, μωβ καμπύλη) και τον αρνητικό μάρτυρα (κωδικός χρώματος G, μωβ ευθεία γραμμή)	56
Εικόνα 6.3 Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της συμβατικής PCR..	57

Εικόνα 6.4 Ενδεικτική εικόνα τμήματος χρωματογραφήματος, αποτέλεσμα αλληλούχισης στο οποίο διαφαίνονται ξεχωριστές χρωματιστές κορυφές για κάθε νουκλεοτιδική βάση	58
Εικόνα 6.5 Ενδεικτική εικόνα τμήματος χρωματογραφήματος, αποτέλεσμα αλληλούχισης στο οποίο φαίνονται ξεχωριστές χρωματιστές κορυφές για κάθε νουκλεοτιδική βάση	59
Εικόνα 6.6 Αρχείο κατατεθειμένης αλληλουχίας στην GenBank του θετικού δείγματος για USUV που συλλέχθηκε το Σεπτέμβριο του 2022	60
Εικόνα 6.7 Αρχείο κατατεθειμένης αλληλουχίας στην GenBank του θετικού δείγματος για USUV που συλλέχθηκε το Σεπτέμβριο του 2020	61
Εικόνα 6.8 Αρχείο κατατεθειμένης αλληλουχίας στην GenBank του θετικού δείγματος για USUV που συλλέχθηκε τον Αύγουστο του 2020	62

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΟΥ = Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

CDC = Centers for Disease Control and Prevention

ECDC = European Centre for Disease prevention and Control

WNV = West Nile Virus

JEV = Japanese Encephalitis Virus

ORF = Open Reading Frame

ΕΟΔΥ = Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας

USUV = Usutu Virus

PCR = Polymerase Chain Reaction

SLEV = Saint Louis Encephalitis Virus

DENV = Dengue Virus

CHIKV = Chikungunya Virus

YFV = Yellow Fever Virus

ZIKV = Zika Virus

RVFV = Rift Valley Fever Virus

SLEV = Saint Louis Encephalitis Virus

DF = Dengue Fever

DHF = Dengue Hemorrhagic Fever

DSS = Dengue Shock Syndrome

SIT = Sterile Insect Technique

RIDL = Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene

WNF = West Nile Fever

WNND = West Nile Neuroinvasive Disease

ΚΕΕΛΠΝΟ = Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Λοιμωδών Νοσημάτων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ασθένειες που σχετίζονται με διαβιβαστές αποτελούν αδιαμφισβήτητα μία ανερχόμενη απειλή για τον σύγχρονο κόσμο. Η παγκοσμιοποίηση, η ικανότητα μετακίνησης των ανθρώπων σε οποιοδήποτε σημείο του πλανήτη, η κλιματική αλλαγή καθώς και ο ολοένα αυξανόμενος πληθυσμός συμβάλλουν σημαντικά στην εξάπλωση των νόσων αυτών (1). Ο ιός Usutu είναι ένας φλαβοϊός που υπάγεται σε αυτή την κατηγορία των αναδυόμενων ασθενειών (1). Ανήκει στο σύμπλεγμα ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, μαζί με τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV) και έχει ως γονιδίωμα ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA (2). Φυσιολογικά ο κύκλος μετάδοσής του περιλαμβάνει κουνούπια, κυρίως του γένους *Culex* και άγρια πτηνά τα οποία λειτουργούν ως δεξαμενές πολλαπλασιασμού του (3), αλλά έχει επίσης ανιχνευθεί σε ανθρώπους, άλογα και λοιπά θηλαστικά (2). Ορολογικές μελέτες δείχνουν πως ο φυσικός ξενιστής και δεξαμενή του ιού είναι τα πτηνά, προκαλώντας συνήθως σοβαρή παθογένεια, ενώ έχουν βρεθεί και άλλοι ξενιστές, όπως άλογα, σκύλοι, ελάφια, αγριογούρουνα και άνθρωποι (4). Πρώτη φορά περιεγράφηκε το 1959 στη Νότια Αφρική όπου και θεωρήθηκε ενδημικός (5). Το 1996 όμως έγινε η πρώτη διαπίστωση εμφάνισής του στον ευρωπαϊκό χώρο, συγκεκριμένα στην Ιταλία, σε μια αναδρομική μελέτη που περιλάμβανε δείγματα ιστών από πεθαμένα πουλιά (5). Μαζική έξαρση του ιού παρατηρήθηκε το 2001 στη Βιέννη, στην Αυστρία, με τον θάνατο μεγάλου αριθμού κοτσυφιών (5). Μετά την εισαγωγή του Usutu στην Ευρώπη παρατηρείται η ανίχνευση και διασπορά του σε ζώα και κουνούπια σε διάφορες χώρες, όπως η Ελλάδα, Γαλλία, Ισπανία, Γερμανία, Πολωνία, Ουγγαρία, Σερβία, Κροατία, Ιταλία, Ολλανδία, Ελβετία, Ηνωμένο Βασίλειο (4), γεγονός που τον καθιστά πλέον ενδημικό και σε χώρες της Ευρώπης (6). Σε ότι αφορά την ανίχνευση στον άνθρωπο, τα πρώτα αυτόχθονα περιστατικά καταγράφηκαν το 2009 στην Ιταλία και μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, όπως Γαλλία, Γερμανία, Ουγγαρία, Ολλανδία, Ρουμανία και Σερβία (6). Στους ανθρώπους η νόσος που προκαλεί ο Usutu είναι κατά κύριο λόγο ασυμπτωματική ή με ήπια συμπτώματα (6). Αρκετές χώρες της Ευρώπης, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, διενεργούν, στο πλαίσιο ερευνητικών προγραμμάτων, ελέγχους κυκλοφορίας του ιού τόσο στα ζώα, στα κουνούπια και στους ανθρώπους συμβάλλοντας στην επιτήρησή του.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μοριακή ανίχνευση, με τη μέθοδο της real-time PCR, του ιού Usutu σε κουνούπια του γένους *Culex ripiens* που έχουν συλλεχθεί από περιφέρειες της Ελλάδας.

Συγκεκριμένα, για την έρευνα χρησιμοποιήθηκαν κουνούπια που συλλέχθηκαν από παγίδες που τοποθετήθηκαν σε διάφορα σταθερά σημεία της περιφέρειας Αττικής, Κεντρικής Μακεδονίας και Θεσσαλίας τόσο στο αστικό, όσο και στο περιαστικό περιβάλλον. Το χρονικό διάστημα που ελέγχθηκε ήταν οι χρονιές 2020 έως 2023. Το σύνολο των κουνουπιών που συλλέχθηκαν σε κάθε παγίδα, ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και τη χρήση διχοτομικών κλειδών σε επίπεδο είδους, οπότε και διαχωρίστηκαν τα θηλυκά *Culex pipiens*. Στη συνέχεια, σε ομάδες (pools) θηλυκών *Cx. pipiens* διενεργήθηκε απομόνωση ολικού RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την μοριακή ανίχνευση του ιού Usutu με τη μέθοδο της PCR αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου ανάγνωσης.

Τα δεδομένα που αφορούν τον ιό Usutu για την Ελλάδα είναι περιορισμένα. Τα μοναδικά δεδομένα αφορούν ένα θετικό περιστερι που είχε βρεθεί στην Βέροια τη χρονιά 2010 (2). Δεδομένα που να αφορούν προσβολές είτε σε ανθρώπους, είτε σε κουνούπια, δεν έχουν καταγραφεί. Διάφορες ευρωπαϊκές μελέτες καταδεικνύουν την συν-κυκλοφορία του ιού Usutu και του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV), τόσο σε επίπεδο ξενιστών και διαβιβαστών, όσο και σε γεωγραφικό επίπεδο (4). Η Ελλάδα αποτελεί μια χώρα στην οποία ενδημεί ο WNV, επομένως θα είχε αξία και η περαιτέρω διερεύνηση της κυκλοφορίας του ιού Usutu στη χώρα. Με αυτή την ερευνητική εργασία στόχος είναι η αναδρομική ανίχνευση της πιθανής κυκλοφορίας του ιού Usutu σε πληθυσμούς κουνουπιών σε διάφορες περιοχές της Αττικής, της Κεντρικής Μακεδονίας και της Θεσσαλίας. Τα αποτελέσματα της έρευνας θα θέσουν τα θεμέλια για την καλύτερη επιτήρηση του αναδυόμενου αυτού ιού και την ώθηση της πολιτικής ηγεσίας για λήψη έγκαιρων και έγκυρων μέτρων. Επιπλέον, θα δώσει το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες και συλλογή δεδομένων και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, καθώς και διαφορετικές χρονιές.

Οι ενότητες που ακολουθούν στο γενικό μέρος της εργασίας περιγράφουν με σαφήνεια τα χαρακτηριστικά των κουνουπιών γενικά και ειδικά του είδους ενδιαφέροντος *Culex pipiens* (βιολογικός κύκλος, μεταφερόμενες ασθένειες, τρόποι καταπολέμησης κλπ.). Ακόμη, γίνεται περιγραφή του ιού Usutu, των χαρακτηριστικών του, του τρόπου μετάδοσης και παρατίθενται επιδημιολογικά δεδομένα. Στο ειδικό μέρος, αναφέρεται ο σκοπός της εργασίας, το υλικό που χρησιμοποιήθηκε και η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε με τα εργαστηριακά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν. Στη συνέχεια, παρατίθενται λεπτομερώς τα αποτελέσματα της εργασίας, εμπλουτισμένα με εικόνες. Η εργασία ολοκληρώνεται με το κεφάλαιο της συζήτησης, στο οποίο αντιπαραβάλλονται διεθνείς και ευρωπαϊκές μελέτες

σχετικές με το θέμα, οι οποίες υποστηρίζουν και ενισχύουν τα ευρήματά μας. Τέλος, σημειώνονται κάποιες προτάσεις που σχετίζονται με το θέμα και έχουν ως στόχο την υποβολή μελλοντικών βελτιωτικών παρεμβάσεων.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

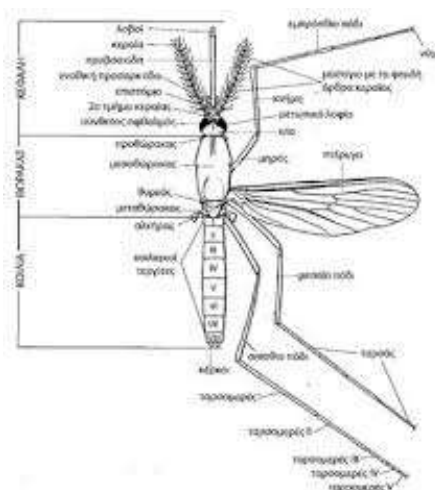
1. Κουνούπια

1.1 Γενικά

Τα κουνούπια έχουν αποτελέσει αντικείμενο σημαντικών και πολυάριθμων ερευνών τα τελευταία χρόνια. Το γεγονός ότι είναι ικανά να μεταδώσουν σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο, σε συνδυασμό με την παγκοσμιοποίηση, τις διεθνείς μετακινήσεις και την κλιματική αλλαγή υποδηλώνουν ότι θα συνεχίσουν να αποτελούν αντικείμενο μελέτης και έρευνας και στο μέλλον (7). Τα νοσήματα που μεταδίδονται με διαβιβαστές αποτελούν μείζον θέμα δημόσιας υγείας και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) αναλογούν σε ποσοστό πάνω από το 17% του συνόλου των λοιμωδών νοσημάτων, προκαλώντας πάνω από 700.000 θανάτους ετησίως (8).

Τα δίπτερα έντομα ανήκουν στην οικογένεια Culicidae, αριθμώντας περισσότερα των 3.500 ειδών (9). Κατατάσσονται σε τρεις διακριτές υπο-οικογένειες, Toxorhynchitinae, Anophelinae και Culicinae, ενώ τα κυριότερα γένη είναι τα *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* και *Mansonia*. Φέρουν μικρό και λεπτό σώμα, το οποίο διαιρείται σε τρία μέρη, την κεφαλή, τον θώρακα και την κοιλιά. Η κεφαλή απαρτίζεται από ένα ζεύγος οφθαλμών, ένα ζεύγος κεραιών, ένα ζεύγος προσακτριδών και μία μακριά ευδιάκριτη προβοσκίδα (Εικόνα 1.1). Στα θηλυκά, η προβοσκίδα απαρτίζεται από στοματικά μόρια μυζητικού τύπου καθώς τσιμπούν, σε αντίθεση με τα αρσενικά που είναι ανίκανα να τσιμπήσουν.

Εικόνα 1.1 Εξωτερική μορφολογία κουνουπιού (Mosquitoes and their control, 2010)



Η γεωγραφική κατανομή που επιδεικνύουν είναι παγκόσμια, με εξαίρεση την Ανταρκτική και τα μέρη στα οποία έχουν βρεθεί, οπότε και ποικίλουν ως προς τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των βιοτόπων. Εντούτοις, παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία, σαν οικογένεια λιγιστά είναι τα είδη που έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και αφορούν κυρίως αυτά που προκαλούν όχληση και είναι διαβιβάστες ασθενειών (9).

1.2 Βιολογικός κύκλος

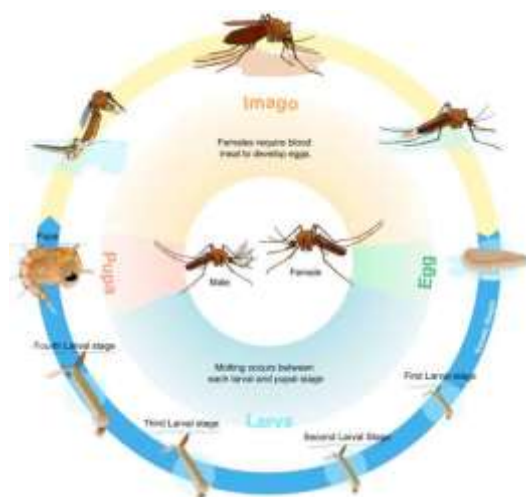
Τα κουνούπια είναι ολομετάβολα έντομα, γεγονός που σημαίνει πως υφίστανται ολική και πλήρη μεταμόρφωση από το στάδιο του αυγού μέχρι το ενήλικο έντομο (9). Όλα τα είδη περνούν από τέσσερα διακριτά στάδια κατά τη μεταμόρφωσή τους:

- Αυγό
- Προνύμφη (larva)
- Νύμφη (pupa)
- Ενήλικο κουνούπι

Με εξαίρεση το τελευταίο στάδιο (του ενήλικου), τα υπόλοιπα τρία στάδια διαβιούν στο νερό. Μετά το ζευγάρωμα το θηλυκό κουνούπι, προκειμένου να εξασφαλίσει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των ωών, θα πρέπει να λάβει γεύμα αίματος. Μόλις ολοκληρωθεί η πέψη του αίματος, το θηλυκό αναζητεί μια κατάλληλη εστία πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία, όπου θα εναποθέσει τα αυγά του, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο την επιβίωσή τους. Η επιλογή της κατάλληλης εστίας δεν είναι τυχαία, αλλά κατευθύνεται από χημικές, οπτικές, οσφρητικές και απτικές ενδείξεις που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του θηλυκού πριν την ωοτοκία (9). Η περίοδος επώασης, δηλαδή το χρονικό διάστημα μεταξύ ωοτοκίας και εκκόλαψης, όπως και το σημείο εναπόθεσης των αυγών διαφέρει ανάλογα με το είδος. Κάποια είδη γεννούν τα αυγά τους απευθείας στο νερό (είδη του γένους *Culex* και *Anopheles*), ενώ άλλα προτιμούν ως εστία εναπόθεσης τα υγρά υποστρώματα (είδη του γένους *Aedes*). Η τελευταία στρατηγική εναπόθεσης καθιστά τα αυγά ιδιαίτερα ανθεκτικά σε περιόδους ξηρασίας και απαιτεί για την εκκόλαψή τους το πλημμύρισμα αυτών των περιοχών. Διαφορές παρατηρούνται και στον τρόπο εναπόθεσης μεταξύ των ειδών, σε ορισμένα είδη τα αυγά εναποτίθενται μεμονωμένα ενώ σε άλλα υπό τη μορφή συστάδων (4). Ένα (1) θηλυκό κουνούπι γεννά κατά μέσο όρο 300 αυγά σε μία ωοτοκία, ενώ οι ωοτοκίες μπορεί να φτάσουν και τις 10. Το στάδιο του αυγού ακολουθείται από το στάδιο της προνύμφης (larva), εφόσον πραγματοποιηθεί εκκόλαψη. Η τελευταία είναι

μικροσκοπική σε μέγεθος, τρέφεται με μικροοργανισμούς και άλλα οργανικά σωματίδια που βρίσκονται στο νερό και εμφανίζει χαρακτηριστική γρήγορη κίνηση. Υπάρχουν τέσσερα στάδια ανάπτυξης που ονομάζονται προνυμφικές ηλικίες (1^η, 2^η, 3^η και 4^η) (Εικόνα 1.2). Το κάθε στάδιο είναι αυξανόμενο σε μέγεθος σε σχέση με το προηγούμενο, ενώ στο τέταρτο και τελευταίο οι προνύμφες εκδύονται και εισέρχονται στο νυμφικό στάδιο. Η ύπαρξη επαρκούς τροφής και κατάλληλης θερμοκρασίας του νερού αποτελούν παραμέτρους που καθορίζουν την παραμονή στο εν λόγω στάδιο. Ο συνήθης χρόνος κυμαίνεται από 7-10 ημέρες, αλλά μπορεί να είναι και αρκετά συντομότερος. Σημαντικό ρόλο στη διάρκεια του σταδίου αυτού διαδραματίζει επίσης και το είδος του εκάστοτε κουνουπιού. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει αυτό της νύμφης (pupa) που είναι υδρόβια και φέρει σχήμα κόμματος. Από μορφολογικής άποψης, διαφέρει από το στάδιο της προνύμφης, καθώς το εμπρόσθιο τμήμα είναι αρκετά μεγαλύτερο, αποτελούμενο από την κεφαλή και τον θώρακα που είναι συνδεδεμένα (κεφαλοθώρακας). Στη ραχιαία πλευρά υπάρχει ένα ζεύγος αναπνευστικών εξαρτημάτων (αναπνευστικό σιφώνιο). Οι νύμφες δεν τρέφονται και περνούν τον περισσότερο χρόνο στην επιφάνεια του νερού. Η παραμονή σε αυτό το στάδιο είναι μικρή, συνήθως 2-3 ημέρες, ενώ αν οι συνθήκες δε είναι ευνοϊκές μπορεί να διαρκέσει παραπάνω. Όταν πραγματοποιηθεί ο πλήρης σχηματισμός του ακμαίου, η νύμφη εισπνέει ατμοσφαιρικό αέρα, αυξάνοντας την εσωτερική πίεση με αποτέλεσμα το ακμαίο να ξεπροβάλλει από το νυμφικό περίβλημα. Αφού μείνει για περιορισμένο χρονικό διάστημα στην επιφάνεια του νερού, το ενήλικο πλέον κουνούπι αναζητεί καταφύγιο στην περιβάλλουσα βλάστηση, ώστε οι νεοσύστατες πτέρυγές του να στεγνώσουν και να σκληρύνουν (9). Τα κουνούπια μπορούν να εισέλθουν σε περίοδο αδράνειας (διάπαυσης), είτε στο στάδιο του αυγού, είτε στο στάδιο της προνύμφης, γεγονός που εξαρτάται από το είδος.

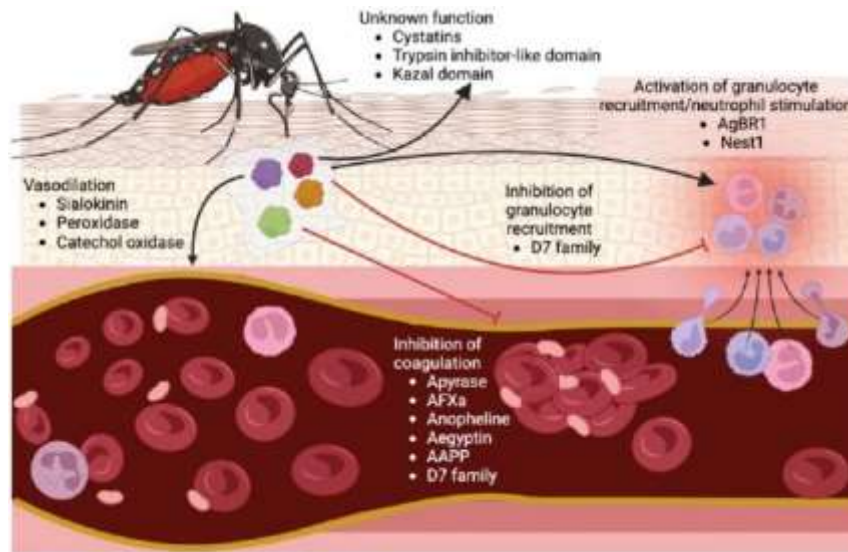
Εικόνα 1.2 Ο βιολογικός κύκλος του κουνουπιού (ACVCSD, 2016)



1.3 Διατροφικές συνήθειες

Οι διατροφικές συνήθειες των κουνουπιών ποικίλλουν ανάλογα με το είδος, το στάδιο της ζωής και το φύλο (9). Κύρια πηγή τροφής για όλα τα κουνούπια αποτελούν τα φυτά (φυτοφαγία), ως πηγή υδρογονανθράκων, ενώ συμπληρωματική τροφή αποτελεί το αίμα (αιματοφαγία), με το οποίο τρέφονται μόνο τα θηλυκά. Οι χυμοί από τα φυτά (νέκταρ λουλουδιών, κατεστραμμένα φρούτα και ιστοί φυτών, μελίτωμα κλπ.) είναι απαραίτητοι για βασικές ανάγκες των εντόμων, όπως είναι η πτήση, το ζευγάρωμα, καθώς και η εύρεση γεύματος αίματος, ενώ αντίθετα το αίμα χρησιμοποιείται για τη διαδικασία παραγωγής των αυγών (10,11). Προκειμένου ένα κουνούπι να τραφεί με επιτυχία από έναν ξενιστή, είναι αναγκαίο να υπερνικήσει όλους του φυσικούς μηχανισμούς που διαθέτει ο οργανισμός για την πήξη του αίματος (αγγειοσυστολή, συσσώρευση αιμοπεταλίων). Στο σάλιο των κουνουπιών έχει βρεθεί και αναγνωριστεί μια πληθώρα ενζύμων (διαφέρουν ανάλογα με το είδος), που έχουν ως στόχο την υπέρβαση των παραπάνω εμποδίων, ενώ ταυτόχρονα συνεισφέρουν στον εντοπισμό των αιμοφόρων αγγείων, κατάποσης και πέψης του αίματος από τα έντομα (Εικόνα 1.3) (12). Οι έρευνες γύρω από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν δείξει πως παίζουν ρόλο στη μετάδοση διαφόρων ιών και δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό εμβολίων έναντι κάποιων ασθενειών που μεταδίδονται με τα κουνούπια (12).

Εικόνα 1.3 Φυσιολογικές διαδικασίες που διενεργούνται κατά τη διάρκεια ενός τσιμπήματος (MDPI, 2023)



Ανάλογα με το μέρος που επιλέγουν για να τραφούν, καθώς και το είδος του ξενιστή τους (όταν πρόκειται για αιματοφαγία), χωρίζονται σε κατηγορίες. Ενδοφαγικά (ενδοφαγία) και εξωφαγικά (εξωφαγία) ονομάζονται τα κουνούπια ανάλογα με την προτίμησή τους να τρέφονται σε εσωτερικούς και εξωτερικούς χώρους, αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, ανάλογα με το είδος του οργανισμού από το οποίο τρέφονται, τα θηλυκά χωρίζονται σε ορνιθόφιλα, ζωόφιλα και ανθρωπόφιλα είδη. Ορνιθόφιλα είναι τα είδη που τρέφονται σε πτηνά, ζωόφιλα που τρέφονται σε λοιπά ζώα και τέλος ανθρωπόφιλα που προτιμούν τον άνθρωπο για να λάβουν το γεύμα αίματος (10).

1.4 Κουνούπια και ασθένειες

Τα κουνούπια αποτελούν ένα από τα κυριότερα οχήματα μεταφοράς παθογόνων στον άνθρωπο, κυρίως ιών και παρασίτων και θεωρούνται από τα πιο θανατηφόρα αρθρόποδα παγκοσμίως (13,14). Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, οι μεταδιδόμενες με διαβιβαστές ασθένειες αποτελούν πάνω από το 17% του συνόλου των λοιμωδών νοσημάτων, ενώ εκτιμάται ότι προκαλούν πάνω από 700,000 θανάτους ετησίως (8). Οι περιοχές που πλήττονται κυρίως από αυτά τα νοσήματα είναι χώρες που ανήκουν στην Αφρικανική ήπειρο (14). Μερικές από τις ασθένειες που μεταδίδουν τα κουνούπια είναι η ελονοσία, ο δάγκειος, ο κίτρινος πυρετός, η εγκεφαλίτιδα που προκαλείται από τον ιό του δυτικού Νείλου και άλλες (13). Συγκεκριμένα γένη και πολλές φορές συγκεκριμένα είδη κουνουπιών ενοχοποιούνται για τη

μετάδοση μεμονωμένων ασθενειών, με τα σημαντικότερα γένη να είναι αυτά των *Aedes*, *Anopheles* και *Culex* (13,15). Κουνούπια του γένους *Aedes* έχουν συσχετιστεί κατά κύριο λόγο με ιούς που προκαλούν αιμορραγικά επεισόδια, όπως είναι ο ιός του δάγκειου πυρετού (Dengue Virus, DENV), ο ιός Chikungunya (Chikungunya Virus, CHIKV) και ο ιός του κίτρινου πυρετού (Yellow Fever Virus, YFV) (16). Ενοχοποιούνται επίσης για την μετάδοση του ιού Zika (Zika virus, ZIKV), του ιού του πυρετού Rift Valley (Rift Valley Fever Virus, RVFV), όπως και για τη μετάδοση του παρασίτου που προκαλεί τη λεμφαδενική φιλαρίαση (Lymphatic filariasis) (17). Από την άλλη πλευρά, σε πληθυσμούς κουνουπιών του γένους *Culex* έχει βρεθεί η κυκλοφορία ιών που προκαλούν εγκεφαλίτιδες, όπως ο ιός της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας (Japanese Encephalitis Virus, JEV), ο ιός του δυτικού Νείλου (West Nile Virus, WNV), ο ιός της εγκεφαλίτιδας Saint Louis (Saint Louis Encephalitis Virus, SLEV), ο ιός Sindbis (Sindbis Virus, SINV) και ο ιός Usutu (Usutu Virus, USUV) (14,16). Τα κουνούπια του γένους *Anopheles* τέλος, μεταφέρουν κατά κύριο λόγο παράσιτα του αίματος και όχι ιούς, όπως είναι το πλασμώδιο της ελονοσίας και οι φιλάριας που προκαλούν φιλαριάσεις (14).

Παρά το γεγονός ότι φαίνεται πως συγκεκριμένοι ιοί έχουν συγκεκριμένους διαβιβαστές, ευρήματα μελετών έχουν δείξει πως κάποιοι ιοί μπορούν να μολύνουν παραπάνω από ένα διαφορετικά γένη κουνουπιών (16). Οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν πως δεν υπάρχει καθολικότητα και αποκλειστικότητα μεταξύ διαβιβαστή και παθογόνου, αλλά διαφορετικός βαθμός προσαρμογής των ιών στους διαβιβαστές και κάποιου είδους αντιϊκής προστασίας των κουνουπιών προς τους ιούς (16). Έχουν επίσης ανιχνευθεί διάφορα παθογόνα βακτήρια του αίματος, χωρίς ωστόσο να έχει προσδιοριστεί η προέλευση αλλά και η πιθανότητα μετάδοσής τους (15).

Η ελονοσία, ο δάγκειος και ο κίτρινος πυρετός είναι από τα σημαντικότερα και με τη μεγαλύτερη επίπτωση νοσήματα που μεταδίδονται με διαβιβαστές στον κόσμο. Η ελονοσία είναι ένα νόσημα που μεταδίδεται με τα κουνούπια του γένους *Anopheles*, ενώ οφείλεται σε ένα παράσιτο του αίματος που ονομάζεται πλασμώδιο (18). Υπάρχουν πέντε είδη που παρασίτου που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο και ανήκουν στο γένος *Plasmodium*, τα *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* και *P. knowlesi* (19). Από αυτά, δύο αποτελούν την μεγαλύτερη απειλή για τον άνθρωπο, το *P. falciparum* και το *P. vivax*. Το *P. falciparum* προκαλεί την πιο σοβαρή νόσο και μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο αν δεν δοθεί έγκαιρα θεραπεία, ενώ αποτελεί το πιο συχνό είδος στην Αφρική (19,20). Το *P. vivax* συναντάται πιο συχνά κυρίως σε χώρες εκτός της Αφρικανικής ηπείρου (19). Τα

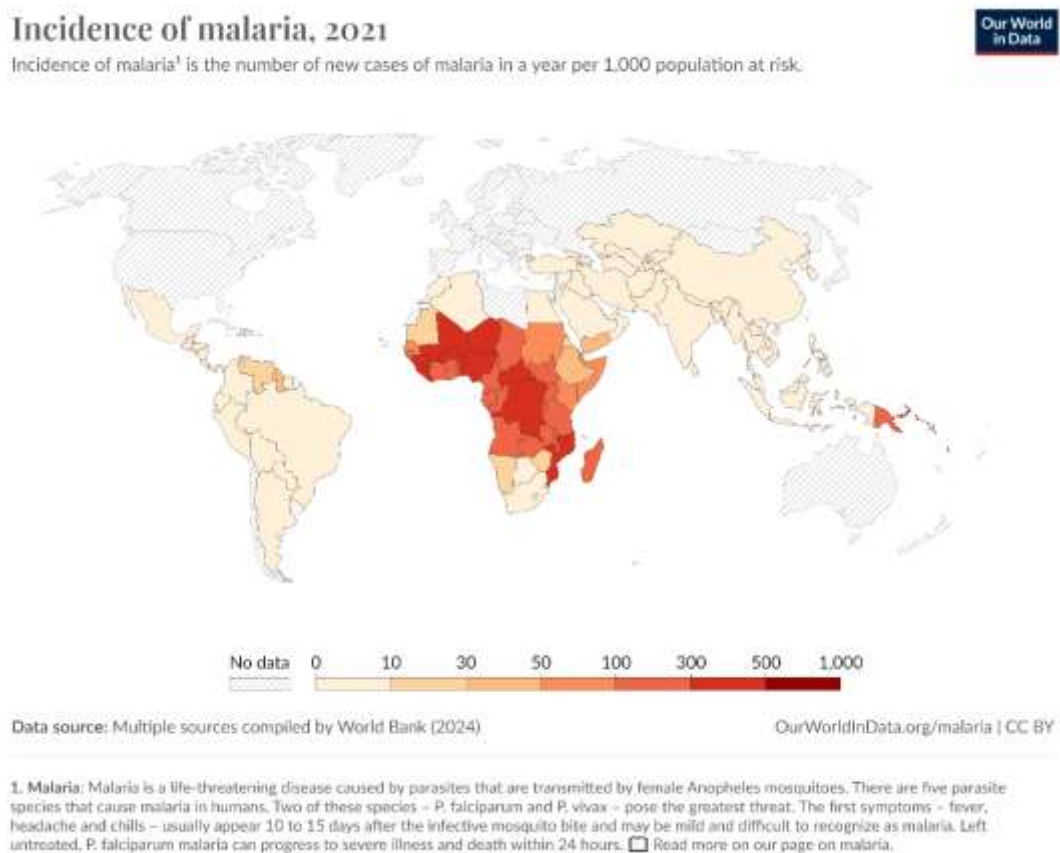
συμπτώματα μπορεί να κυμαίνονται από ήπια έως και απειλητικά για τη ζωή, με τα συνηθέστερα να είναι ο πυρετός, πονοκέφαλος και ρίγη.

Σύμφωνα με τον ΠΟΥ το 2022 ήταν μια δύσκολη χρονιά σχετικά με την ελονοσία, καθώς περίπου ο μισός πληθυσμός του πλανήτη βρισκόταν σε κίνδυνο. Τα περιστατικά εκτιμήθηκαν γύρω στα 249 εκατομμύρια, ενώ οι θάνατοι που οφείλονταν σε ελονοσία ανέρχονταν στους 608.000, συγκριτικά με στοιχεία για το 2021 που καταγράφηκαν 244 εκατομμύρια περιστατικά και 610.000 θάνατοι, αντίστοιχα (19). Κύρια επηρεαζόμενη ομάδα αποτελούν τα παιδιά κάτω των πέντε ετών, κυρίως λόγω του ανοσοποιητικού συστήματος που δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως, ακολουθούμενη από τις εγκύους γυναίκες, τους ταξιδιώτες και τα άτομα με μειωμένο ανοσοποιητικό σύστημα (π.χ. άτομα με HIV ή AIDS) (21,22). Το μεγαλύτερο μερίδιο ευθύνης για τα νούμερα αυτά κατέχουν οι χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής και μικρότερο ποσοστό αναλογεί σε χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας, Ανατολικής Μεσογείου, Δυτικού Ειρηνικού και της Αμερικής. Στην Ευρώπη, ενώ η νόσος έχει εκριζωθεί από τις δεκαετίες 1960 – 1970, εξακολουθούν να καταγράφονται σποραδικά κρούσματα, κυρίως σε άτομα που έχουν ταξιδέψει σε κάποια ενδημική χώρα, αλλά και κάποια αυτόχθονα περιστατικά (20). Παρά το γεγονός ότι στην Ευρώπη κυκλοφορούν είδη κουνουπιών που θα μπορούσαν να μολυνθούν από τα εισαγόμενα κρούσματα και να μεταδώσουν την ελονοσία, περιορισμένες είναι οι μελέτες γύρω από αυτό το θέμα (20). Στην Ελλάδα, η ελονοσία έχει εκριζωθεί από το 1974 μετά από τον ανθελονοσιακό αγώνα (1946 - 1960), παρόλα αυτά έκτοτε καταγράφονται σταθερά και σε ετήσια βάση εισαγόμενα κρούσματα (23,24). Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση του ΕΟΔΥ για το 2023 καταγράφηκαν 32 εισαγόμενα κρούσματα, εκ των οποίων οι 12 ήταν μετανάστες και 20 ταξιδιώτες σε ενδημική χώρα (23). Σημειώνεται ακόμη ότι η συντριπτική πλειοψηφία των κρουσμάτων είχαν προσβληθεί από *P. falciparum*.

Η ελονοσία βρίσκεται ανάμεσα στις 10 κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας στις τροπικές και υπό-τροπικές χώρες, αποτελώντας ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας (25). Στην Εικόνα 1.4 φαίνεται η επίπτωση της νόσου με τα δεδομένα για τη χρονιά 2021, καταδεικνύοντας τον διαμοιρασμό της νόσου παγκοσμίως (Our World in Data, 2024). Προκειμένου να ελεγχθεί και να περιοριστεί η διασπορά της ελονοσίας, ο ΠΟΥ έχει θέσει σε εφαρμογή το σχέδιο «Global technical strategy for malaria 2016-2030», με κύριο στόχο την μείωση τουλάχιστον κατά 90% των νέων περιστατικών και της θνησιμότητας που οφείλονται στην ελονοσία μέχρι το 2030 (26). Ακόμη, πρόσφατα εγκρίθηκαν και βγήκαν στην κυκλοφορία δύο εμβόλια κατά της ελονοσίας, τα RTS-S και RT21, τα οποία στοχεύουν

το πιο θανατηφόρο πλασμώδιο που προκαλεί ελονοσία, το *P. falciparum* (27). Προτάθηκε από τον ΠΟΥ να διατεθεί πιλοτικά σε χώρες της Αφρικής (Γκάνα, Κένυα και Μαλάουι) και κυρίως για τον εμβολιασμό μικρών παιδιών (28). Τα εμβόλια αυτά απαιτούν βελτιώσεις, αλλά τα προκαταρκτικά αποτελέσματα του πιλοτικού εμβολιασμού είναι πολλά υποσχόμενα σχετικά με τον έλεγχο και τον περιορισμό της ελονοσίας (27,28).

Εικόνα 1.4 Χάρτης επίπτωσης ελονοσίας σε χώρες ανά τον κόσμο για το 2021 (Our World in Data, 2024)

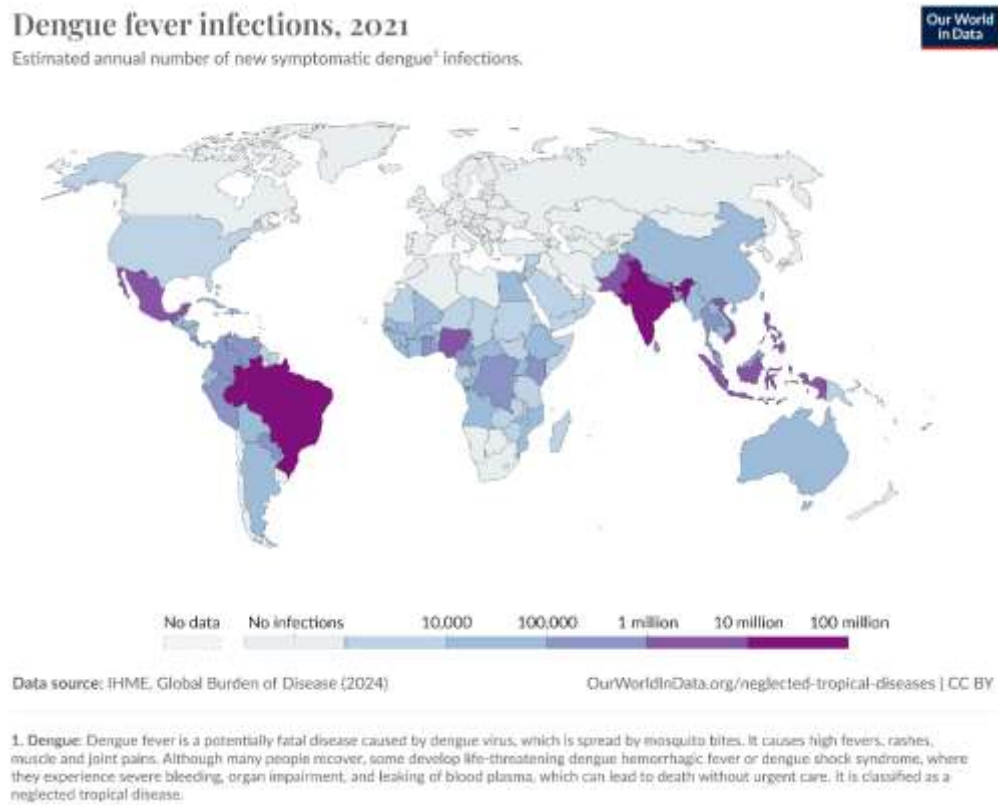


Ο δάγκειος πυρετός είναι μία ακόμη ασθένεια μεταδιδόμενη με διαβιβαστές που συναντάται στις τροπικές και υπό-τροπικές χώρες και οφείλεται σε έναν φλαβοϊό (DENV) (29). Οι διαβιβαστές που είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση της νόσου είναι τα κουνούπια του γένους *Aedes* και ειδικότερα το *Ae. albopictus* και το *Ae. aegypti* (29). Οι ασθενείς που προσβάλλονται από τον DENV εμφανίζουν είτε καθόλου, είτε μια πληθώρα ήπιων συμπτωμάτων, ενώ σπάνια εμφανίζουν σοβαρά συμπτώματα τα οποία μπορεί να αποβούν θανατηφόρα (30,31). Ανάλογα με τα συμπτώματα η νόσος χωρίζεται στον δάγκειο πυρετό

(Dengue Fever, DF) που με την παραμονή των συμπτωμάτων μπορεί να οδηγήσει στον δάγκειο αιμορραγικό πυρετό (Dengue Hemorrhagic Fever, DHF) και το σύνδρομο δάγκειου σοκ (Dengue Shock Syndrome, DSS) (31). Η κλινική εικόνα του DF περιλαμβάνει συμπτώματα που διαρκούν 2-7 ημέρες και ομοιάζουν με αυτά της γρίπης, όπως υψηλό πυρετό, πονοκέφαλο, πόνο στις αρθρώσεις, τα κόκαλα και τους μύες, ναυτία, έμετο, καθώς και λευκοπενία (30,31). Οι μορφές της νόσου DHF και DSS είναι πιο σοβαρές για τη ζωή και μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και στον θάνατο, με τα κύρια συμπτώματα να είναι πολύ υψηλός πυρετός, αιμορραγία, ηπατομεγαλία και σε σοβαρές περιπτώσεις κυκλοφορική καταπληξία (29,31).

Ο δάγκειος πυρετός επηρεάζει τον μισό περίπου πληθυσμό του πλανήτη και εκτιμάται ότι καταγράφονται περίπου 100 – 400 εκατομμύρια περιστατικά κάθε χρόνο (Εικόνα 1.5) (30). Σύμφωνα με τον ECDC, από την αρχή του 2024 έχουν καταγραφεί παγκοσμίως πάνω από 11 εκατομμύρια νέα περιστατικά και πάνω από 7.000 θάνατοι (32). Η νόσος είναι ήδη ενδημική σε χώρες της Αφρικής, της Αμερικής, της Ανατολικής Μεσογείου, της Νοτιοανατολικής Ασίας και του Δυτικού Ειρηνικού Ωκεανού (30). Παράλληλα όμως, φαίνεται πως έχει εξαπλωθεί και σε περιοχές της Ευρώπης με την σταδιακή αύξηση εισαγόμενων κρουσμάτων (32). Χώρες όπως η Γερμανία, η Ιταλία και η Γαλλία καταγράφουν εισαγόμενα κρούσματα δάγκειου (30,32). Στη Γαλλία ωστόσο υπήρξε η καταγραφή και ενός αυτόχθονου κρούσματος το καλοκαίρι του 2024 (32). Τα φαινόμενα αυτά οφείλονται στην εισαγωγή και εγκαθίδρυση στην Ευρώπη των κουνουπιών διαβιβαστών του ιού, καθώς και των κλιματολογικών συνθηκών που ευνοούν την εξάπλωσή τους. Στην Ελλάδα καταγράφονται μόνο περιστασιακά εισαγόμενα κρούσματα σε ταξιδιώτες, ενώ σύμφωνα με τον ΕΟΔΥ ο κίνδυνος εγχώριας μετάδοσης ύστερα από την εισαγωγή του ιού στη χώρα είναι υπαρκτός λόγω ύπαρξης του δευτερεύοντος ξενιστή του ιού *Ae. albopictus* (33).

Εικόνα 1.5 Χάρτης επίπτωσης δάγκειου πυρετού για το 2021 (Our World in Data, 2024)

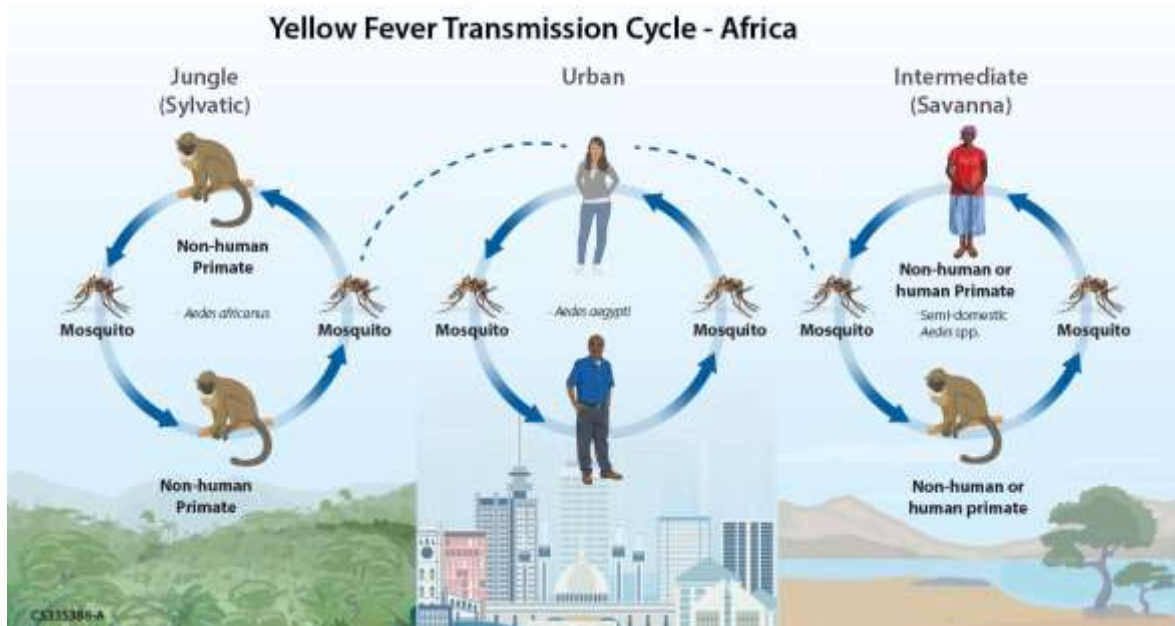


Με σημείο αναφοράς την σοβαρότητα της νόσου που μπορεί να προκαλέσει ο DENV, την ολόενα και αυξανόμενη εξάπλωσή του σε χώρες μη ενδημικές, καθώς και το ποσοστό των ανθρώπων που προσβάλλονται ετησίως, γίνεται αντιληπτή η άμεση ανάγκη περιορισμού των συνεπειών μετάδοσης του ιού. Ο ΠΟΥ έχει εκδώσει οδηγίες με μέτρα προφύλαξης, τα οποία εστιάζονται κυρίως στην προστασία από τα κουνούπια και τον περιορισμό εστιών πολλαπλασιασμού (30). Επιπροσθέτως, έχει αδειοδοτηθεί η κυκλοφορία ενός εμβολίου (TAK-003) σε κάποιες χώρες που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά μετάδοσης και σε συγκεκριμένες ηλικιακές ομάδες (άτομα 6-16 ετών) (27,30). Η ανάπτυξη του εμβολίου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βήματα προς τον περιορισμό αυτής της ασθένειας.

Ο κίτρινος πυρετός είναι μία ακόμη ασθένεια με μεγάλη επίπτωση στον ανθρώπινο πληθυσμό και προδιαγραφές να αποτελέσει παγκόσμια απειλή για την δημόσια υγεία για παρόμοιους λόγους με τον DENV (34). Ο YFV ανήκει όπως και ο DENV στην οικογένεια *Flaviviridae*, μεταδίδεται με το τσίμπημα κουνουπιού του *Aedes* και συγκεκριμένα του είδους *Ae. aegypti* (35). Η ιδιαιτερότητα αυτού του ιού είναι πως ανάλογα με το ενδιαίτημα του διαβιβαστή ακολουθεί και τον αντίστοιχο κύκλο μετάδοσης. Πιο συγκεκριμένα,

υπάρχουν τρεις διακριτοί κύκλοι μετάδοσης (Εικόνα 1.6), ο πρώτος αφορά την άγρια φύση (δάση, ζούγκλα) όπου μολυσμένα με τον ιό κουνούπια μεταδίδουν τον ιό σε πιθήκους που διαβιούν εκεί (34,35). Οι άνθρωποι που είτε εργάζονται, είτε επισκέπτονται τα δάση, μολύνονται από το τσίμπημα των κουνουπιών και αναπτύσσουν κίτρινο πυρετό (35,36). Ο δεύτερος κύκλος μετάδοσης περιλαμβάνει κουνούπια τα οποία δραστηριοποιούνται τόσο στην άγρια φύση, όσο και κοντά σε σπίτια, ενώ προσβάλλονται άνθρωποι που δουλεύουν ή ζουν κοντά σε δάση και πίθηκοι (34,35). Ο συγκεκριμένος κύκλος μετάδοσης αποτελεί την πιο κοινή αιτία εξάρσεων κίτρινου πυρετού στην Αφρική. Ο τρίτος τρόπος μετάδοσης ονομάζεται αστικός και αφορά την εισαγωγή του YFV σε αστικές περιοχές μέσω ενός από τους δύο προηγούμενους κύκλους, με αποτέλεσμα την τοπική μετάδοσή του από αστικά κουνούπια (35). Στους περισσότερους ανθρώπους η νόσος παραμένει σε ασυμπτωματική φάση, ενώ αν εμφανιστούν συμπτώματα ομοιάζουν με αυτά του DENV (πυρετός, πονοκέφαλος, μυϊκοί πόνοι κλπ.) και υποχωρούν μετά από 3-6 μέρες (34). Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις επηρεάζονται όργανα του σώματος όπως το ήπαρ και οι νεφροί, ενώ οι ασθενείς εμφανίζουν ίκτερο (εδώ οφείλει το όνομά της η ασθένεια), σκούρα ούρα, κοιλιακό πόνο και έμετο (34,35). Περίπου οι μισοί ασθενείς που θα φτάσουν σε αυτή τη φάση θα καταλήξουν σε χρονικό διάστημα 7-10 ημερών.

Εικόνα 1.6 Κύκλοι μετάδοσης του κίτρινου πυρετού (CDC, 2024)



Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, κάθε χρόνο καταγράφονται 200.000 νέες περιπτώσεις και 30.000 θάνατοι από κίτρινο πυρετό, με την συντριπτική πλειοψηφία των κρουσμάτων να απαντώνται στην Αφρική (36). Εξαιτίας της ομοιότητας των αρχικών συμπτωμάτων με άλλες νόσους (ελονοσία, ηπατίτιδα, λεπτοσπείρωση κ.α.), πολλές φορές υπάρχει υποδιάγνωση του νοσήματος, οπότε υπάρχει σαφής περίπτωση υποεκτίμησης του πραγματικού αριθμού ενεργών κρουσμάτων (34,36). Χώρες όπου ο κίτρινος πυρετός είναι ενδημικός ανήκουν στην Αφρική και την Κεντρική και Νότια Αμερική, με επιδημικές εξάρσεις να καταγράφονται πιο συχνά στην Αφρική (34,35). Η Ευρώπη κατέγραψε κρούσματα κίτρινου πυρετού για τελευταία φορά το 2018. Συγκεκριμένα, καταγράφηκαν 13 εισαγόμενα κρούσματα, επτά στη Γαλλία, δύο στη Γερμανία και από ένα στην Τσεχία, την Ολλανδία, τη Ρουμανία και το Ηνωμένο Βασίλειο (37).

Ένας από τους βασικότερους τρόπους καταπολέμησης του κίτρινου πυρετού είναι ο εμβολιασμός, ο οποίος προσφέρει αποτελεσματική και μακροχρόνια προστασία έναντι του ιού (34,35,37). Άλλες στρατηγικές αφορούν τεχνικές καταπολέμησης των κουνουπιών και αποφυγή των τσιμπημάτων, όπως και στα υπόλοιπα νοσήματα που μεταδίδονται με διαβιβαστές (34).

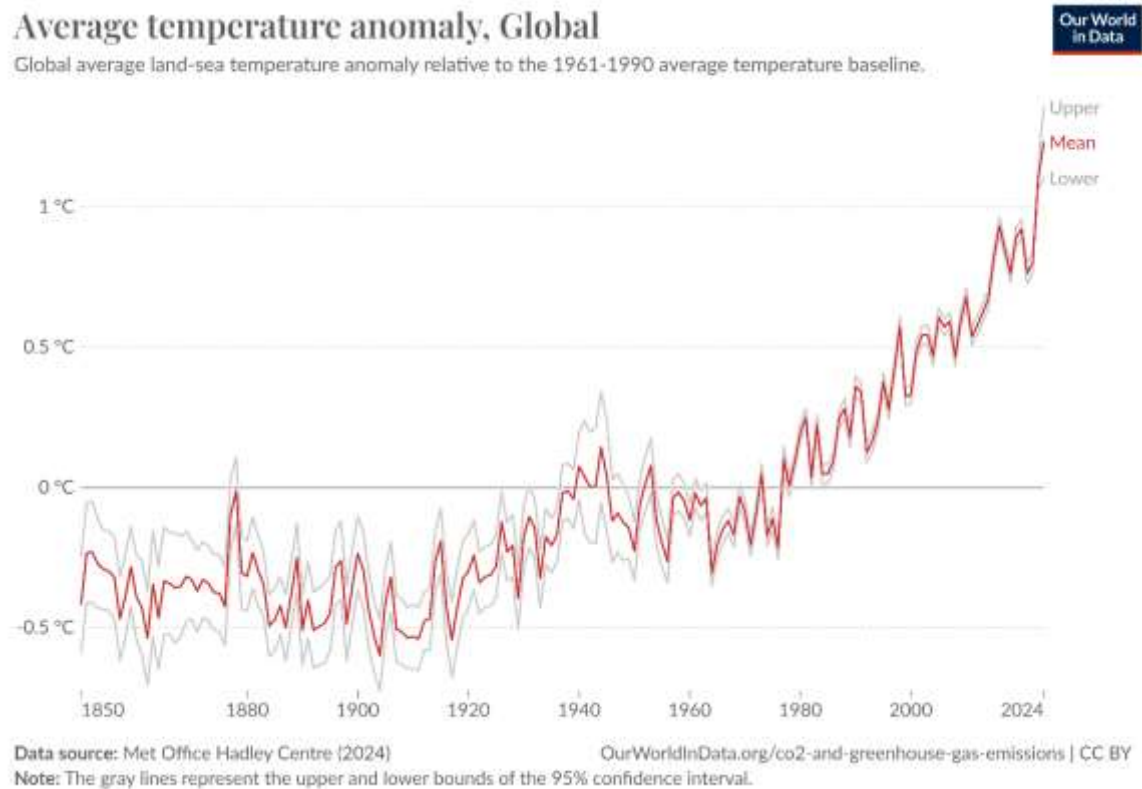
Τέλος, ιοί όπως ο Chikungunya και ο Zika έχουν μικρή επίπτωση στον ανθρώπινο πληθυσμό, αριθμώντας σποραδικά λίγα κρούσματα (38,39). Μεταδίδονται και οι δύο με το τσίμπημα του κουνουπιού *Ae. aegypti*, ο CHIKV όμως μπορεί να μεταδοθεί και με το *Ae. albopictus* (38,39). Αρχικά ο κύκλος μετάδοσης και των δύο ιών περιλαμβάνει κουνούπια και ζώα που λειτουργούν ως δεξαμενές πολλαπλασιασμού, ενώ ο άνθρωπος δεν περιέχεται στους πιθανούς ξενιστές (40). Κάποια στιγμή όμως μεταπηδούν και στον άνθρωπο και προσαρμόζονται πλήρως σε αυτόν τον ξενιστή (40). Η κλινική εικόνα των ασθενών είναι κοινή και για τους δύο ιούς και περιλαμβάνει συμπτώματα όπως πυρετό, πονοκέφαλο, εξάνθημα, πόνο στους μύες και τις αρθρώσεις (38,39,41). Στις περισσότερες περιπτώσεις η νόσηση είναι ήπια και αυτο-ιάσιμη. Ο ZIKV συναντάται κυρίως σε χώρες της Αφρικής, της Αμερικής, της Ασίας και του Ειρηνικού Ωκεανού, όπου και ενδημεί (38). Η μεγαλύτερη επιδημική έξαρση από τον ιό Zika σημειώθηκε το 2015 στη Βραζιλία (42). Ο ZIKV μπορεί να προκαλέσει προβλήματα κατά την εγκυμοσύνη (πρόωρο τοκετό, αποβολές), ενώ έχει επίσης συνδεθεί με περιστατικά μικροκεφαλίας σε νεογνά (38). Το 2016 ο ZIKV συνδέθηκε με τη γέννηση νεογνών με δυσμορφίες και συγκεκριμένα μικροκεφαλία, οπότε ο ΠΟΥ ανακήρυξε το ζήτημα ως έκτακτη ανάγκη δημόσιας υγείας (38,42). Άλλες επιδημίες Zika έχουν σημειωθεί και στην Ασία τις χρονιές 2007, 2013 και 2014, όχι όμως με την ίδια

έκταση (42). Στην Ευρώπη τα κρούσματα που καταγράφονται είναι εισαγόμενα, ενώ υπήρξε και το πρώτο αυτόχθονο κρούσμα στην Γαλλία το 2019 (43). Έκτοτε δεν έχουν σημειωθεί περαιτέρω αυτόχθονα κρούσματα. Όμοια επιδημιολογική εικόνα αφορά και τον CHIKV. Οι ενδημικές χώρες βρίσκονται στην Αφρική, την Αμερική και την Ασία, με χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής να καταγράφουν τη πλειοψηφία των κρουσμάτων (44). Μία μεγάλη έξαρση καταγράφηκε το 2005-2006 σε ένα νησί του Ινδικού Ωκεανού, το γεγονός αυτό αποτέλεσε την αφετηρία διασποράς του CHIKV σε άλλες χώρες μέσω των ταξιδιωτών (40). Στην Αμερική υπήρχαν εξάρσεις, με αποκορύφωμα τις χρονιές 2015 και 2016 που ο CHIKV αποτέλεσε μείζων θέμα δημόσιας υγείας με την καταγραφή πολλών χιλιάδων ανθρώπινων κρουσμάτων (40,45). Κρούσματα CHIKV καταγράφονται και στην Ευρώπη σποραδικά από το 2007, κυρίως εισαγόμενα, αλλά έχει καταγραφεί και εγχώρια μετάδοση στην Γαλλία και την Ιταλία (46). Δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια στην κυκλοφορία ούτε για τον ZIKV, ούτε για τον CHIKV, επομένως ο μοναδικός τρόπος περιορισμού είναι η προφύλαξη από τα τσιμπήματα των κουνουπιών και ο περιορισμός των εστιών πολλαπλασιασμού (38,39).

1.5 Κλιματική αλλαγή και κουνούπια

Η κλιματική αλλαγή αποτελεί αδιαμφισβήτητα ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα του 21^{ου} αιώνα (25), επηρεάζοντας σύμφωνα με τον ΠΟΥ τόσο το περιβάλλον, όσο και τον άνθρωπο σε αρκετές πτυχές του. Ο όρος κλιματική αλλαγή ορίζεται ως οποιαδήποτε μακροχρόνια αλλαγή στις κλιματικές συνθήκες, σε συνδυασμό με την εκδήλωση ακραίων καιρικών φαινομένων (καταιγίδες, παρατεταμένη ζέστη, πλημμύρες, ξηρασία, πυρκαγιές) (25,47). Η θερμοκρασία του πλανήτη αυξάνεται ολοένα και περισσότερο λόγω της υπερθέρμανσης του πλανήτη (Εικόνα 1.7). Μελέτες δείχνουν πως μέχρι σήμερα η θερμοκρασία του πλανήτη έχει αυξηθεί κατά 1,2°C σε σχέση με τα προ-βιομηχανικά επίπεδα, ενώ εκτιμάται ότι μέχρι το 2.100 θα έχει φτάσει μέχρι και 2°C πάνω από τα προ-βιομηχανικά επίπεδα (48).

Εικόνα 1.7 Διακύμανση της ανώτερης, μέσης και κατώτερης θερμοκρασίας του πλανήτη από το 1850 μέχρι σήμερα (Our World in Data, 2024)



Η έκθεση του ανθρώπινου πληθυσμού σε αυτές τις πρωτόγνωρες καιρικές συνθήκες τον φέρνει αντιμέτωπο με νέα προβλήματα που επηρεάζουν την υγεία, την ευημερία και τον βιοπορισμό (48). Όσον αφορά την υγεία, η κλιματική αλλαγή ευνοεί τη διασπορά ασθενειών που ονομάζονται αναδυόμενες και νέο-αναδυόμενες και οι οποίες μεταδίδονται μέσω κάποιου οργανισμού-διαβιβαστή (25). Ο περισσότερες από αυτές τις ασθένειες οφείλονται σε παθογόνα με κύκλο μετάδοσης που περιλαμβάνει ως ξενιστές τον άνθρωπο και άλλα ζώα, ως διαβιβαστές κουνούπια, μύγες και μπορούν να επηρεαστούν από τις μεταβαλλόμενες κλιματολογικές συνθήκες (49). Η αυξανόμενη διασπορά οφείλεται κατά κύριο λόγο στην διαφορετική οικολογία που αποκτά ο ξενιστής. Το ενδιαίτημα, το περιβάλλον και οι ανταγωνιστές του ξενιστή, σε συνδυασμό με κάποια βιολογικά χαρακτηριστικά, επηρεάζουν την επιβίωση και την αναπαραγωγή, διαδικασίες άρρηκτα συνδεδεμένες με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και κατ' επέκταση τη μετάδοση του εκάστοτε παθογόνου (25,49).

Συγκεκριμένα, για τα κουνούπια που ενεργούν ως διαβιβαστές, οι συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον (θερμοκρασία, υγρασία, πλημμύρες) είναι ικανές να δημιουργήσουν εστίες

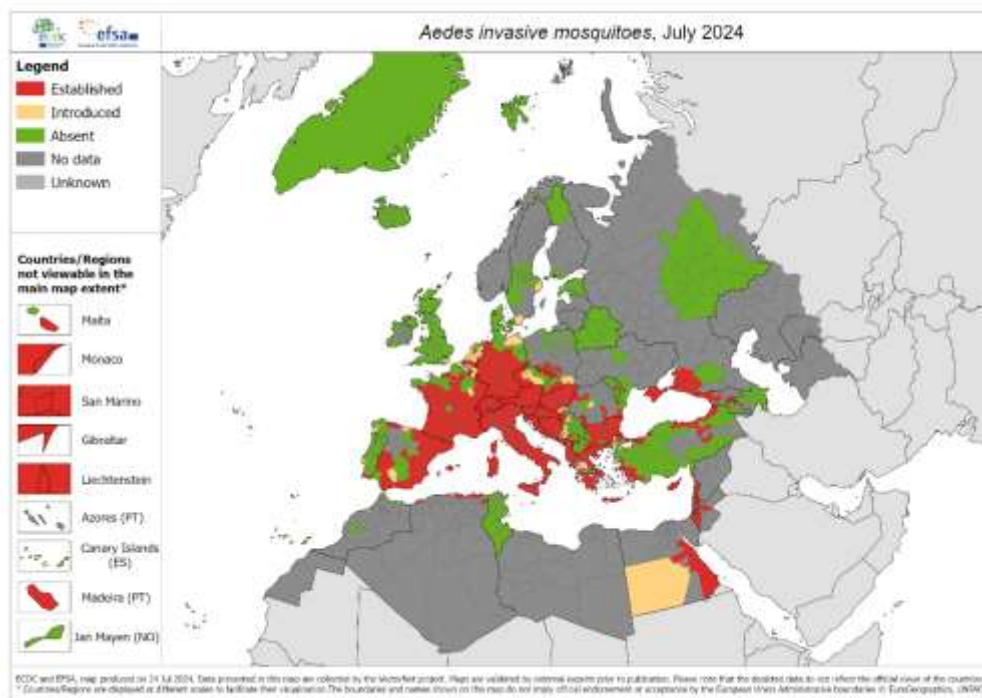
στις οποίες μπορούν να αναπαραχθούν και να αποθέσουν τα αυγά τους αυξάνοντας τους πληθυσμούς (50). Ακόμη, η μετατροπή του κλίματος από ψυχρό σε πιο θερμό έχει ως αποτέλεσμα την γεωγραφική επέκταση των κουνουπιών σε μέρη όπου παλαιότερα δεν υπήρχαν, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι πιθανότητες αλληλεπίδρασης με ξενιστές, για παράδειγμα ο άνθρωπος (50,51). Μελέτες έχουν αναδείξει την σημαντικότητα της θερμοκρασίας για την ανάπτυξη των κουνουπιών και των παθογόνων που μεταφέρουν, καταδεικνύοντας πως οι διαδικασίες της ανάπτυξης και του διπλασιασμού επιταχύνονται σε υψηλές θερμοκρασίες (25). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες δρουν ανασταλτικά στις παραπάνω διαδικασίες (50). Με την κλιματική αλλαγή επηρεάζεται και η διάρκεια της περιόδου κατά την οποία είναι ενεργά τα κουνούπια. Λόγω της μειωμένης χειμερινής περιόδου, μειώνεται η περίοδος διάπαυσης και επομένως αυξάνεται η περίοδος κατά την οποία είναι ικανά να λειτουργούν ως δεξαμενές και να μεταδίδουν ιούς (52,53).

Η Ευρώπη αποτελεί, λόγω γεωγραφικής θέσης αλλά και κλίματος, μια άμεσα επηρεαζόμενη ήπειρο από την κλιματολογική αλλαγή και την διαφορική εξάπλωση των κουνουπιών. Κλιματολογικές μελέτες που αφορούν την Ευρώπη προβλέπουν τη συνεχιζόμενη αύξηση της θερμοκρασίας και την εντατικοποίηση των φαινομένων ολοένα και περισσότερο, με την ήπειρο, ακόμη και τα βορειότερα τμήματα (Βορειοδυτική Ευρώπη, Σκανδιναβία), να έρχεται αντιμέτωπη με θερινή περίοδο μεγάλης διάρκειας συνοδευόμενη από περιόδους ανομβρίας (54,55). Στο αντίθετο άκρο εκδήλωσης της κλιματικής αλλαγής είναι οι ισχυρές καταιγίδες που έχουν ως αποτέλεσμα την καταγραφή πλημμυρικών φαινομένων (54). Ακόμη, μοντέλα σχεδιασμένα με βάση το φαινόμενο της κλιματικής αλλαγής και πώς αυτό επηρεάζει τους πληθυσμούς κουνουπιών δείχνουν την αυξητική τους τάση, καθώς οι συνθήκες γίνονται ολοένα και περισσότερο ευνοϊκές για την αναπαραγωγή και την εξάπλωσή τους (56). Συνδυαστικά αυτές οι μελέτες δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την εξάπλωση και κατ' επέκταση τη δυνατότητα ελέγχου των μεταδιδόμενων με διαβιβαστές ασθενειών. Για παράδειγμα, σενάρια που αφορούν την ελονοσία και τον δάγκειο πυρετό προβλέπουν την προσαρμογή τους σε περιοχές της Ευρώπης, της Αφρικής και της Αμερικής που βρίσκονται βορειότερα από τις περιοχές που είναι ήδη εγκαθιδρυμένες (54,55).

Μέσω της οργανωμένης εντομολογικής επιτήρησης σε πολλές χώρες έχει εντοπισθεί η εισαγωγή ειδών που δεν ανευρίσκονταν παλαιότερα στην Ευρώπη (57). Τα είδη που έχουν εισέλθει και έχουν εδραιωθεί είναι κυρίως του γένους *Aedes* και συγκεκριμένα τα είδη *Ae. albopictus*, *Ae. japonicus* και *Ae. koreicus* (7,57,58). Χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου

γένους είναι η ανθεκτικότητα των αυγών στην ξηρασία και η ικανότητα διάπαυσης στο στάδιο αυτό. Τα εν λόγω χαρακτηριστικά, σε συνδυασμό με την κλιματική αλλαγή και την ραγδαία ανάπτυξη των διεθνών μετακινήσεων καθιστούν ως λογική την ταχύτατη και μαζική εξάπλωση των κουνουπιών του γένους *Aedes* (Εικόνα 1.8) (57,58). Η εν λόγω εξάπλωση φαίνεται πως αρχίζει να απασχολεί και χώρες του βορείου ημισφαιρίου της Ευρώπης που μέχρι προσφάτως, λόγω κλίματος, δεν αντιμετώπιζαν το εν λόγω πρόβλημα (58). Το *Ae. albopictus* αποτελεί ένα από τα πιο χωροκατακτητικά είδη ανά τον κόσμο, λαμβάνοντας δε υπόψιν και το γεγονός ότι μεταδίδει ιούς όπως ο DENV, ο ZIKV και ο CHIKV γίνεται αντιληπτή η απειλή που αποτελεί για την δημόσια υγεία (58). Ενοχοποιείται στην εξάπλωση των ασθενειών που προκαλούν οι παραπάνω ιοί στον ευρωπαϊκό πληθυσμό, ενώ στην εγκαθίδρυσή του οφείλεται και η καταγραφή αυτόχthonων κρουσμάτων (58). Ήδη στην Ευρώπη έχουν καταγραφεί εξάρσεις, μεγαλύτερης ή μικρότερης έκτασης, της νόσου Chikungunya, με επίκεντρο κρουσμάτων την Ιταλία (2007, 2017) και τη Γαλλία (2010, 2014, 2017, 2024) (46,54,58). Αντίστοιχα δεδομένα υπάρχουν και για τον Δάγκειο, με καταγεγραμμένα κρούσματα σχεδόν σε ετήσια βάση σε Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία και Κροατία (54,58,59). Γίνεται αντιληπτό πως ο DENV σε αντίθεση με τον CHIKV εξαπλώνεται πολύ γρήγορα και σε μεγάλη κλίμακα στον ευρωπαϊκό χώρο, με τα τελευταία χρόνια να σημειώνεται μεγάλος αριθμός κρουσμάτων, γεγονός που προκαλεί ανησυχία (59). Ένας πιο αποτελεσματικός διαβιβαστής των παραπάνω ιών αποτελεί ένα άλλο είδος του γένους *Aedes*, το *Ae. aegypti* (60). Ιστορικά, το *Ae. aegypti* υπήρχε στην ευρωπαϊκή ήπειρο, ενώ ύστερα εξαφανίστηκε (60,61). Έκανε εκ νέου την εμφάνισή του όμως στην Πορτογαλία (νήσος Μαδέρα) και την Κύπρο όπου έχει εγκαθιδρυθεί και πρόσφατα εισέβαλε στα Κανάρια νησιά στην Ισπανία (61). Επικρατεί ανησυχία όμως, σχετικά με την περαιτέρω εξάπλωση του είδους και στις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες, είτε μέσω των θαλάσσιων και εναέριων μετακινήσεων, είτε ενόψει της ραγδαίας κλιματολογικής αλλαγής που υφίσταται ο πλανήτης (61).

Εικόνα 1.8 Χάρτης με τα χωροκατακτητικά είδη *Aedes* στην Ευρώπη (ECDC, 2024)



Αναφορικά με τα είδη *Ae. japonicus* και *Ae. koreicus*, αποτελούν είδη που έχουν εισβάλει πρόσφατα στην Ευρώπη έχοντας όμως μικρότερη εξάπλωση συγκριτικά με το *Ae. albopictus* και παρουσιάζουν παρόμοια οικολογία (62,63). Έρευνες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με την ικανότητά τους να μεταδώσουν ιούς έδειξαν πως τα είδη έχουν μικρή ικανότητα μετάδοσης των ιών που κυκλοφορούν στην Ευρώπη (58). Πιθανοί παθογόνοι παράγοντες που υπό προϋποθέσεις μπορεί να μεταδώσει το *Ae. japonicus* είναι οι JEV, WNV, SLEV και CHIKV, ενώ το *Ae. koreicus* τους CHIKV, ZIKV, JEV και το παράσιτο φιλάρια (58). Δεν έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα η ικανότητα μετάδοσης κάποιου παθογόνου από κάποιο από αυτά τα είδη στη φύση, δεν αποκλείεται όμως και πλήρως το σενάριο αυτό. Σε κάθε περίπτωση, χρειάζεται στενή παρακολούθηση λόγω της ταχείας εξάπλωσης που παρουσιάζουν.

Συμπερασματικά, η εισαγωγή νέων ειδών διαβιβαστών και των ιών που μεταφέρουν σε καινούριες γεωγραφικές περιοχές αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό πρόβλημα για την σύγχρονη κοινωνία. Η κλιματική αλλαγή είναι ένας από τους παράγοντες που κινούν αυτές τις διαδικασίες μαζί με την παγκοσμιοποίηση, την μετανάστευση ανθρώπων και ζώων, καθώς και τις συνεχείς μετακινήσεις σε οποιαδήποτε μεριά του πλανήτη εύκολα και γρήγορα (49). Επιπροσθέτως, παράγοντες όπως η αστικοποίηση και διαφορεική χρήση των χερσαίων εκτάσεων συμβάλουν στην εμφάνιση και νέο-εμφάνιση ασθενειών που ήταν

ξεχασμένες (49,55). Ιδιαίτερης σημασίας, λοιπόν, είναι αφενός η λήψη μέτρων αντιμετώπισης και καταπολέμησης των κουνουπιών, αφετέρου η συνεχής επιτήρηση προκειμένου να αποφευχθούν αντίστοιχα φαινόμενα στο μέλλον.

1.6 Τρόποι καταπολέμησης

Η καταπολέμηση των κουνουπιών κρίνεται απαραίτητη καθώς μεγάλο μέρος του πληθυσμού πλήττεται από μεταφερόμενες με διαβιβαστές ασθένειες, που πολλές φορές προκαλούν επιδημίες ή ακόμη και πανδημίες (64). Συνυπολογίζοντας την έλλειψη εξειδικευμένων φαρμάκων, κυρίως για τα νοσήματα που προκαλούνται από τους φλαβοϊούς, αλλά και την ύπαρξη εμβολίων ενάντια σε μεμονωμένες περιπτώσεις ιών, καθίσταται σαφής η σημαντικότητα της αποτελεσματικής διαχείρισης των διαβιβαστών (65,66). Με τον περιορισμό των διαβιβαστών, επιτυγχάνεται κατ' επέκταση και ο περιορισμός των νοσημάτων που δυνητικά μπορούν να μεταφέρουν, ως εκ τούτου είναι σημαντικό να εφαρμόζονται στοχευμένες στρατηγικές ελέγχου (64).

Διαφορετικές μεθοδολογίες εφαρμόζονται στη διεθνή βιβλιογραφία, προκειμένου να επιτευχθεί η εξάλειψη των κουνουπιών, μεταξύ των οποίων χημικές, βιολογικές και μηχανικές παρεμβάσεις (64). Οι χημικές μέθοδοι περιορισμού των κουνουπιών περιλαμβάνουν ένα φάσμα χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τον περιορισμό των ενήλικων σταδίων (64). Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι εντομοκτόνα, για ψεκασμούς τόσο σε εξωτερικούς, όσο και σε εσωτερικούς χώρους, αλλά και διάφορα είδη εντομοαπωθητικών για χρήση από τον άνθρωπο (15,64). Μελέτες έχουν όμως αναφέρει την ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής κάποιων ειδών κουνουπιών ενάντια στα εντομοκτόνα, γεγονός που μελλοντικά αναμένεται να προκαλέσει πρόβλημα στην αντιμετώπισή τους (66). Το πρόβλημα της αντοχής στα εντομοκτόνα έχει ήδη αρχίσει να διαφαίνεται σε χώρες της Ασίας και της Αφρικής, οπότε είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθοδολογικών προσεγγίσεων (64). Οι νέες αυτές στρατηγικές έχουν ως βάση πιο φιλικές για το περιβάλλον μεθόδους, σε αντίθεση με τα εντομοκτόνα που αποτελούν τοξικές ουσίες, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον, ενδεικτικό παράδειγμα αποτελούν οι βιολογικές μέθοδοι αντιμετώπισης (64,66). Μερικές από τις «πράσινες» και πολλά υποσχόμενες τεχνικές είναι η γενετική τροποποίηση των αρσενικών κουνουπιών που τα μετατρέπει σε στείρα (Sterile Insect Technique, SIT), που αποτελεί βελτιωμένη εκδοχή της τεχνικής εξαπόλυσης εντόμων που φέρουν ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Release of Insects

carrying a Dominant Lethal gene, RIDL) (15). Επιπρόσθετα, εξετάζεται και δοκιμάζεται η αποτελεσματικότητα χρήσης μυκήτων, ψαριών, βακτηρίων και βακτηριακών προϊόντων, καθώς και πρωτόζωων, που στοχεύουν στην εξάλειψη των ανώριμων σταδίων των εντόμων (64,66). Τέλος, υπάρχουν και τα μηχανικά μέσα περιορισμού των κουνουπιών, στα οποία εντάσσονται οι παγίδες, με χημικά προσελκυστικά τις περισσότερες φορές (64).

Καμία τεχνική δεν είναι πανάκεια, όλες εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, το σημαντικό όμως είναι ότι γίνονται βήματα προς τη σωστή κατεύθυνση και υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης για πολλές από αυτές (15). Οι μέθοδοι συνεχώς βελτιώνονται και βρίσκονται λύσεις για πιο βιώσιμες και οικολογικές μορφές. Δεδομένου ότι η Ελλάδα εντάσσεται μεταξύ των χωρών όπου έχει καταγραφεί αντοχή των *Cx. pipiens* στα εντομοκτόνα, μαζί με την Ισπανία, το Μαρόκο, την Ιταλία, το Βέλγιο, την Τουρκία, το Ιράν και την Αίγυπτο, καθίσταται επιβεβλημένη η εφαρμογή εναλλακτικών μορφών καταπολέμησης (67).

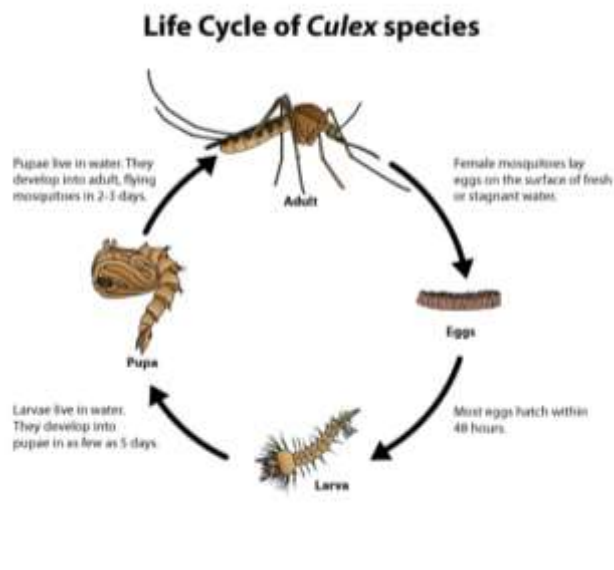
2. *Culex pipiens*

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το γένος *Culex* αριθμεί περισσότερα των 750 ειδών που απαντώνται παγκοσμίως, ορισμένα από τα οποία αποτελούν και σημαντικούς διαβιβαστές ασθενειών (10,68). Τα κουνούπια του είδους *Culex pipiens* ή αλλιώς αστικό κουνούπι, αποτελούν μέλη ενός συμπλέγματος που απαρτίζεται από είδη, υποείδη και μορφές που δεν μπορούν να διακριθούν μορφολογικά μεταξύ τους, παρά μόνο με τη βοήθεια μοριακών μεθόδων (10,68). Οι διαφορές που εμφανίζουν εστιάζονται αποκλειστικά στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών (10,68). Σε αυτό το σύμπλεγμα, μεταξύ άλλων, ανήκουν τα *Cx. globocoxitus*, *Cx. quiniefasciatus*, *Cx. australicus*, *Cx. pallens*, *Cx. pipiens f. pipiens*, *Cx. pipiens f. molestus* (69). Το κουνούπι *Cx. pipiens* είναι μεσαίου μεγέθους, με καφέ ανοιχτό χρώμα, χαρακτηριστικό που το διαχωρίζει εύκολα από τα υπόλοιπα κουνούπια που κυκλοφορούν στον ευρωπαϊκό χώρο (10). Παράλληλα, χωρίζεται σε δύο βιότυπους, τον βιότυπο *pipiens* και τον βιότυπο *molestus*, που διαφέρουν στον τρόπο που αναπτύσσουν τα αυγά τους (με τη λήψη γεύματος αίματος ή χωρίς), στους ξενιστές από τους οποίους λαμβάνουν αίμα (πτηνά, θηλαστικά) και στο αν διαχειμάζουν ή όχι (68). Επιπλέον, οι δύο αυτές μορφές διαφέρουν και στην επιλογή περιβάλλοντος που κυκλοφορούν και ζευγαρώνουν, η μορφή *molestus* προτιμάει πιο δροσερά και περιορισμένα από άποψη χώρου περιβάλλοντα, σε αντίθεση με τη μορφή *pipiens* (68,70). Τα κουνούπια αυτού του γένους έχουν χαρακτηριστεί ως τα πλέον ορνιθόφιλα, με κάποια είδη να έχουν ως αποκλειστική πηγή αίματος τα πτηνά (71). Οι διατροφικές συνήθειες των κουνουπιών παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκθεση των ξενιστών σε παθογόνα και στην περαιτέρω διασπορά τους (71).

Τα θηλυκά *Cx. pipiens* επιλέγουν να εναποθέσουν τα αυγά τους στην επιφάνεια νερού σε συστάδες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1 και μπορεί να περιλαμβάνουν μέχρι και 200 αυγά. Οι συνθήκες του περιβάλλοντος καθορίζουν την ταχύτητα με την οποία θα εκκολαφθούν τα αυγά, αλλά και τις γενιές που θα προκύψουν σε ετήσια βάση (10). Όσο πιο ευνοϊκές είναι οι συνθήκες (π.χ. μεγαλύτερες θερμοκρασίες), τόσο γρηγορότερα θα προκύψουν νέες γενιές εντόμων. Ένα (1) ακόμη στοιχείο που χαρακτηρίζει τα κουνούπια του είδους *Cx. pipiens* και τα ξεχωρίζει από άλλα είδη, είναι η ικανότητά τους να χρησιμοποιούν κάθε μορφή υδάτινης πηγής για την εναπόθεση των αυγών (καθαρή ή ακόμη και μολυσμένη) (10). Το εν λόγω χαρακτηριστικό διευκολύνει σημαντικά τον τρόπο αναπαραγωγής στο συγκεκριμένο είδος κουνουπιού.

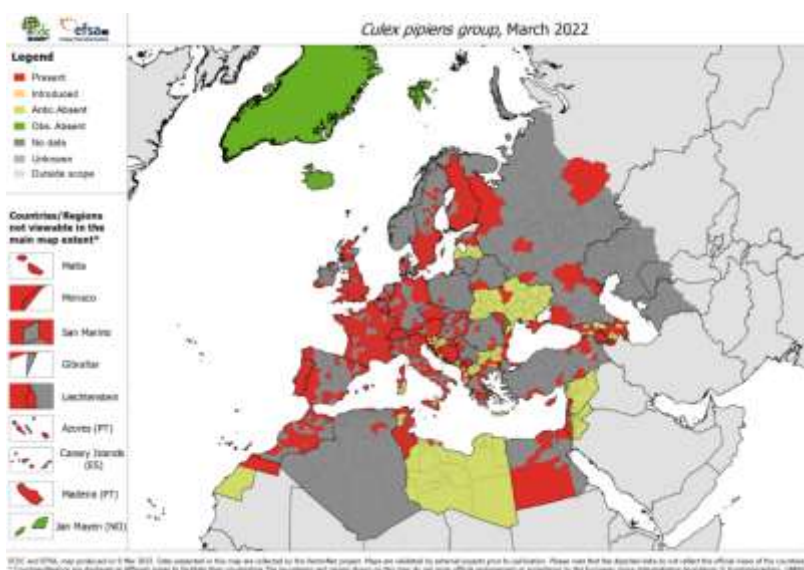
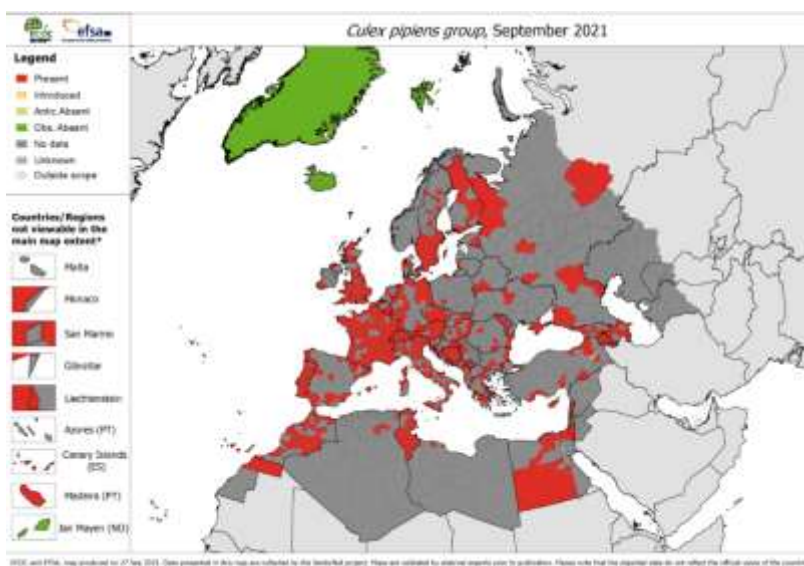
Εικόνα 2.1 Βιολογικός κύκλος των ειδών *Culex* (CDC, 2022)

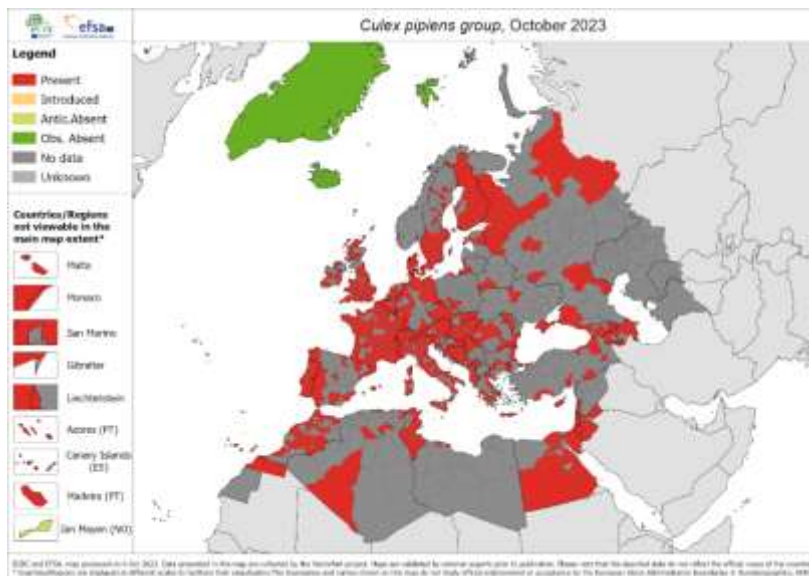


2.2 Γεωγραφική κατανομή

Τα κουνούπια *Cx. ripiens* πρωτοεμφανίστηκαν στη Βόρεια Αφρική, ακολούθως εξαπλώθηκαν και σε άλλα μέρη του κόσμου, όπου και εγκαταστάθηκαν (72). Μέσα από αλλαγές που οδήγησαν σε γενετική προσαρμογή των κουνουπιών σε κλιματικές συνθήκες διαφορετικές από το τροπικό κλίμα της Αφρικής, κατάφεραν να ενδημήσουν και σε μέρη ψυχρότερα (72). Μέχρι σήμερα, έχουν εξαπλωθεί στην Ευρώπη, την Αφρική και την Ασία, ενώ απαντώνται και σε περιοχές της Αυστραλίας και της Αμερικής (73). Στην Εικόνα 2.2 παρατίθεται η γεωγραφική κατανομή των κουνουπιών από το 2020 μέχρι και το 2023 (ECDC, 2023). Από αυτούς τους χάρτες γίνεται αντιληπτό πως μέχρι και σήμερα η κατανομή των κουνουπιών δεν είναι μια στατική, αλλά μια δυναμική κατάσταση. Παρά την σταθερή κυκλοφορία του αστικού κουνουπιού στον ευρωπαϊκό χώρο, φαίνεται πως δεν μπορεί να θεωρηθεί δεδομένη η παρουσία ή η απουσία του μεταξύ των διαφόρων χωρών. Υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής και της απειλής αναδυόμενων και νέο-αναδυόμενων ασθενειών, απαιτείται συνεχής επιτήρηση και καταγραφή της εξάπλωσης των κουνουπιών (74).

Εικόνα 2.2 Γεωγραφική κατανομή του *Culex pipiens* στον ευρωπαϊκό χώρο από το 2020 έως και το 2023 (ECDC, 2023)





2.3 *Culex pipiens* και Ασθένειες

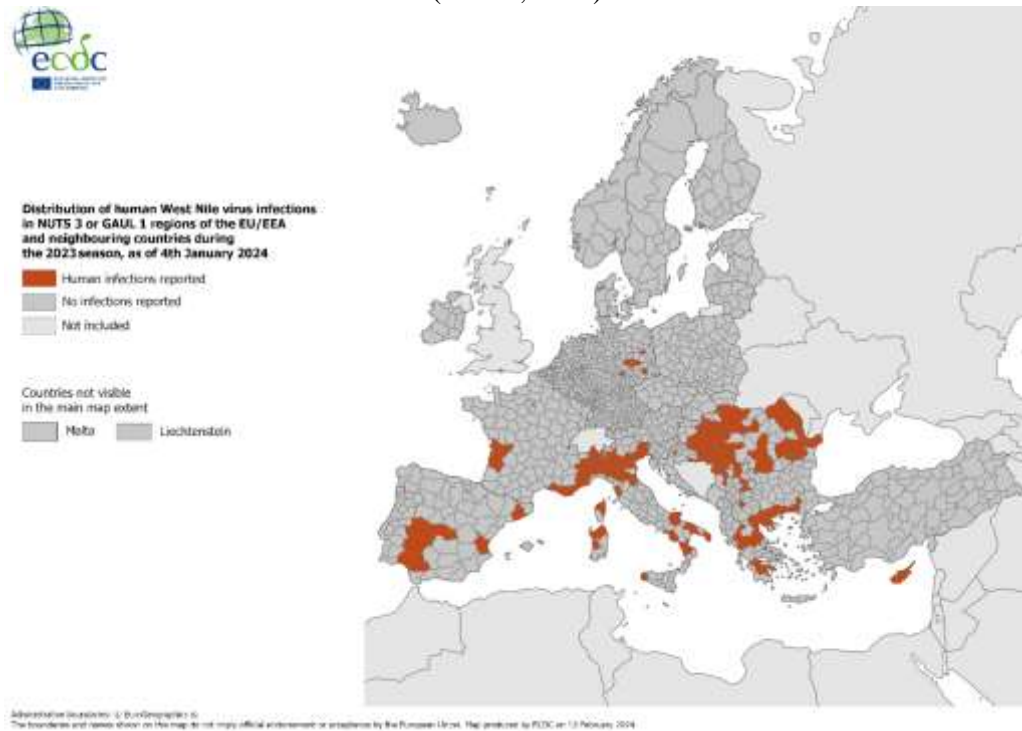
Το κουνούπι *Cx. pipiens* παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά αρκετών παθογόνων που προσβάλλουν τόσο τους ανθρώπους, όσο και τα πτηνά, προκαλώντας ασθένειες (75,76). Αποτελεί ένα ευρέως κατανομημένο είδος κουνουπιού, με ετερόκλιτους ξενιστές από τους οποίους λαμβάνει τα γεύματα αίματος, γεγονός που αποδίδεται στο ότι έρχεται σε επαφή με αρκετά παθογόνα, τα οποία δυνητικά μπορεί να μεταδώσει μεταξύ του δικτύου ξενιστών που διαθέτει (76). Διαθέτει την ικανότητα μετάδοσης, μεταξύ άλλων, παθογόνων όπως ο WNV, ο USUV, ο JEV, ο SINV, ο SLEV, οι φιλάριες, αλλά και το πλασμώδιο που προκαλεί ελονοσία στα πτηνά (75,76). Η ικανότητα μετάδοσης των ιών του Δάγκειου, Chikungunya και Zika δεν έχει αποδειχθεί έως τώρα (75).

Ο WNV αποτελεί έναν από τους πιο διαδεδομένους ιούς που μεταδίδει αυτό το είδος, αριθμώντας αρκετά κρούσματα παγκοσμίως σε ανθρώπους, άλογα και πτηνά (75). Αυξημένη είναι η κυκλοφορία και στην Ευρώπη τα τελευταία χρόνια, αποτελώντας μία από τις πιο διαδεδομένες ασθένειες που μεταδίδονται με διαβιβαστές και προκαλώντας εξάρσεις (75). Αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες ανάπτυξης εγκεφαλίτιδας στον κόσμο και μπορεί να προκαλέσει νευρολογικά συμπτώματα, ακόμη και θάνατο (77,78). Η νόσος που προκαλεί είναι συνήθως ασυμπτωματική ή με ήπια συμπτώματα που ομοιάζουν αυτά της γρίπης (πυρετό, κεφαλαλγίες, μυαλγίες, κόπωση), ενώ αναφέρονται και γαστρεντερολογικές διαταραχές (ναυτία, έμετος, διάρροια) (78). Η μορφή αυτή της νόσησης ονομάζεται πυρετός του Δυτικού Νείλου (West Nile Fever, WNF) και διαρκεί 3-6 ημέρες (77,78). Ελάχιστες περιπτώσεις εμφανίζουν σοβαρά συμπτώματα, όπως εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, παράλυση,

ακόμη και θάνατο, οπότε πλέον αναφερόμαστε στη νευροδιδεισδυτική μορφή της ασθένειας (West Nile Neuroinvasive Disease, WNND) (75,78). Δύο τύποι του ιού (lineages) έχουν ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση νόσου στην πλειονότητα των ανθρώπινων και ζωικών κρουσμάτων, ο WNV-1a και ο WNV-2 (79,80).

Ο WNV συναντάται σε χώρες της Αφρικής, της Ευρώπης, της Μέσης Ανατολής, της Βόρειας Αμερικής και της Δυτικής Ασίας, με τις μεγαλύτερες εξάρσεις να σημειώνονται στην Ελλάδα, το Ισραήλ, τη Ρουμανία, τη Ρωσία και τις ΗΠΑ (77). Στην Ευρώπη ο ιός ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην Αλβανία και τη Γαλλία το 1958 και το 1962, αντίστοιχα, ενώ έκτοτε πέρασαν χρόνια μέχρι την πρώτη έξαρση με αρκετά ανθρώπινα κρούσματα στη Ρουμανία (1996) (79). Ολοένα και αυξανόμενος ήταν ο αριθμός των εξάρσεων με υπεύθυνο στέλεχος τον WNV-1, τις τελευταίες δεκαετίες όμως το φαινόμενο έχει μεγεθυνθεί και κύριος υπαίτιος είναι ο WNV-2 (συγκεκριμένα από το 2004 και μετά) που αποδείχθηκε πολύ πιο λοιμογόνος (79,81). Τις χρονιές 2010 και 2018 η επίπτωση της νόσου ήταν εξαιρετικά υψηλή (79). Μετά την μεγάλη έξαρση του 2010 ξεκίνησε, υπό την αιγίδα του ECDC, οργανωμένη επιτήρηση και καταγραφή των κρουσμάτων WNV σε πουλιά, άλογα, κουνούπια και ανθρώπους σε πολλές χώρες της Ευρώπης (79,82). Το 2010 καταγράφηκαν συνολικά 262 ανθρώπινα κρούσματα και 35 θάνατοι, ενώ τις επόμενες χρονιές ο αριθμός κρουσμάτων παρέμεινε σταθερός. Το 2018 τα καταγεγραμμένα κρούσματα έφτασαν τα 2.083, ξεπερνώντας αθροιστικά τα κρούσματα από όλες τις προηγούμενες χρονιές (79,83). Μετά το 2018, το 2022 ήταν επίσης μια χρονιά με αρκετά κρούσματα συγκριτικά όμως λιγότερα, μόλις 1.339 (83). Σύμφωνα με τα τελευταία επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με την κατάσταση για τον WNV το 2023 καταγράφηκαν συνολικά στην Ευρώπη 728 ανθρώπινα κρούσματα, εκ των οποίων τα 709 αφορούσαν εγχώρια μετάδοση και 19 εισαγόμενα (83). Οι χώρες με την μεγαλύτερη επίπτωση ήταν η Ιταλία, η Ελλάδα και η Ρουμανία με 336, 162 και 103 κρούσματα, αντίστοιχα. Ακολούθησαν η Γαλλία με 43, η Ουγγαρία με 29, η Ισπανία με 19, η Γερμανία και η Κροατία με έξι και η Κύπρος με πέντε καταγεγραμμένα κρούσματα (Εικόνα 2.3) (83). Τη χρονιά αυτή σημειώθηκαν 67 θάνατοι, ενώ με δεδομένο τον αριθμό των επηρεαζόμενων περιοχών αποτέλεσε το υψηλότερο ρεκόρ μετά το 2018 καταδεικνύοντας την αυξημένη εξάπλωσή του ιού (84). Παράλληλα, κρούσματα καταγράφηκαν σε ξενιστές του ιού, όπως είναι τα άλογα αλλά και τα πουλιά (83).

Εικόνα 2.3 Χάρτης της Ευρώπης με ανθρώπινα κρούσματα λοίμωξης από WNV το 2023 (ECDC, 2024)



Η Ελλάδα ιδιαίτερα έχει αποτελέσει επίκεντρο εξάρσεων WNV, με αποκορύφωμα τις χρονιές 2010, 2018 και 2022, που καταγράφηκαν οι μεγαλύτεροι αριθμοί κρουσμάτων, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες (85). Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα ευρωπαϊκά δεδομένα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (83). Συγκεκριμένα, το 2010 σύμφωνα με την έκθεση του ΚΕΕΛΠΝΟ, καταγράφηκαν συνολικά 262 ανθρώπινα κρούσματα με την πλειονότητα των κρουσμάτων να εντοπίζονται στην Κεντρική Μακεδονία (86). Αντίστοιχα, το 2018 καταγράφηκαν συνολικά 317 ανθρώπινα κρούσματα (μέχρι και σήμερα ο μεγαλύτερος καταγεγραμμένος αριθμός) με επίκεντρο έξαρσης Περιφέρειες όπως η Κεντρική Μακεδονία και η Αττική (87). Στην τρίτη μεγάλη έξαρση τη χρονιά 2022, σύμφωνα με τον ΕΟΔΥ καταγράφηκαν στη χώρα 286 κρούσματα, η πλειοψηφία των οποίων ήταν και πάλι εστιασμένη στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας (88).

Ο WNV εμφανίζει ενδημικότητα και στις ΗΠΑ προκαλώντας πολυάριθμα κρούσματα ετησίως. Τα πρώτα κρούσματα εμφανίστηκαν το 1999 στην πολιτεία της Νέας Υόρκης και έκτοτε εγκαταστάθηκε με μεγάλη επιτυχία καταγράφοντας αρκετές χιλιάδες κρούσματα ετησίως (89). Μέχρι το 2002, ο ιός είχε εξαπλωθεί ταχύτατα στα ανατολικά της χώρας σε πολλές Πολιτείες, προκαλώντας εξάρσεις και θανάτους όχι μόνο σε ανθρώπους αλλά και σε

πουλιά και άλογα (90). Η πιο έντονη χρονιά ήταν το 2003 με τις ΗΠΑ να καταγράφουν 9.862 ανθρώπινα κρούσματα και 264 θανάτους, ενώ από το 2002 μέχρι και το 2007 ο αριθμός των κρουσμάτων παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (89,90). Ακολούθησε μία απότομη πτώση μέχρι που το 2012 αυξήθηκαν εκ νέου, σημειώνοντας 5.674 νέες περιπτώσεις (89,90). Μετά από αυτές τις εξάρσεις δεν σημειώθηκαν άλλα παρόμοια περιστατικά, ενώ κατά μέσο όρο καταγράφονται περίπου 2.000 κρούσματα WNV ετησίως (90).

Ο ιός Usutu από την άλλη, έχει κερδίσει έδαφος με την εξάπλωσή του σε αρκετές χώρες της Ευρώπης και κατά κύριο λόγο προκαλεί νόσο που προσβάλλει πτηνά και ανθρώπους (75). Στοιχεία σχετικά με τη νόσο που προκαλεί δείχνουν αρκετές ομοιότητες με τον WNV, προκαλώντας συνήθως ήπια νόσηση, με λίγα σοβαρά περιστατικά (75). Ο ιός Sindbis μεταδίδεται επίσης από το *Cx. pipiens*, προσβάλλοντας κυρίως άλογα, πτηνά και περιστασιακά τον άνθρωπο (75). Καταγραφές κλινικών περιστατικών του συγκεκριμένου ιού στην Ευρώπη υπάρχουν ελάχιστες και τα συμπτώματα που προκαλεί είναι ήπια, περιλαμβάνοντας εξάνθημα και χρόνια πολυαρθρίτιδα (75). Σε κάποιες Σκανδιναβικές χώρες και τη Ρωσία, η νόσος που προκαλεί έχει λάβει τα ονόματα «ασθένεια Ockelbo», «ασθένεια Rogosta» και «πυρετός Karellian» (75).

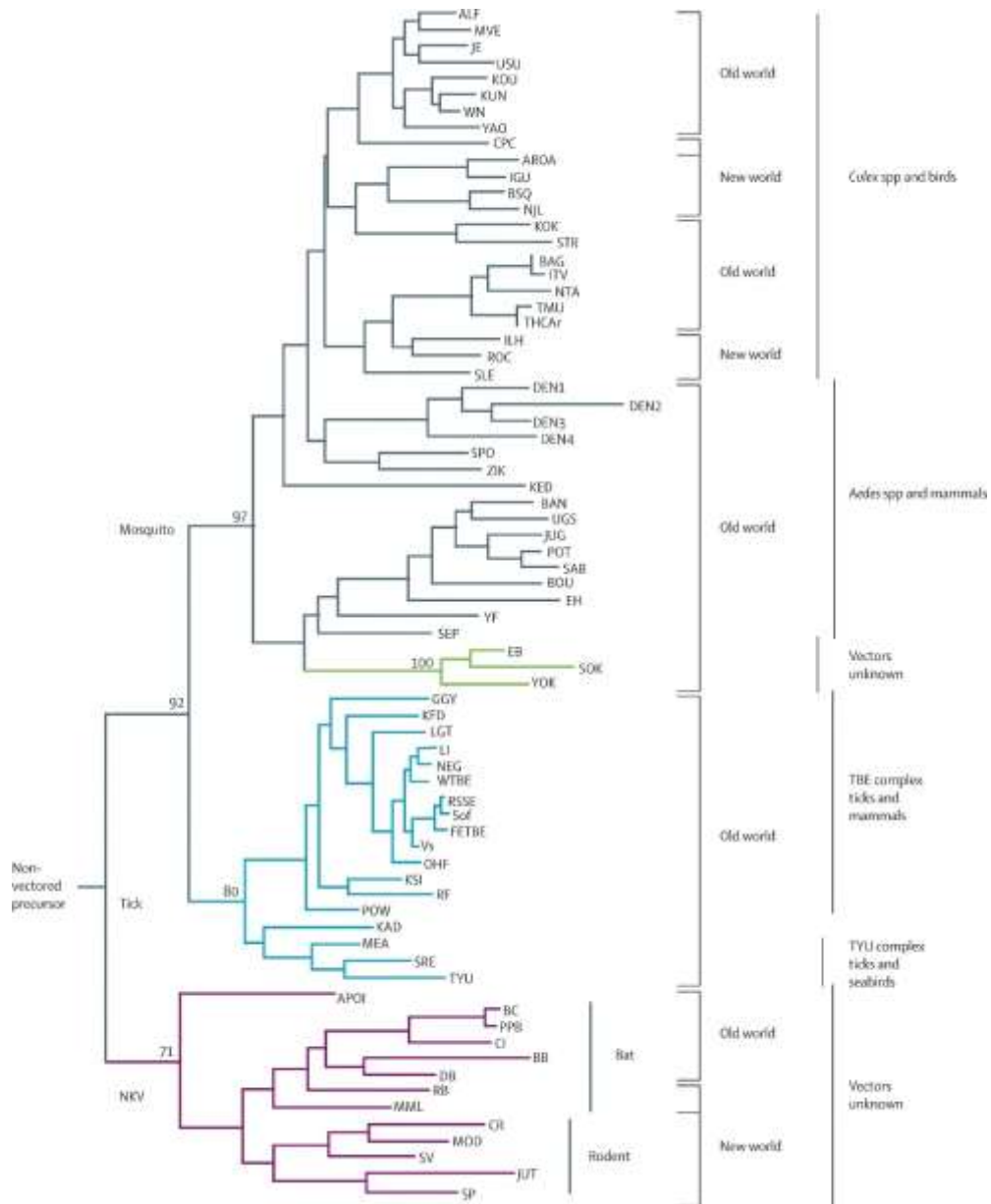
3. Ιός Usutu

3.1 Γενικά

Ο ιός Usutu αποτελεί περίπτωση φλαβοϊού που ανήκει στην οικογένεια *Flaviviridae* και μεταδίδεται κυρίως με το τσίμπημα μολυσμένου αρthropόδου και πιο συγκεκριμένα κουνουπιού (91). Από ταξινομικής άποψης, ανήκει στο σύμπλεγμα ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, μαζί με τον WNV και τον JEV, με τους οποίους βρίσκεται επίσης κοντά φυλογενετικά (Εικόνα 3.1) (92). Η παρουσία του και η παραμονή του στο περιβάλλον επιτυγχάνεται μέσω ενός ενζωοτικού κύκλου που περιλαμβάνει κυρίως κουνούπια και πουλιά, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μολύνει ανθρώπους και λοιπά θηλαστικά (91,93).

Ο ιός απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1959 από κουνούπι *Culex neavei*, ενώ πήρε το όνομά του από τον ποταμό Usutu στη Σουαζιλάνδη της Νότιας Αφρικής (92). Παρά το γεγονός ότι η κυκλοφορία του ήταν αρχικά εντοπισμένη στην Αφρική, το 2001 εντοπίστηκε και στην Ευρώπη (συγκεκριμένα στη Βιέννη), όπου και ενοχοποιήθηκε για μαζικούς θανάτους κοτσυφιών και γκρίζων κουκουβαγιών (94). Αναδρομικές μελέτες σε πεθαμένα πουλιά στην Ιταλία έδειξαν πως ο ιός είχε εισέλθει στον ευρωπαϊκό χώρο νωρίτερα, ήδη από το 1996 (94). Εικάζεται ότι ο ιός εισήχθη στην Ευρώπη, ήδη από το 1950, μέσω των αποδημητικών πτηνών και των διαδρομών που ακολουθούν από την Αφρική, ενώ ακολούθως πραγματοποιήθηκε διασπορά μεταξύ γειτονικών χωρών (94,95). Ευρήματα έχουν αναδείξει οκτώ διακριτούς κλάδους του USUV, εκ των οποίων οι πέντε είναι ευρωπαϊκοί (EU1, EU2, EU3, EU4 και EU5) και οι τρεις αφρικανικοί (AF1, AF2 και AF3), οι οποίοι συν-κυκλοφορούν στην Ευρώπη και φαίνεται να έχουν διαφορετική παθογένεια και γεωγραφική κατανομή (96). Αξίζει να σημειωθεί ότι η είσοδος του ιού στην κεντρική Ευρώπη εκτιμάται πως έγινε τρεις φορές, με επικρατέστερη πηγή προέλευσης τη Σενεγάλη (95), ενώ πιθανολογείται ότι κεντρικό ρόλο στη διασπορά του εντός της ηπείρου διαδραμάτισε η Ιταλία (97). Τα αρχικά στελέχη του ιού είναι τα αφρικανικά που διαφοροποιήθηκαν, μέσω μεταλλάξεων στο ιικό γονιδίωμα, στα ευρωπαϊκά (95,96) και στην πορεία διαφοροποιήθηκαν εκ νέου με νέες μεταλλαγές (97).

Εικόνα 3.1 Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις σχέσεις μεταξύ διαφορετικών φλαβοϊών (Lancet, 2008)



3.2 Ξενιστές – Διαβιβαστές του ιού Usutu

Ο ιός Usutu διατηρείται στη φύση μέσω ενός ενζωτικού κύκλου που περιλαμβάνει πτηνά ως ξενιστές, μέσω των οποίων πολλαπλασιάζεται και κουνούπια ως διαβιβαστές (92). Κύριοι ξενιστές αποτελούν πτηνά, όπως το κοτσούφι (*Turdus merula*), η κίσσα (*Pica pica*), η μεγάλη γκρι κουκουβάγια (*Strix nebulosa*), το κοινό γεράκι (*Falco tinnunculus*), ο

λαλοτσιροβάκος (*Sylvia curruca*), ο μαυρομυγοχάφτης (*Ficedula hypoleucas*) και το ψαρόνι (*Sturnus vulgaris*) (92,94). Διαφορετικά είδη πτηνών ευθύνονται για τη μεταφορά του ιού από την Αφρική στην Ευρώπη (κυρίως τα αποδημητικά) και διαφορετικά για την μετάδοση του ιού εντός της Ευρώπης (93). Η προσβολή πληθυσμών πτηνών από τον ιό προκαλεί μεγάλη θνησιμότητα, πιθανώς λόγω του υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού και διεισδυτικότητας του ιού σε πολλά όργανα και ιστούς (94), με χαρακτηριστικό παράδειγμα το μαζικό θάνατο άγριων πτηνών στην Αυστρία το 2001 (98). Αντίστοιχα περιστατικά έχουν καταγραφεί και σε άλλες χώρες, πιο συγκεκριμένα στην Ουγγαρία το 2005, στην Ιταλία, την Ελβετία και την Ισπανία το 2006, στη Γερμανία και την Τσεχία το 2011, στο Βέλγιο το 2012 και στη Γαλλία το 2015 (98). Ο αυξημένος βαθμός ιαιμίας καθιστά τα πτηνά φυσικές «αποθήκες» του ιού, καθότι είναι ικανά να μολύνουν τους διαβιβαστές και κατ' επέκταση και άλλους ξενιστές (94).

Εκτός από τα πτηνά, ο ιός μπορεί να προσβάλλει και άλλους ξενιστές, όπως τα θηλαστικά. Συγκεκριμένα, ο ιός έχει ανιχνευθεί σε νυχτερίδες, σκίουρους, τρωκτικά, σκύλους, ελάφια, αγριογούρουνα, άλογα, αλλά και στον άνθρωπο (92,94). Η πολλαπλασιαστική ικανότητα και άρα η παθογένειά του δεν είναι ίδια με αυτή που παρατηρείται στα πτηνά (94), γεγονός που καθιστά τους ξενιστές αυτούς «αδιέξοδους» (dead-end hosts), δεν δύνανται δηλαδή να ξεκινήσουν έναν νέο κύκλο μετάδοσης του ιού (99).

Διαβιβαστές του ιού αποτελούν τα κουνούπια, με διάφορα είδη να ενοχοποιούνται για τη μετάδοσή του, ο κύριος όμως διαβιβαστής στην Ευρώπη φαίνεται να ανήκει στο γένος *Culex* και συγκεκριμένα σε κουνούπια του είδους *Culex ripiens* (92,94). Σε διάφορες μελέτες ο ιός έχει ανιχνευθεί και σε άλλα γένη κουνουπιών, όπως τα γένη *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Ochlerotatus* και *Mansonia* (92,94). Στον Πίνακα 3.1 παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα είδη στα οποία έχει ανιχνευθεί ο ιός Usutu.

Πίνακας 3.1 Είδη κουνουπιών που έχουν βρεθεί μολυσμένα με τον USUV (92)	
Γένος	Είδος
<i>Aedes</i>	<i>Ae. albopictus</i>
	<i>Ae. vexans</i>
	<i>Ae. japonicus</i>
	<i>Ae. minutus</i>
<i>Anopheles</i>	<i>Anopheles maculipennis</i>

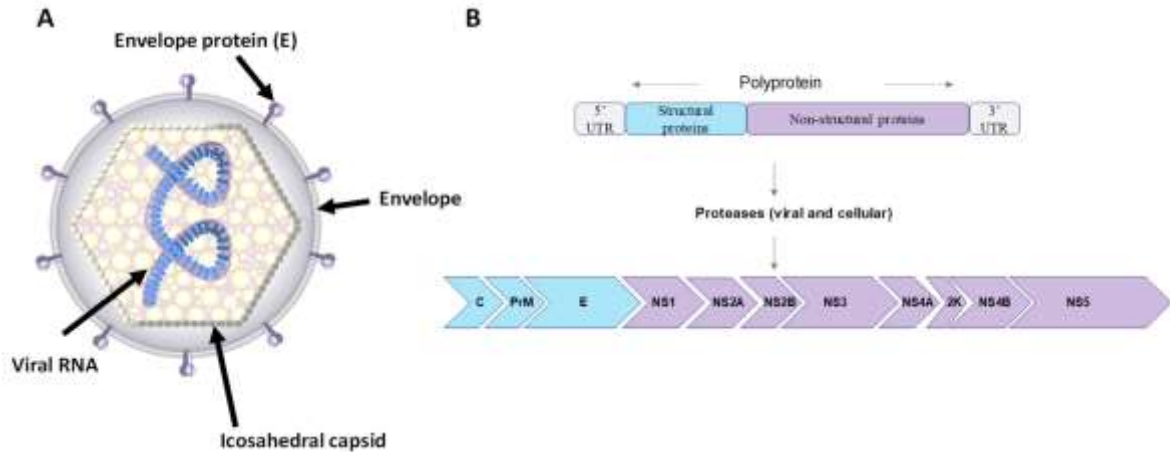
	<i>Anopheles plubeus</i>
<i>Culiseta</i>	<i>Culiseta annulata</i>
<i>Coquillettidia</i>	<i>Coquillettidia richiardii</i>
	<i>Cx. modestus</i>
	<i>Cx. neavei</i>
	<i>Cx. perexiguus</i>
<i>Culex</i>	<i>Cx. perfuscus</i>
	<i>Cx. pipiens</i>
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>
	<i>Cx. univittatus</i>
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Oc. caspius</i>
	<i>Oc. detritus</i>
<i>Mansonia</i>	<i>Ma. africana</i>
	<i>Ma. aurites</i>

3.3 Γονιδίωμα

Ο ιός Usutu έχει σφαιρικό σχήμα, με διάμετρο 40-60 nm, εξωτερικά περιβάλλεται από τον ιικό φάκελο και εσωτερικά φέρει λιπιδικό εικοσαεδρικό καψίδιο μέσα στο οποίο βρίσκεται το γονιδίωμά του (Εικόνα 3.2) (100). Είναι ιός με θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA, μήκους περίπου 11.000 νουκλεοτιδικών βάσεων, φέρει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) που κωδικοποιεί μία μοναδική πολυπρωτεΐνη (101). Η πολυπρωτεΐνη έχει μήκος 3.400 αμινοξέων περίπου και αποτελείται από τα 5' και 3' αμετάφραστα άκρα (5'-UTR και 3'-UTR αντίστοιχα) (100,101). Μεταξύ των αμετάφραστων άκρων βρίσκονται περιοχές που στην πορεία, ύστερα από επεξεργασία με πρωτεάσες του ίδιου του ιού και του ξενιστή, θα μετατραπούν σε δομικές και μη-δομικές πρωτεΐνες (Εικόνα 3.2) (100,101). Υπάρχουν τρεις δομικές πρωτεΐνες, του καψιδίου, της προμεμβράνης και του φακέλου, οι C, PrM και η E, αντίστοιχα και επτά μη-δομικές πρωτεΐνες, οι NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5 (100). Η κάθε μία από τις μη-δομικές πρωτεΐνες έχει τη δική της λειτουργία, είτε ως ένζυμο είτε όχι, δρώντας συνεργιστικά για τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού, τη συναρμολόγηση και την επιβίωση του ιού μέσα στον ξενιστή (102). Σημειακές μεταλλαγές στο γονιδίωμα του ιού οδήγησαν στην διαφοροποίησή του σε στελέχη (lineages), αλλά και στην επιλογή των

ξενιστών, ενώ αρχικά ο ιός εντοπιζόταν σε διάφορα είδη πτηνών, προσαρμόστηκε σε βάθος χρόνου και σε είδη θηλαστικών (95).

Εικόνα 3.2 (Α) Δομή του ιού **(Β)** Δομή της πολυπρωτεΐνης που κωδικοποιεί το RNA του USUV (MDPI, 2022)

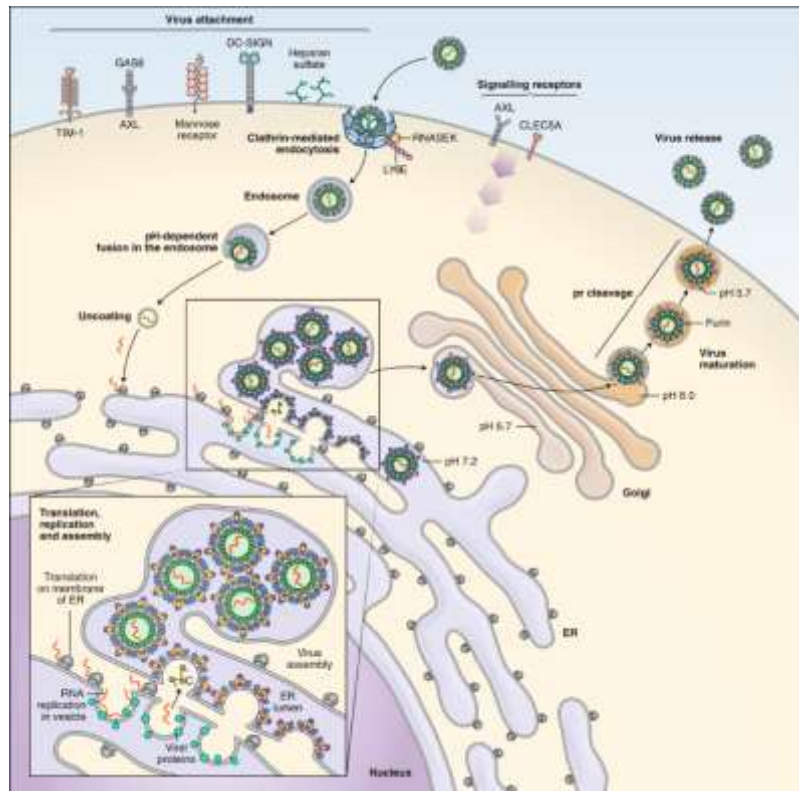


3.4 Βιολογικός κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος των φλαβοϊών μπορεί να χωριστεί σε διακριτά στάδια, το πρώτο στάδιο αφορά την είσοδο του ιού στα κύτταρα που επιτυγχάνεται με την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη, το δεύτερο αφορά τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος και το τρίτο τη συναρμολόγηση και απελευθέρωση για να ξεκινήσει εκ νέου ο κύκλος (Εικόνα 3.3) (103). Η είσοδος του ιού στο κύτταρο πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης της γλυκοπρωτεΐνης E, που εκφράζεται στην επιφάνειά του, με ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της ενδοκυττάρωσης (103). Μετά την είσοδο στο κύτταρο, το RNA του ιού απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, όπου και χρησιμοποιεί τους μηχανισμούς του κυττάρου για να μεταφραστεί στην πολυπρωτεΐνη (102,103). Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πολυπρωτεΐνης και ο διπλασιασμός του ιϊκού RNA λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αφού πραγματοποιηθεί η μετάφραση και η τροποποίηση της πολυπρωτεΐνης, το θετικής πολικότητας RNA του ιού χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από τη μη-δομική πρωτεΐνη 5 (NS5), προκειμένου να δημιουργηθεί ένα ενδιάμεσο αρνητικής πολικότητας RNA (103). Το ενδιάμεσο RNA θα χρησιμεύσει στη συνέχεια ως εκμαγείο είτε για την παραγωγή νέων RNA για τους νεοσυντιθέμενους ιούς, είτε για μετάφραση (103). Το RNA ακολούθως αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη C και σχηματίζεται ένας προϊός στον ενδοκυττάριο χώρο ανάμεσα στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (102,104).

Μέσα από μία σειρά διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi, ο προϊός ωριμάζει και καταλήγει στην τελική του μορφή, οπότε και εξέρχεται από το κύτταρο (102).

Εικόνα 3.3 Βιολογικός κύκλος ενός φλαβοϊού (Nature, 2020)



3.5 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Ο ιός Usutu είναι ικανός να προσβάλλει αρκετά είδη οργανισμών, μεταξύ άλλων θηλαστικά και πτηνά, σοβαρή νόσο όμως προκαλεί μόνο στα πτηνά με καταγραφές μαζικών θανάτων σε διάφορες χώρες (105). Στους ανθρώπους από την άλλη, προκαλεί συνήθως ήπια ή ασυμπτωματική νόσο, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μόνο οδηγεί σε νευροδιεισδυτική νόσο (106). Τα δεδομένα για την παθογένεια του ιού είναι περιορισμένα και κυρίως εστιάζονται στα πουλιά, καθώς τα ανθρώπινα περιστατικά που έχουν καταγραφεί είναι ελάχιστα στη διεθνή βιβλιογραφία. Στην Εικόνα 3.4 παρακάτω φαίνονται αναλυτικά τα κρούσματα από τον USUV σε ανθρώπους και πτηνά, καθώς και ευρήματα σε κουνούπια στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ηπείρου αλλά και τα στελέχη του ιού. Η πληροφορία που παρέχεται καταδεικνύει τη διαφορετικότητα των στελεχών που κυκλοφορούν στον ευρωπαϊκό χώρο

με κοινό παρονομαστή, στις περισσότερες περιπτώσεις, την ένταξη στον ευρωπαϊκό κλάδο ενώ υπάρχουν και ελάχιστες περιπτώσεις να αφορούν στελέχη του αφρικανικού κλάδου (Εικόνα 3.4) (99).

Εικόνα 3.4 Χάρτης όπου φαίνονται κρούσματα του ιού Usutu σε ανθρώπους, κουνούπια και πτηνά, όπως επίσης και το στέλεχος του ιού (MDPI, 2024)



Τα όργανα που προσβάλλονται συνηθέστερα στα πουλιά είναι το ήπαρ, ο σπλήνας, η καρδιά και τα νεφρά, ενώ έχουν παρατηρηθεί και βλάβες στο νευρικό σύστημα. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται οργανομεγαλία, όπως ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία και νεφρομεγαλία, με το πιο κοινό και χαρακτηριστικό εύρημα να είναι η σπληνομεγαλία και η ηπατομεγαλία (105,106). Ο ιός εντοπίζεται και προκαλεί βλάβες και στα κύτταρα του νευρικού συστήματος, όπου και αναγνωρίζεται με το σύμπτωμα του στριφογυρισμένου λαιμού και της ανικανότητας πτήσης, όπως επίσης και στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα των πτηνών (105,106). Μία πρόσφατη μελέτη κατέδειξε την ικανότητα ανίχνευσης του ιού στο δέρμα και συγκεκριμένα στην περιοχή των φτερών, το οποίο θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στη φαρέτρα των επιστημόνων για μαζικούς ελέγχους κυκλοφορίας του ιού (106).

Όσον αφορά τους ανθρώπους, λίγα περιστατικά έχουν καταγραφεί ενώ η κυκλοφορία του ιού επιβεβαιώνεται κυρίως μέσω ορολογικών ελέγχων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι

περισσότερες περιπτώσεις είναι είτε ασυμπτωματικές, είτε με ήπια συμπτωματολογία (99). Μελέτες έχουν δείξει πως ο εκτιμώμενος χρόνος επώασης του ιού, δηλαδή ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι να εκδηλωθεί η νόσος, είναι 3-12 ημέρες μετά από ένα τσίμπημα από μολυσμένο κουνούπι (100). Στις περιπτώσεις όπου οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα, αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ήπια και σοβαρά. Στα ήπια συγκαταλέγονται συμπτώματα που ομοιάζουν με αυτά της γρίπης, όπως πυρετός (ή ικτερικός πυρετός), πονοκέφαλος, δερματικό εξάνθημα, ενώ στα σοβαρά συγκαταλέγονται τα νευρολογικά συμπτώματα (107). Σοβαρά νευρολογικά συμπτώματα εμφανίζουν συνήθως ασθενείς που το ανοσοποιητικό τους σύστημα είναι ευάλωτο, όπως άνθρωποι που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, είτε περιπτώσεις με υποκείμενο νόσημα (108). Επίσης, έχουν καταγραφεί μεμονωμένα περιστατικά ασθενών με μηνιγγίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, η οποία έχει συνδεθεί με κλινικά χαρακτηριστικά που συνδυάζουν ήπια και νευρολογικά συμπτώματα (πυρετός, πονοκέφαλος, αυχενική δυσκαμψία, τρέμουλο των χεριών, απώλεια μνήμης και δυσκολία στην ομιλία) (108).

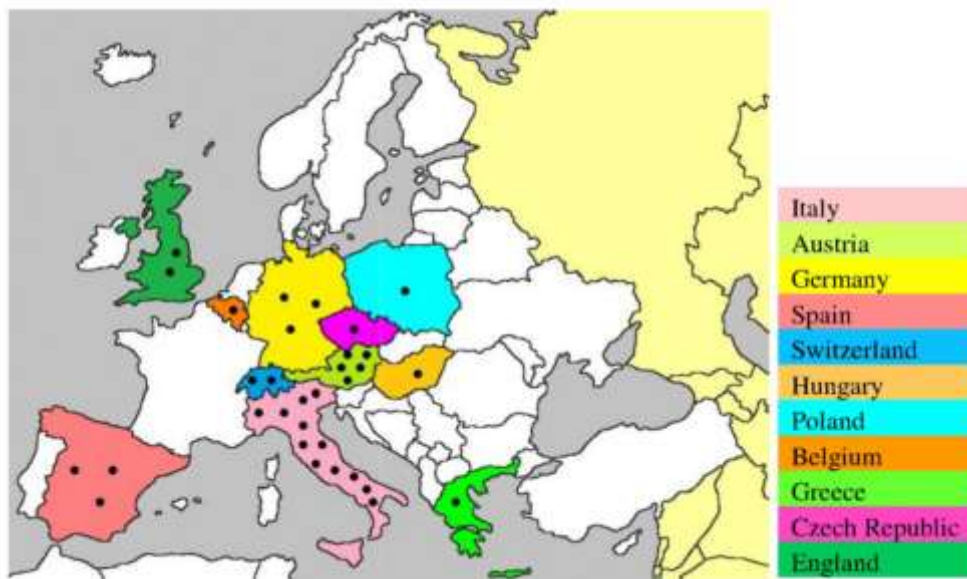
3.6 Επιδημιολογικά δεδομένα

Ο ιός Usutu, όπως προαναφέρθηκε, προέρχεται από την Αφρική, όπου και απομονώθηκε για πρώτη φορά από κουνούπια *Culex neavei* το 1959, συγκεκριμένα στη Σουαζιλάνδη. Στην Αφρική έχει καταγραφεί η κυκλοφορία του ιού σε αρκετές περιοχές, όπως είναι η Νότια και Κεντρική Αφρική (το 1969 και το 1981), η Ουγκάντα, η Νιγηρία, η Μπουρκίνα Φάσο, η Ακτή Ελεφαντοστού, η Σενεγάλη (το 1974, το 1993 και το 2007), το Μαρόκο και η Τυνησία (το 2014) (108,109). Υπάρχουν επίσης καταγραφές του ιού στην Κένυα, τη Μαδαγασκάρη και το Μάλι, ενώ παρά το γεγονός ότι ο ιός κυκλοφορεί στην Αφρική αρκετά χρόνια τώρα είναι λίγες οι πληροφορίες που είναι γνωστές για αυτόν (108). Η ανίχνευση του ιού στις περισσότερες περιπτώσεις αφορά κουνούπια, ωστόσο έχουν υπάρξει και μεμονωμένες καταγραφές σε ποντίκια και στον άνθρωπο (109).

Η πρώτη καταγραφή του ιού στην Ευρώπη χρονολογείται το 1996 στην Ιταλία, στην περιοχή της Τοσκάνης, ύστερα από μια αναδρομική μελέτη που διεξήχθη σε ιστούς από νεκρά πουλιά (3,110). Πέντε (5) χρόνια αργότερα, το 2001, σημειώθηκε μαζική θανάτωση πουλιών στην Αυστρία, στην περιοχή της Βιέννης, οπότε και ενοχοποιήθηκε ο ιός Usutu (110). Από εκείνη τη χρονική περίοδο και ύστερα, όλο και περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες έχουν καταγράψει την κυκλοφορία του ιού. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.5, έχει ταυτοποιηθεί,

με ορολογικούς ή μοριακούς ελέγχους, σε χώρες όπως η Ουγγαρία, η Ελβετία, η Ισπανία, η Ιταλία, η Γερμανία, το Βέλγιο, η Ισπανία, η Πολωνία, η Αγγλία, η Τσεχία και η Ελλάδα (109). Μελέτη του 2015 δείχνει πως σε κάποιες από τις παραπάνω χώρες ο ιός εμμένει και επανεμφανίζεται, όπως για παράδειγμα στην Ιταλία, που καταγράφηκε τα έτη 2007 – 2009 – 2010 – 2011, τη Γερμανία με καταγραφές το 2007, το 2011 και το 2013, την Ισπανία με σταθερές καταγραφές τα έτη 2003-2009 και ύστερα το 2012 και την Τσεχία που από το 2005 κατέγραψε ξανά την κυκλοφορία του ιού τα έτη 2011-2012 (109).

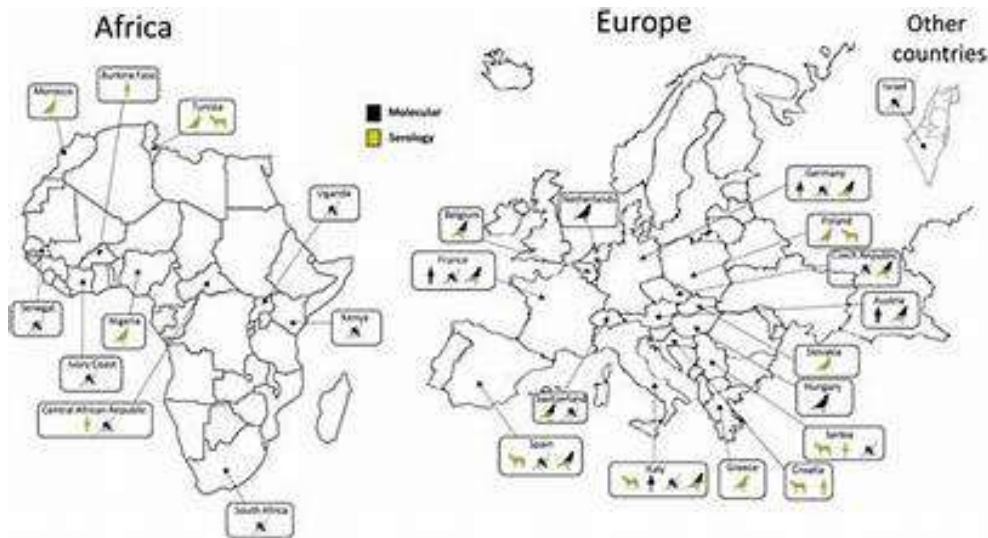
Εικόνα 3.5 Γεωγραφική εξάπλωση του USUV σε χώρες της Ευρώπης (ResearchGate, 2015)



Από το 2012 και μετά, η Ευρωπαϊκή Ένωση έθεσε σε εφαρμογή ένα πρόγραμμα επιδημιολογικής επιτήρησης με ορολογικό και μοριακό έλεγχο ανθρώπων και ζώων προκειμένου να υπάρξει μια πληρέστερη εικόνα της κυκλοφορίας του ιού, καθώς τα ανθρώπινα περιστατικά είναι λιγοστά και συνήθως ασυμπτωματικά και μόνο στα πτηνά προκαλεί σοβαρή νόσο (3,110). Μέσα από το πρόγραμμα αυτό έγινε καταγραφή και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, όπως είναι η Κροατία, η Γαλλία, το Λουξεμβούργο, η Ολλανδία, η Σλοβενία, η Σλοβακία και η Σερβία (3). Το γεγονός ότι ο αριθμός των προσβεβλημένων χωρών σταδιακά αυξάνεται, σε συνδυασμό με το ότι υπάρχει μια σταθερή κυκλοφορία στον ευρωπαϊκό χώρο, υποδηλώνει την εγκαθίδρυση του ιού που πλέον χαρακτηρίζεται ως ενδημικός (110). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην Ευρώπη κυκλοφορούν διάφορα στελέχη του

USUV, με επικρατέστερο το EU2 (110). Στην Εικόνα 3.6 παρακάτω, φαίνονται αναλυτικά τα ευρήματα USUV σε διάφορες χώρες και σε διαφορετικούς ξενιστές.

Εικόνα 3.6 Χάρτης στον οποίο φαίνονται οι χώρες που έχει εντοπιστεί ο ιός σε Αφρική και Ευρώπη (ResearchGate, 2019)



Συγκεκριμένα για τα ανθρώπινα περιστατικά, λίγα είναι αυτά που έχουν εμφανίσει τη νόσο και καταγραφεί. Στην Αφρική υπάρχουν δύο αναφορές κρουσμάτων, το πρώτο το 1981 στην Κεντρική Αφρικανική Δημοκρατία και το δεύτερο το 2004 στην Μπουρκίνα Φάσο (108). Και τα δύο αυτά περιστατικά είχαν ήπια συμπτώματα, κυρίως πυρετό, ίκτερο και εξάνθημα στο σώμα (108). Στην Ευρώπη από την άλλη μεριά, τα πρώτα δύο κρούσματα καταγράφηκαν το 2009 στην Ιταλία, το 2013 και το 2018 στην Κροατία καταγράφηκαν από τρία κρούσματα νευρο-διεσδυτικής νόσου κάθε χρονιά, το 2018 υπήρξε ένα κρούσμα στην Ουγγαρία, το 2016 στη Γαλλία και το 2021 στην Αυστρία (108). Το πιο πρόσφατα καταγεγραμμένο κρούσμα USUV ήταν το 2022 στην Ιταλία (107). Συγκρίνοντας τη συμπτωματολογία των κρουσμάτων στην Αφρική με αυτή των κρουσμάτων στη Ευρώπη παρατηρούνται έντονες διαφορές, καθώς στην Αφρική ο ιός προκαλεί μία ήπια νόσο, σε αντίθεση με την Ευρώπη όπου κατά κύριο λόγο η νόσηση είναι σοβαρή (107,108).

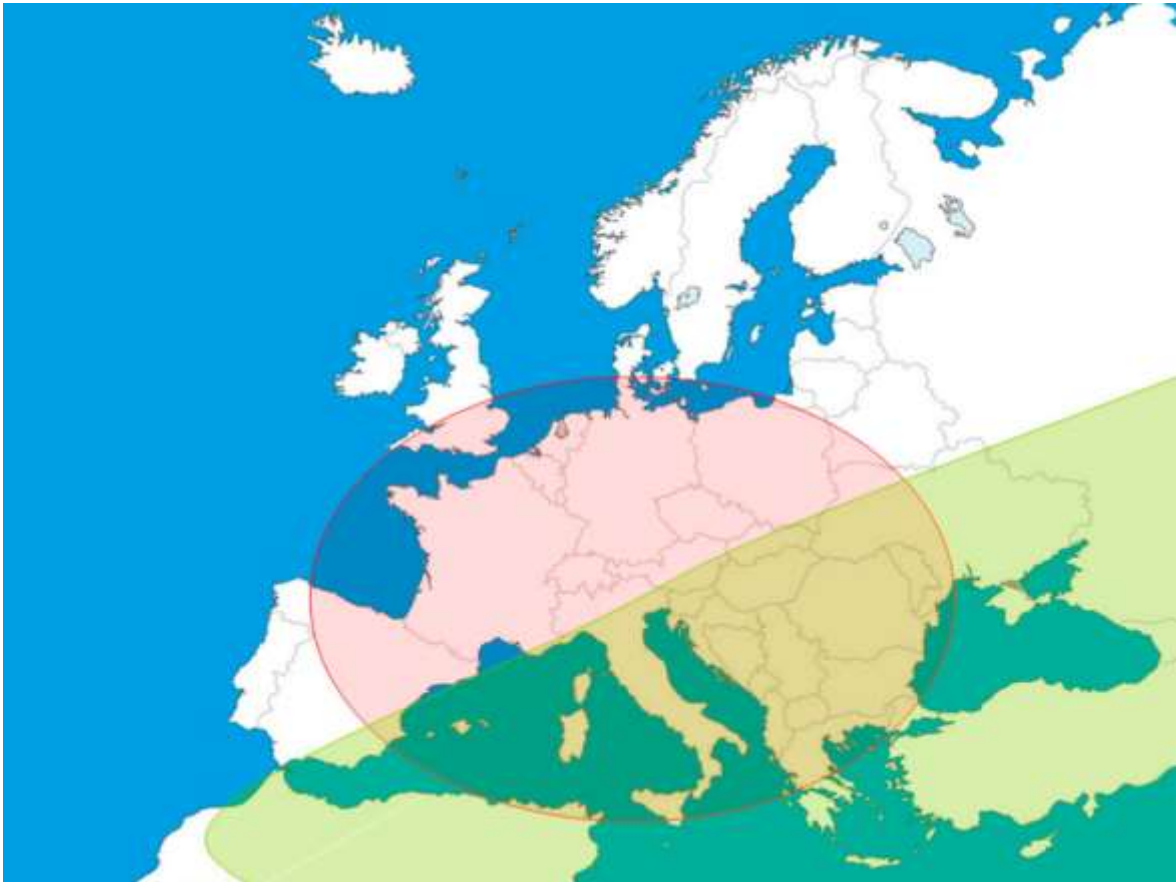
Στην περίπτωση της Ελλάδας, ο USUV είναι ελάχιστα μελετημένος και τα μοναδικά ευρήματα προέρχονται από μία μελέτη όπου διενεργήθηκαν ορολογικοί έλεγχοι σε περιστέρια μετά τις επιδημίες του ιού του Δυτικού Νείλου το 2010 και το 2011 στην Κεντρική Μακεδονία (111). Στη μελέτη αυτή, ένα περιστέρι βρέθηκε θετικό για αντισώματα έναντι του USUV, το οποίο προερχόταν από την περιοχή της Βέροιας το 2010 (111). Μία

(1) ακόμη μελέτη έχει διενεργηθεί με στόχο την εκτίμηση της κυκλοφορίας του ιού σε πληθυσμούς κουνουπιών στην Αττική την περίοδο 2017-2018, χωρίς ωστόσο να προκύψει κάποιο θετικό εύρημα (112). Άλλες μελέτες και δεδομένα που να αφορούν τον άνθρωπο και τα κουνούπια δεν έχουν σημειωθεί στην Ελλάδα, επομένως είναι μείζονος σημασίας να εκτιμηθεί πιο διεξοδικά η κυκλοφορία του ιού.

3.7 Συν-κυκλοφορία του ιού Usutu και του ιού του Δυτικού Νείλου

Ο USUV και ο WNV, εκτός από το γεγονός ότι ανήκουν στην ίδια οικογένεια ιών (*Flaviviridae*), μοιράζονται και επιμέρους κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά αφορούν τους ξενιστές, τους κύριους διαβιβαστές, αλλά και τις συνθήκες που χρειάζονται ώστε οι δύο ιοί να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο. Οι δύο ιοί μοιράζονται ένα κοινό είδος κουνουπιού διαβιβαστή (*Cx. pipiens*), ενώ ο κύριος ξενιστής μέσα στον οποίο πολλαπλασιάζονται επιτυχώς είναι είδη αποδημητικών πτηνών (94). Με αυτά τα δεδομένα, συνυπολογίζοντας παράλληλα και τη γεωγραφική κατανομή του USUV στην Ευρώπη, είναι εύλογη η υπόθεση της ταυτόχρονης κυκλοφορίας των δύο ιών (113). Παρά το γεγονός ότι ο USUV έχει αποτελέσει πρόσφατη απειλή για την Ευρώπη, φαίνεται πως έχει τη δυνατότητα γρήγορης επέκτασης σε πολλές χώρες στις οποίες είτε ανευρίσκεται ο WNV, είτε όχι (Εικόνα 3.7) (113).

Εικόνα 3.7 Γεωγραφική κατανομή του WNV (με πράσινο χρώμα) και του USUV (με κόκκινο χρώμα) στην Ευρώπη (ResearchGate, 2019)



Διεθνείς μελέτες επιβεβαιώνουν την ταυτόχρονη κυκλοφορία του WNV και του USUV σε χώρες της Ευρώπης τόσο ανάμεσα σε ξενιστές, όπως είναι τα πτηνά και οι άνθρωποι, όσο και σε κουνούπια διαβίβαστές (94). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι δύο ιοί περιλάμβαναν ορολογικούς ελέγχους με σκοπό την ανίχνευση αντισωμάτων, με τη χρήση της μεθόδου ELISA (114), αλλά και πιο σύγχρονες και ευαίσθητες τεχνικές, όπως είναι η μέθοδος της real-time RT-PCR (115). Μεταξύ αυτών των τεχνικών, η ELISA ενέχει κινδύνους ως προς την ορθότητα των αποτελεσμάτων, δεδομένης της ομοιότητας των WNV και USUV που έχει ως αποτέλεσμα τη διασταυρούμενη αντίδραση των αντισωμάτων (114). Η μέθοδος της PCR που χρησιμοποιείται από την άλλη, στην οποία εφαρμόζεται ένα πρωτόκολλο πολυπλεκτικής PCR (multiplex PCR), στοχεύει δηλαδή πολλαπλούς διαφορετικούς στόχους ταυτόχρονα, είναι πιο ακριβής και μπορεί να ξεχωρίσει με αποτελεσματικότητα τους δύο ιούς (115).

Έρευνα που διενεργήθηκε σε διαφορετικά είδη κουνουπιών που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Σλοβακίας και το RNA τους ελέγχθηκε με τη μέθοδο της real-time RT-PCR,

ανέδειξε τη συνύπαρξη των ιών USUV και WNV (116). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα είδη που βρέθηκαν θετικά και για τους δύο ιούς από αυτή την έρευνα ανήκαν στο είδος *Culex ripiens*, ο οποίος αποτελεί και τον κοινό διαβιβαστή τους (116). Παρόμοιες μελέτες με την προηγούμενη διενεργήθηκαν και στην Κροατία σε πληθυσμούς κουνουπιών, ωστόσο δεν διαπιστώθηκε ταυτόχρονη κυκλοφορία των δύο ιών (117). Άλλη μελέτη που καταδεικνύει την κυκλοφορία και των δύο ιών, αλλά όχι την ταυτόχρονη συνύπαρξή τους σε πληθυσμούς κουνουπιών, είναι μία μελέτη που διενεργήθηκε στην Αυστρία. Ενδιαφέρον εύρημα σε αυτή τη μελέτη αποτέλεσαν οι ομάδες αρσενικών κουνουπιών που βρέθηκαν θετικές για τον WNV και τον USUV (118). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ένα διαφορετικό τρόπο μετάδοσης των ιών αυτών, πέραν της λήψης μολυσμένου γεύματος αίματος. Σε διάφορες χώρες της Ευρώπης έχει παρατηρηθεί η κυκλοφορία του USUV μεμονωμένα, δεν υπάρχουν όμως περαιτέρω καταγραφές για την ταυτόχρονη κυκλοφορία του με τον WNV. Πιο συγκεκριμένα, έχει ανευρεθεί σε κουνούπια της Γαλλίας (119), της Ισπανίας (120), της Γερμανίας (121), της Ιταλίας, της Τσεχίας και της Ολλανδίας (3). Τέλος, θετικά pools κουνουπιών για USUV έχουν βρεθεί και στη Σερβία και το Ισραήλ (122).

Όσον αφορά μελέτες για άλλους οργανισμούς, ξενιστές του ιού, όπως είναι τα πτηνά και ο άνθρωπος, ο τρόπος επιβεβαίωσης της συνύπαρξης των δύο ιών πραγματοποιείται με ορολογικές μεθόδους (94). Ένας έλεγχος που διεξήχθη σε ορούς πτηνών της Αγγλίας έδειξε την ταυτόχρονη ύπαρξη των ιών USUV και WNV στα δείγματα αυτά (123). Παρομοίως, μέσα από ελέγχους για σκοπούς επιδημιολογικής επιτήρησης στην Ιταλία, βρέθηκαν πτηνά θετικά και για τους δύο ιούς (124). Σε άγρια πτηνά, τα οποία βρέθηκαν νεκρά στην Κροατία, ανιχνεύθηκε RNA του USUV (122). Η επιτήρηση που διενεργείται στα ζώα εφαρμόζεται σε κάποιες μόνο ευρωπαϊκές χώρες και τα αποτελέσματα που απορρέουν από αυτή είναι ελάχιστα διότι δεν ανευρίσκονται συχνά θετικοί για USUV οροί ζώων (3).

Δεδομένα για τους ανθρώπους και την ταυτόχρονη λοίμωξη από WNV και USUV προέρχονται από ελέγχους στο αίμα δωρητών στην Αυστρία το 2018, όπου ένας δότης βρέθηκε με διπλή λοίμωξη (125). Ακόμη, δεδομένα που προέρχονται από την Ιταλία το 2018, καταδεικνύουν διαφορετική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε ασθενείς που νοσούσαν με WNV και παράλληλα είχαν αντισώματα, έναντι του USUV (126). Σε μία επιπλέον χώρα της Ευρώπης, την Κροατία, το 2013 όπου υπήρξε μεγάλη έξαρση ανθρώπινων κρουσμάτων WNV, διαπιστώθηκε ταυτόχρονη κυκλοφορία του USUV (122,127). Η ταυτόχρονη κυκλοφορία αφορούσε την ίδια περιοχή στην οποία ανευρίσκονταν οι ασθενείς, αλλά όχι ωστόσο τους ίδιους ασθενείς.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διενέργεια ενός αναδρομικού ελέγχου για την κυκλοφορία του ιού Usutu σε περιοχές της Ελλάδας. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δείγματα RNA από pools θηλυκών κουνουπιών του γένους *Culex pipiens*, τα οποία είχαν συλλεχθεί από περιοχές της Αττικής, της Κεντρικής Μακεδονίας και της Θεσσαλίας. Τα δείγματα προέρχονταν από χρονιές που εκτείνονται από το 2020 μέχρι και το 2023. Ο αρχικός έλεγχος για την παρουσία του ιού έγινε με την εφαρμογή ενός μοριακού πρωτοκόλλου PCR πραγματικού χρόνου ανάγνωσης (Real-time PCR, RT-PCR) και ακολούθως διενεργήθηκε συμπληρωματικός επιβεβαιωτικός έλεγχος με πρωτόκολλο συμβατικής PCR και αλληλούχιση σε δείγματα που χαρακτηρίστηκαν ως θετικά.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Δείγματα και περιοχή μελέτης

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία προέρχονταν από παγίδες συλλογής ακμαίων κουνουπιών που είχαν τοποθετηθεί σε επιλεγμένα σημεία τα έτη 2020-2023. Στα δείγματα αυτά είχε προηγηθεί απομόνωση γενετικού υλικού (RNA) για τη μοριακή ανίχνευση του ιού του δυτικού Νείλου (WNV), στα πλαίσια του εθνικού προγράμματος εντομολογικής επιτήρησης που διοργανώνεται και χρηματοδοτείται κάθε χρόνο από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) από το 2010. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο 1.500 δειγμάτων (pools - ομάδων κουνουπιών), από διαφορετικές χρονιές και περιοχές της Ελλάδας. Οι γεωγραφικές περιοχές που επιλέχθηκαν ήταν η Αττική, η Κεντρική Μακεδονία και η Θεσσαλία, ενώ χρονικά επιλέχθηκαν δείγματα από το 2020 μέχρι και το 2023 (Εικόνα 5.1) (128).

Εικόνα 5.1 Χάρτης σημείων που απεικονίζει τις περιοχές των δειγματοληψιών



Η επιλογή των περιοχών δεν έγινε τυχαία, αλλά με βάση ευρωπαϊκές μελέτες που καταδεικνύουν την πιθανή ταυτόχρονη κυκλοφορία σε ευάλωτες περιοχές του WNV και του USUV σε πληθυσμούς κουνουπιών *Culex pipiens* (112,113,116,117). Η συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων προερχόταν από την Αττική, η οποία αποτελεί την πιο αστικοποιημένη και πυκνοκατοικημένη Περιφέρεια της Ελλάδας και έχει ενοχοποιηθεί για την κυκλοφορία φλαβοϊών στο παρελθόν, όπως ο WNV, επιδημίες του οποίου έχουν καταγραφεί τα προηγούμενα έτη (Πίνακας 5.1) (129). Ένας ακόμη παράγοντας επιλογής της

Αττικής είναι ότι και παρόμοιες μελέτες με την τωρινή είχαν διεξαχθεί από την ερευνητική μας ομάδα και σε προηγούμενη περίοδο (2017-2018) (112). Ακολούθως, η περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, καθώς αποτελεί σε ετήσια βάση το επίκεντρο σοβαρών επιδημικών εξάρσεων του WNV (85,129,130). Στην περιοχή της Θεσσαλίας, έχουν καταγραφεί επίσης πολυάριθμα κρούσματα του WNV παλαιότερα, καθώς και μία καταστροφική πλημμύρα το έτος 2023, χρονιά κατά την οποία η συγκεκριμένη Περιφέρεια αποτέλεσε ένα από τα επίκεντρα της επιδημίας του WNV (85,129,130).

Πίνακας 5.1 Χρονιές και περιοχές συλλογής των δειγμάτων

	2020	2021	2022	2023	Σύνολο
Αττική	16	410	356	206	988
Κεντρική Μακεδονία	44	106	135	101	386
Θεσσαλία	8	21	27	70	126

Τα κουνούπια συλλέχθηκαν με δύο τύπους ειδικών παγίδων BG-Sentinel, μία με BG lure και μία με BG lure και CO₂, για την περιοχή της Αττικής, οι οποίες τοποθετούνται σε σταθερά σημεία από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο (131). Στις περιοχές της Κεντρικής Μακεδονίας και Θεσσαλίας, η τοποθέτηση των παγίδων διεξάγεται υπό την επίβλεψη του ΕΟΔΥ, οπότε και χρησιμοποιούνται δύο τύποι παγίδων, η CO₂ trap και η Triple trap (129). Τα συλλεγμένα έντομα σε όλες τις περιπτώσεις μεταφέρθηκαν με ξηρό πάγο στο εργαστήριο Ιατρικής Εντομολογίας του τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, της Σχολής Δημόσιας Υγείας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, όπου και πραγματοποιήθηκε μορφολογική ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους κάτω από το στερεοσκόπιο NIKON SMZ645 (Nikon Instruments Inc., Surrey, UK), με χρήση διχοτομικών κλειδών και ακολούθησε η σχετική καταμέτρηση (10). Τα θηλυκά κουνούπια που ανήκαν στο είδος *Culex ripiens* και προέρχονταν από την ίδια δειγματοληψία, ίδια μέρα, τοποθετήθηκαν σε ομάδες (pools) σε ένα σωληνάριο, 2-100 κουνούπια ανά pool. Μέχρι να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του γενετικού υλικού, τα δείγματα φυλάσσονταν στους -80°C.

5.2 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA έγινε με το αυτοματοποιημένο μηχάνημα Maxwell 16 (Promega, Madison, WI, USA). με τη χρήση του Maxwell 16 LEV Simply RNA Tissue kit, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Προετοιμασία δειγμάτων

Προστέθηκε ποσότητα PBS pH 7.4 (1x) (Phosphate Buffered Saline, Gibco®) μαζί με μεταλλικά σφαιρίδια στα σωληνάρια που είχαν συλλεχθεί τα κουνούπια σύμφωνα με τον Πίνακα 5.2. Στη συνέχεια σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 2 μl Murine RNase Inhibitor (Takara, Shiga, Japan) και αναδεύτηκαν έντονα στο Vortex μέχρι να διαλυθούν όσο το δυνατόν περισσότερο τα κουνούπια. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 8 λεπτά, ώστε τα υπολείμματα από το σώμα των εντόμων που δεν είχαν διαλυθεί πλήρως να μείνουν στο κάτω μέρος του σωληναρίου και το υπερκείμενο να είναι καθαρό.

Αριθμός κουνουπιών	PBS (ml)	Αριθμός σφαιριδίων
1-20	0,5	2
20-50	1	2
50-100	2	3

Απομόνωση γενετικού υλικού

Η κασέτα με τα αντιδραστήρια τοποθετήθηκε στην ειδική πλακέτα και στη θέση 1 της, εισήχθησαν 200 μl lysis buffer και 200 μl από την υπερκείμενη φάση του κάθε δείγματος, όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Στη θέση 4 της κασέτας έπειτα, τοποθετήθηκαν 10 μl DNaseI. Στη θέση 8 τοποθετήθηκαν τα έμβολα που παρέχονται από τον κατασκευαστή (plungers), ενώ στις μπροστά αριθμημένες θέσεις της πλακέτας τα σωληνάκια των 0,5 ml, που παρέχονται επίσης από τον κατασκευαστή. Στα σωληνάρια αναγράφηκε ο κωδικός του κάθε δείγματος και προστέθηκαν 50 μl Elution buffer (nuclease-free water). Τέλος, η πλακέτα εισήχθη στο μηχάνημα και επιλέχθηκε το πρόγραμμα «Simply RNA» ώστε να ξεκινήσει η απομόνωση.

Σημείωση: Τα εναπομείναντα υπερκείμενα των δειγμάτων συλλέχθηκαν σε σωληνάρια των 2 ml και μαζί με τα σωληνάρια που περιείχαν το RNA αποθηκεύτηκαν στους -80°C για ενδεχόμενη μελλοντική χρήση.

5.3 Real-time RT-PCR

Στα RNAs που απομονώθηκαν από τα pools των κουνουπιών πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος με τη μέθοδο της real-time RT-PCR. Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής (Eurofins

Genomics, Ebersberg, Germany) που χρησιμοποιήθηκαν, όπως φαίνονται στον Πίνακα 5.3, ήταν σχεδιασμένοι με γνώμονα το στέλεχος του ιού του 2001 από την Αυστρία. Η αλληλουχία στόχος ήταν μία περιοχή 91 νουκλεοτιδίων του γονιδίου της μη-δομικής πρωτεΐνης 1 (NS1) (121).

Πίνακας 5.3 Αλληλουχία των εκκινητών και του ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν	
USUTU-F	5'-CGTTCTCGACTTTGACTA-3'
USUTU-R	5'-GCTAGTAGTAGTTCTTATGGA-3'
USUTU-P	5'-FAM-ACCGTCACAATCACTGAAGCAT-BHQ1-3'

Τα αντιδραστήρια (Biotools, Madrid, Spain), καθώς και ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 5.4 παρακάτω. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μl, το master mix αποτελούσαν τα 20 μl, στα οποία προστέθηκαν 5 μl από το RNA. Το master mix φτιάχτηκε συνολικά για τον εκάστοτε αριθμό δειγμάτων και μοιράστηκε σε πιάτο PCR 96 θέσεων.

Πίνακας 5.4 Όγκος αντιδραστηρίων για την real-time RT-PCR	
Αντιδραστήρια	Όγκος αντιδραστηρίων (μl) / δείγμα
2x Mastermix	12,5
USU-Primer-F	0,2
USU-Primer-R	0,2
Probe USU-P (1:5)	0,25
Enzyme	0,25
H ₂ O	6,6
RNA	5

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Step OnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore), ενώ το πρωτόκολλο χωρίστηκε σε δύο στάδια. Αρχικά πραγματοποιήθηκε το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής, όπου η θερμοκρασία ανέρχεται στους 48°C για 30 λεπτά και έπειτα στους 95°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το στάδιο του πολλαπλασιασμού, στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα και στους 60°C για 1 λεπτό. Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε για 40 κύκλους. Προκειμένου ένα αποτέλεσμα να θεωρηθεί θετικό, ορίστηκε να υπάρχει ευδιάκριτη καμπύλη μεταξύ των κύκλων 16 και 34 (Ct=16 – Ct=34). Για την ορθότητα και τη σωστή αξιολόγηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ένας θετικός (positive control) και ένας αρνητικός μάρτυρας (negative control). Ο θετικός μάρτυρας αντιστοιχεί σε γενετικό υλικό (RNA) από ένα

πρότυπο στέλεχος του USUV (ATCC NR-51220), το οποίο έχει απομονωθεί από ένα κουνούπι στο δάσος Zika, στην περιοχή Εντέμπε της Ουγκάντα και στη συνέχεια καλλιεργήθηκε σε κυτταροκαλλιέργεια (VERO C1008).

5.4 Δημιουργία cDNA

Αφού ολοκληρώθηκε ο έλεγχος με τη real-time RT-PCR, τα δείγματα που βγήκαν θετικά για τον ιό, ελέγχθηκαν περαιτέρω με ένα πρωτόκολλο συμβατικής PCR για περαιτέρω επιβεβαίωση και σκοπούς αλληλούχισης. Για τον λόγο αυτό απαιτήθηκε η δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA) από το αρχικό RNA. Η δημιουργία του cDNA διενεργήθηκε σε δύο διαδοχικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε η απενεργοποίηση του RNA στον θερμικό κυκλοποιητή GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Singapore), στους 70°C για 5 λεπτά με τυχαίους εκκινητές. Τα αντιδραστήρια (Invitrogen) και οι ποσότητες αυτών φαίνονται στον Πίνακα 5.5 παρακάτω. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 12 μl.

Πίνακας 5.5 Αντιδραστήρια 1ου σταδίου παραγωγής cDNA	
Αντιδραστήρια	Όγκος αντιδραστηρίων (μl) / δείγμα
dNTPs	1
Random primers (1:20)	1
H ₂ O	5
RNA	5

Στο δεύτερο στάδιο προστέθηκαν στα 12 μl της αντίδρασης του προηγούμενου σταδίου τα αντιδραστήρια (Invitrogen) που φαίνονται στον Πίνακα 5.6 παρακάτω. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μl και οι συνθήκες στις οποίες έγινε η τελική σύνθεση του cDNA ήταν 25°C για 10 λεπτά, 42°C για 50 λεπτά και τέλος 70°C για 15 λεπτά.

Πίνακας 5.6 Αντιδραστήρια 2ου σταδίου παραγωγής cDNA	
Αντιδραστήρια	Όγκος αντιδραστηρίων (μl) / δείγμα
10x First Strand Buffer	2
0,1 M DTT	2
Superscript II	1
RNaseOut	1
H ₂ O	2

5.5 Συμβατική PCR

Για την επαλήθευση και επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την real-time RT-PCR πραγματοποιήθηκε ένα επιπλέον στάδιο μοριακής ανίχνευσης του ιού με τη διενέργεια ενός πρωτοκόλλου συμβατικής PCR και τη χρήση ειδικού ζεύγους εκκινητών (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany), όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.7. Η αλληλουχία-στόχος των εκκινητών αποτελεί την νουκλεοτιδική περιοχή της μη-δομικής πρωτεΐνης 5 (NS5) (132).

Πίνακας 5.7 Αλληλουχία εκκινητών για τη συμβατική PCR	
USUV-F	5'-AGGACCATTGGTTAGGAAGA-3'
USUV-R	5'-GGCTTGACAACACAATCATC-3'

Τα αντιδραστήρια (New England Biolabs, Massachusetts, USA) που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση και ο όγκος αυτών φαίνονται στον Πίνακα 5.8. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μl, από τα οποία τα 22,5 μl αντιστοιχούν στο master mix και τα 2,5 μl στο cDNA. Όλα τα αντιδραστήρια αναμείχθηκαν ανάλογα με τον εκάστοτε αριθμό δειγμάτων σε ένα σωληνάριο Eppendorf (1,5 ml) και μοιράστηκαν 22,5 μl από το master mix σε μεμονωμένα σωληνάρια των 0,5 μl. Τέλος, προστέθηκαν 2,5 μl από το cDNA.

Πίνακας 5.8 Όγκος αντιδραστηρίων συμβατικής PCR	
Αντιδραστήρια	Όγκος αντιδραστηρίων (μl)/ δείγμα
PCR Buffer (1x)	5
dNTPs (0,2 mM)	0,5
USUV-F	0,25
USUV-R	0,25
Taq Polymerase	0,3
H ₂ O	16,2
cDNA	2,5

Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στη συνέχεια στον θερμοκυκλοποιητή GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Singapore) και οι συνθήκες του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 10 λεπτά, έπειτα η αποδιάταξη στους 94°C για 40 δευτερόλεπτα, η επαναδιάταξη στους 57°C για 50 δευτερόλεπτα, η επιμήκυνση 72°C για 1 λεπτό και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού ήταν 40 (στάδια αποδιάταξης,

επαναδιάταξης και επιμήκυνσης) και η διάρκεια του προγράμματος περίπου 2 ώρες. Το μοριακό βάρος του αναμενόμενου προϊόντος ήταν 535 ζ.β.

5.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα προϊόντα που προέκυψαν από τη συμβατική PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (2% W/V) που παρασκευάστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία. Ζυγίστηκαν 0,9 gr αγαρόζης (NIPPON Genetics EUROPE) σε ζυγό ακριβείας τρίτου δεκαδικού ψηφίου σε κωνική γυάλινη φλάσκα. Έπειτα προστέθηκαν 30 ml TAE Buffer 1x (AppliChem) και το μείγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να καταστεί απόλυτα διαυγές (χωρίς φυσαλίδες). Προστέθηκαν 30 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το μείγμα αποχύθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφού πρώτα είχαν τοποθετηθεί τα κατάλληλα «χτενάκια» (combs) για το φόρτωμα των δειγμάτων. Το πήκτωμα αγαρόζης αφέθηκε να πήξει για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν ήταν έτοιμο, αφαιρέθηκαν τα «χτενάκια» και φορτώθηκαν τα δείγματα. Στο πρώτο «πηγαδάκι» του πηκτώματος φορτώθηκαν 2 μl από τον δείκτη μοριακών μεγεθών (ladder, Nzytech, Lisbon, Portugal) και στις υπόλοιπες διαδρομές 4 μl από το εκάστοτε δείγμα αναμεμειγμένο με χρωστική. Συνδέθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης με το τροφοδοτικό και τα δείγματα «έτρεξαν» για 30 λεπτά στα 90 V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε πάνω σε μία τράπεζα με UV φως ώστε να οπτικοποιηθούν τα προϊόντα της PCR.

5.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, μέσα στο σωληνάριο με το προϊόν της PCR προστέθηκε ποσότητα νερού μέχρι να φτάσουμε τα 50 μl τελικό όγκο και έπειτα 100 μl NT1 Buffer. Αυτά τα 150 μl μεταφέρθηκαν σε μία στήλη και φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα. Το σωληνάριο συλλογής αποχύθηκε και προστέθηκαν 700 μl NT3 Buffer, οπότε και έγινε φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα. Το σωληνάριο συλλογής αποχύθηκε και το προηγούμενο βήμα επαναλήφθηκε μία ακόμη φορά. Το σωληνάριο συλλογής αποχύθηκε και η στήλη φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στις 11.000 rpm για 1 λεπτό ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε, χωρίς το σωληνάριο συλλογής, στους

70°C στο θερμομπλόκ για 5 λεπτά, ώστε να εξατμιστούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης. Στη στήλη προστέθηκαν 30 µl Elution Buffer, ένα καθαρό σωληνάριο (1,5 ml) για τη συλλογή του DNA και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Μετά την επώαση, η στήλη φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 rpm για 1 λεπτό και συλλέχθηκε το DNA.

Σημείωση: Το DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

5.8 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

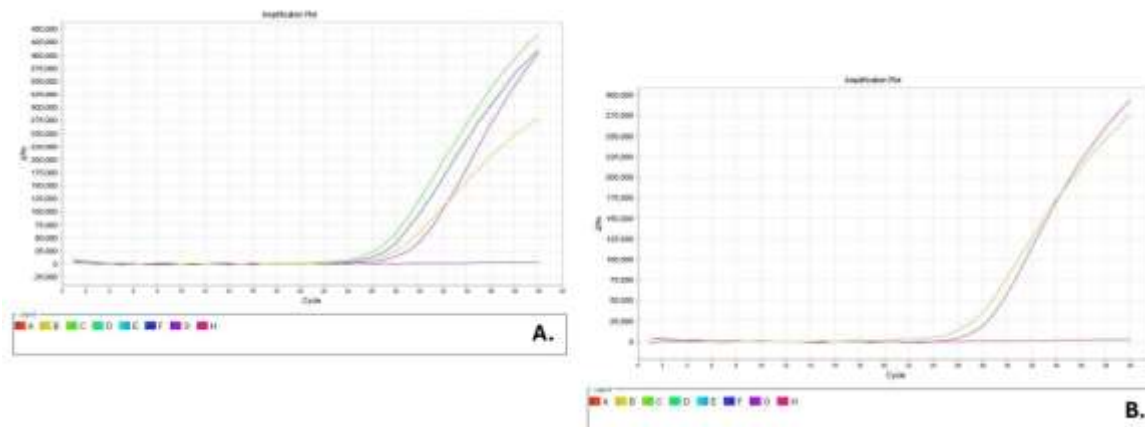
Η αλληλούχιση του DNA έγινε με ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger (Sanger sequencing) από μια εταιρεία βιοτεχνολογίας που εδράζεται στη Λάρισα και παρέχει υπηρεσίες στους τομείς της κυτταρικής και μοριακής ανοσοβιολογίας (CeMIA SA). Τα καθαρισμένα PCR προϊόντα (10 µl), αναμειγμένα με τους εκκινητές (5 µl) που χρησιμοποιήθηκαν στη συμβατική PCR (USUV-F και USUV-R), στάλθηκαν στην εταιρεία που διενεργεί τη διαδικασία της αλληλούχισης. Το κάθε δείγμα στάλθηκε και με τους δύο εκκινητές. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ήρθαν με τη μορφή χρωματογραφημάτων, στα οποία ακολούθησε επεξεργασία με το πρόγραμμα Chromas. Εφόσον έγινε η πρώτη επεξεργασία των αλληλουχιών, αντιγράφηκαν στο εργαλείο BLAST, μέσω του οποίου συγκρίνονται οι νουκλεοτιδικές μας αλληλουχίες με αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων GenBank και υπολογίζονται τα ποσοστά ομολογίας. Αφού ταυτοποιήθηκε ότι οι αλληλουχίες ανήκουν σε στελέχη του ιού Usutu, διενεργήθηκε η σύνθεση ολόκληρης της απομονωμένης αλληλουχίας του γονιδίου της μη-δομικής πρωτεΐνης 5 (NS5), συνδυάζοντας το κομμάτι που προέκυψε από την αλληλούχιση με τον εμπρόσθιο και τον οπίσθιο εκκινητή για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Clustal Omega προκειμένου να στοιχηθούν οι αλληλουχίες μεταξύ τους.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο πρώτος έλεγχος των επιλεγμένων δειγμάτων για USUV πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της real-time RT-PCR. Σε κάθε πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας προκειμένου να οριστεί το πότε ένα αποτέλεσμα θα θεωρηθεί ως θετικό αφενός και αφετέρου να διασφαλιστεί η απουσία της οποιασδήποτε επιμόλυνσης. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο δείγμα USUV (NR-51220), το οποίο λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης αραιώθηκε (1:50). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού συστήματος StepOne™ Software v2.2 του μηχανήματος της real-time RT-PCR, όπου τα αποτελέσματα απεικονίζονται είτε σε γραμμική, είτε σε λογαριθμική κλίμακα. Στον άξονα των x αναγράφονται οι κύκλοι της αντίδρασης και στον άξονα των y ο λόγος των αντιγράφων του ιού. Τα θετικά αποτελέσματα απεικονίζονται ως μια σιγμοειδής καμπύλη, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα ως μία ευθεία γραμμή που εκτείνεται παράλληλα με τον άξονα των x.

Από τα 1,500 RNAs που εξετάστηκαν, τέσσερα βρέθηκαν θετικά. Στην Εικόνα 6.1, φαίνονται οι καμπύλες των θετικών δειγμάτων σε σύγκριση με την καμπύλη του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα σε γραμμική κλίμακα. Αξίζει να σημειωθεί πως σε όλες τις περιπτώσεις η εκθετική φάση ξεκινάει περίπου στο σημείο εκκίνησης της εκθετικής φάσης του θετικού μάρτυρα (σε παρόμοιο κύκλο, Ct), με μια διακύμανση έναρξης από τον Ct=24 μέχρι και τον Ct=26. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι ένα από τα τέσσερα δείγματα που βρέθηκαν θετικά για USUV, είχε βρεθεί σε προηγούμενο έλεγχο του εργαστηρίου θετικό και για WNV.

Εικόνα 6.1 Διαγραμματική απεικόνιση των θετικών δειγμάτων για USUV (A) Καμπύλες των θετικών δειγμάτων από το 2020 (κωδικός χρωμάτων B, κίτρινη καμπύλη, C, πράσινη καμπύλη και F, μπλε καμπύλη) σε σύγκριση με τον θετικό (κωδικός χρώματος G, μωβ καμπύλη) και τον αρνητικό μάρτυρα (κωδικός χρώματος G, μωβ ευθεία γραμμή), (B) Καμπύλη θετικού δείγματος από το 2022 (κωδικός χρώματος C, πράσινη καμπύλη) σε σύγκριση με τον θετικό (κωδικός χρώματος H, φούξια καμπύλη) και τον αρνητικό μάρτυρα (κωδικός χρώματος H, φούξια ευθεία γραμμή)



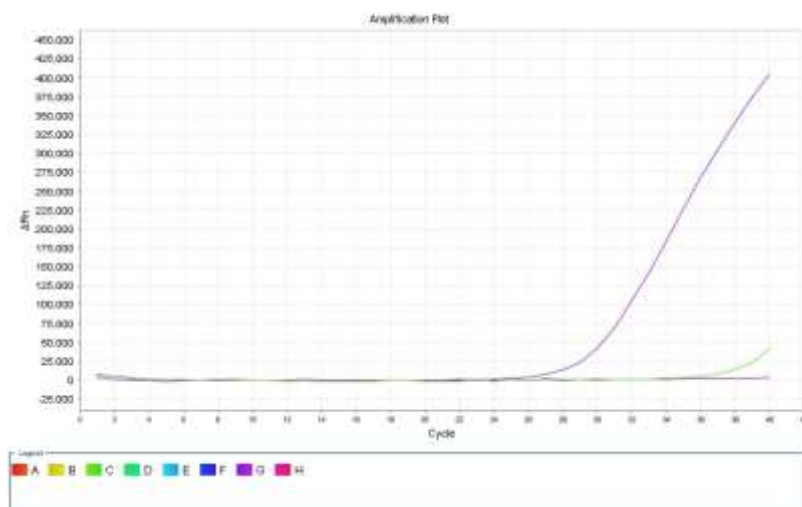
Τα παραπάνω δείγματα προέρχονταν από δειγματοληψίες που έλαβαν χώρα το 2022 (ένα εξ αυτών) και το 2020 (τρία εξ αυτών), ενώ η περιοχή συλλογής και για τα τέσσερα ήταν η Κεντρική Μακεδονία (Πίνακας 6.1). Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα του 2022 προερχόταν από την πόλη Κουφάλια, της περιφερειακής ενότητας Θεσσαλονίκης, συλλέχθηκε στις 28 Σεπτεμβρίου του 2022 και ήταν και αυτό που ήταν διπλά θετικό, τόσο για USUV όσο και για WNV. Όσον αφορά τα δείγματα από το 2020, το ένα προερχόταν από την περιοχή της Κάτω Γέφυρας, περιφερειακή ενότητα Θεσσαλονίκης και συλλέχθηκε στις 24 Αυγούστου και τα άλλα δύο από την περιοχή των Άμπελων, περιφερειακή ενότητα Σερρών (7 και 21 Σεπτεμβρίου), αντίστοιχα.

Πίνακας 6.1 Συνολική παράθεση του αριθμού των δειγμάτων που ελέγχθηκαν ανά περιοχή και χρονιά, όπου Np= ο αριθμός των θετικών δειγμάτων, Nt= ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν

Περιοχή	Χρονιά				Σύνολο
	2020	2021	2022	2023	
	Np/Nt	Np/Nt	Np/Nt	Np/Nt	
Αττική	0/16	0/410	0/356	0/206	988
Κεντρική Μακεδονία	3/44	0/106	1/135	0/101	386
Θεσσαλία	0/8	0/21	0/27	0/70	126

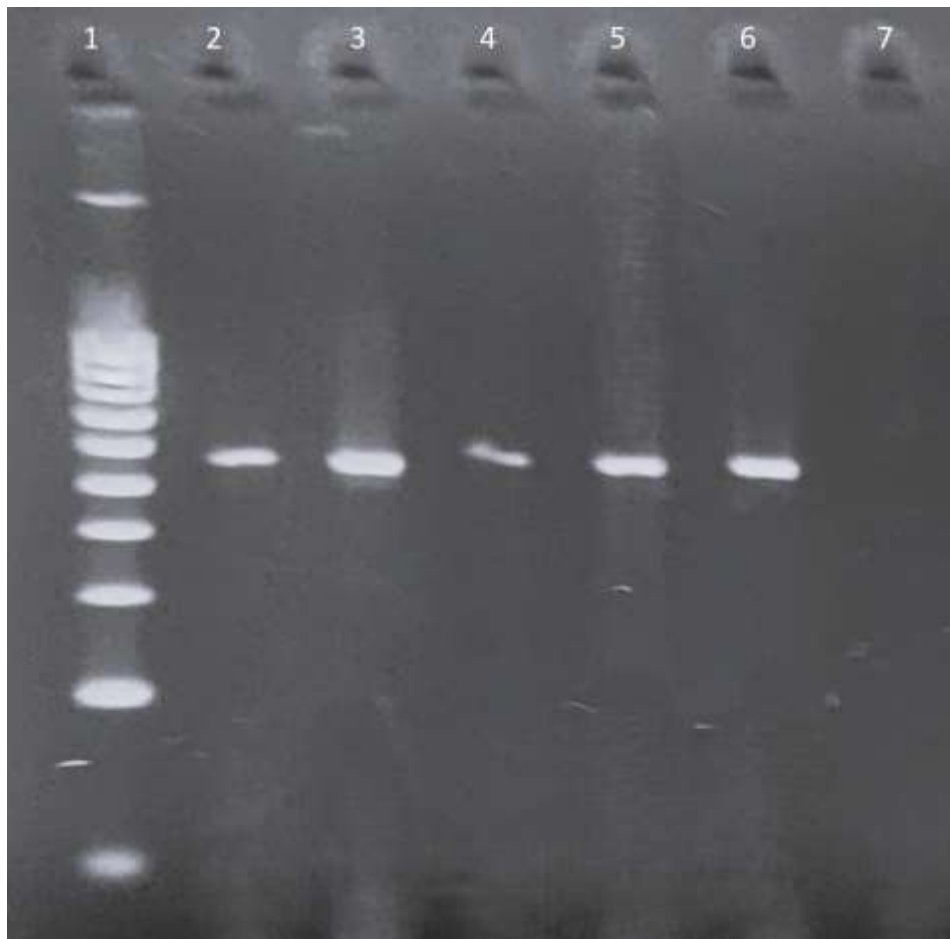
Υπήρχαν και κάποια δείγματα τα οποία δεν αξιολογήθηκαν περαιτέρω. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.2 παρακάτω, η εκθετική φάση του δείγματος ξεκινάει πολύ αργά ($C_t \approx 37$) σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Η εν λόγω εικόνα ενδεχομένως αποδίδεται στην εξαιρετικά μικρή συγκέντρωση του γενετικού υλικού του ιού στο δείγμα. Το παράδειγμα αυτό καταδεικνύει την ευαισθησία της μεθόδου και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Εικόνα 6.2 Διαγραμματική απεικόνιση δείγματος που δεν αξιολογήθηκε (κωδικός χρώματος C, πράσινη καμπύλη) συγκριτικά με τον θετικό (κωδικός χρώματος G, μωβ καμπύλη) και τον αρνητικό μάρτυρα (κωδικός χρώματος G, μωβ ευθεία γραμμή)



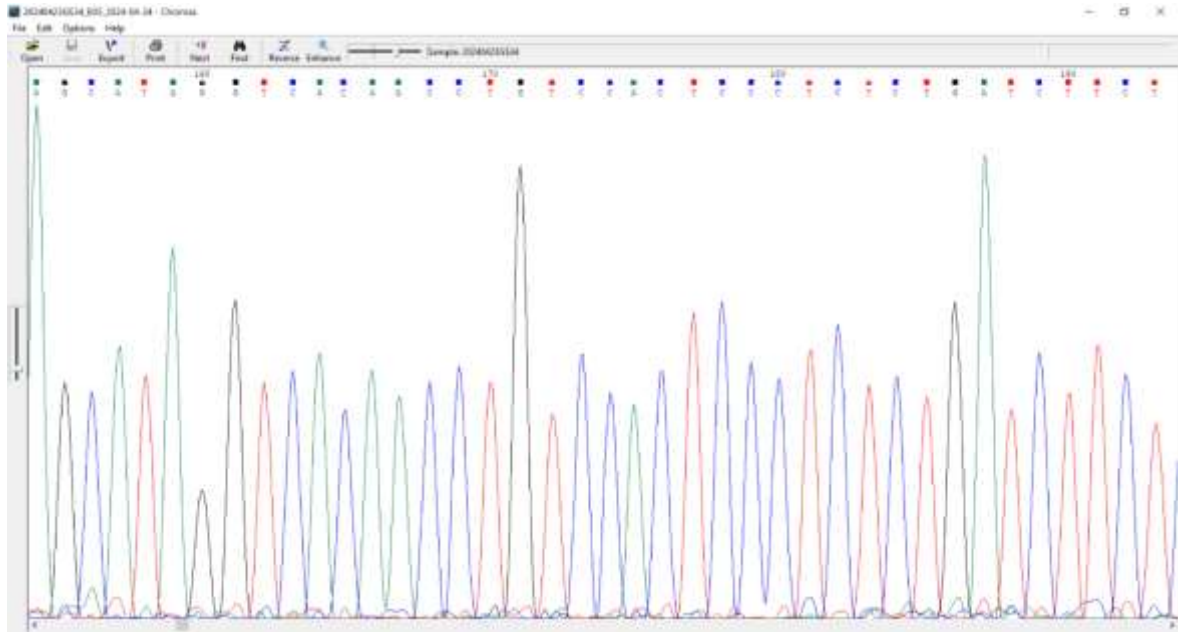
Μετά από την αρχική ανάλυση των δειγμάτων, σε εκείνα που βρέθηκαν θετικά για USUV, έγινε περαιτέρω μοριακή ανάλυση για την επιβεβαίωση και ταυτοποίηση ύπαρξης του ιού. Η επιβεβαίωση έγινε με τη μέθοδο της συμβατικής PCR και ένα ζεύγος εκκινητών, ειδικά σχεδιασμένων για την ενίσχυση της νουκλεοτιδικής περιοχής της μη-δομικής πρωτεΐνης 5 (NS5) του USUV (132). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 6.3. Στις διαδρομές 2 - 5 αντιστοιχούν τα δείγματα, ενώ στις διαδρομές 6 και 7 ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας, αντίστοιχα. Με γνώμονα τον δείκτη μοριακών μεγεθών, δεξιά και αριστερά διακρίνεται η ζώνη στα 535 ζ.β., όπου και είναι το επιθυμητό προϊόν.

Εικόνα 6.3 Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της συμβατικής PCR. Στη διαδρομή 1 αντιστοιχεί ο δείκτης μοριακών μεγεθών (ladder), όπου κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε 100 ζ.β., στις διαδρομές 2 έως 5 αντιστοιχούν τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά με τη μέθοδο της Real-time RT-PCR, ενώ στις διαδρομές 6 και 7 αντιστοιχούν ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας, αντίστοιχα



Εφόσον επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του ιού και με τη συμβατική PCR, τα προϊόντα της PCR «καθαρίστηκαν» και στη συνέχεια στάλθηκαν για αλληλούχιση με τη μέθοδο Sanger στην εταιρεία CeMIA SA. Το κάθε δείγμα αλληλουχήθηκε με τη χρήση και των δύο εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και στη συμβατική PCR. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης στάλθηκαν πίσω σε εμάς με τη μορφή χρωματογραφημάτων, όπως φαίνεται και στις Εικόνες 6.4 και 6.5. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν δύο χρωματογραφήματα, καθένα από το «διάβασμα» με τον αντίστοιχο εκκινητή. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι αλληλουχίες, θα πρέπει σε αυτές να γίνουν οι απαιτούμενοι έλεγχοι για την ορθότητα των βάσεων που αναγνωρίστηκαν έτσι ώστε να εισαχθούν στο εργαλείο BLAST. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Chromas, μέσω του οποίου επεξεργάστηκαν οι

Εικόνα 6.5 Ενδεικτική εικόνα τμήματος χρωματογραφήματος, αποτέλεσμα αλληλούχισης, στο οποίο φαίνονται ξεχωριστές χρωματιστές κορυφές για κάθε νουκλεοτιδική βάση



Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία επεξεργασίας των αλληλουχιών, αντιγράφηκαν στο εργαλείο BLAST όπου και έγινε σύγκριση με κατατεθειμένες αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων GenBank. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης έδειξαν υψηλή ομολογία των νέων αλληλουχιών με άλλες αλληλουχίες του USUV. Πιο συγκεκριμένα, η ομολογία εκτεινόταν σε ένα εύρος από 99,39% έως 100%, με απομονωμένες αλληλουχίες USUV από την Τσεχία (MN419913), τη Σλοβακία (MK881042), την Αυστρία (MK121944), την Ουγγαρία (MF063050), την Κροατία (MT891318). Αφού επιβεβαιώθηκε η ταυτότητα των απομονωμένων αλληλουχιών, τελικά κατατέθηκαν τρεις από αυτές στη βάση δεδομένων GenBank. Η μία ήταν από το 2022, με αριθμό πρόσβασης PP746542 (Εικόνα 6.6) και οι άλλες δύο από το 2020, με αριθμούς πρόσβασης PP746541 (Εικόνα 6.7) και PP746543 (Εικόνα 6.8), αντίστοιχα. Εξαιτίας του γεγονότος ότι δύο από τις τρεις αλληλουχίες που προέρχονταν από δειγματοληψίες τη χρονιά 2020, ήταν από το ίδιο σημείο (Άμπελοι, Σέρρες) καθώς και τον ίδιο μήνα, επιλέχθηκε μία από τις δύο να κατατεθεί στην GenBank.

Εικόνα 6.6 Αρχείο κατατεθειμένης αλληλουχίας στην GenBank του θετικού δείγματος για USUV που συλλέχθηκε το Σεπτέμβριο του 2022

Usutu virus isolate USUV1229/2022/GR nonstructural protein 5 gene, partial cds

GenBank: PP746542.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) ☺

```

LOCUS       PP746542                495 bp    RNA        linear   VRL 08-MAY-2024
DEFINITION  Usutu virus isolate USUV1229/2022/GR nonstructural protein 5 gene,
partial cds.
ACCESSION   PP746542
VERSION     PP746542.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Usutu virus
  ORGANISM  Usutu virus
            Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Kitrinoviricota; Flasuviricetes;
            Amarillovirales; Flaviviridae; Orthoflavivirus; Orthoflavivirus
            usutuense.
REFERENCE   1 (bases 1 to 495)
AUTHORS    Panagopoulou,A., Patsoula,E., Tegos,N. and Mpimpa,A.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (30-APR-2024) Public Health Policy, University of West
Attica, 196 Alexandras Ave., Athens 11521, Greece
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..495
                     /organism="Usutu virus"
                     /mol_type="genomic RNA"
                     /isolate="USUV1229/2022/GR"
                     /host="Culex pipiens complex"
                     /db_xref="taxon:64286"
                     /country="Greece"
                     /collection_date="28-Sep-2022"
     CDS              1..495
                     /note="NSS"
                     /codon_start=1
                     /product="nonstructural protein 5"
                     /protein_id="XAJ10925.1"
                     /translation="KNSGGGVEGLGVQKLGYLREMSHSGGKMYADDTAGMDTRITR
ADLDNEAKVLELMEGEHRQLARAIIEI LYKHVVKVWRPDTGKTVMQVISREDQRDS
QQVVTYALNTFTNIIVQLIRLHEAEGVIGQEHLES LPRKAKYAVRTWLF ENOEERVTR
MAVSG"
ORIGIN        1 aagaattcag gaggaggtgt tgaaggactt ggtgtccaaa aacttggtta cattctgct
61 gagatgagcc accattcagg tgggaaatg tacgaggatg acacagccgg ctggacacc
121 cggataacca gagccgatct tgacaacgag gccaaagttt tggagctgat ggaagggtgag
181 cacagacaac tagccagagc aatcattgag ctgacctaca aacacaaggt ggtgaaagtt
241 atgcgacctg gcacagatgg gaagaccgtc atggatgtga tttcccaga agatcagaga
301 gggagtgagc aggttgtgac ctatgctctc aacacattca ccaacattgc cgttcagctt
361 attgactgta tgggaagctga aggagtgatt ggcaggaac atctggaaag tcttcccgg
421 aaagccaat acgctgtgag aacctggctt tttgagaac gagaagaaag ggtgacccgc
481 atggctgtga gtgga
//

```

Εικόνα 6.7 Αρχείο κατατεθειμένης αλληλουχίας στην GenBank του θετικού δείγματος για USUV που συλλέχθηκε το Σεπτέμβριο του 2020

Usutu virus isolate USUV139/2020/GR nonstructural protein 5 gene, partial cds

GenBank: PP746541.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS PP746541 495 bp RNA linear VRL 08-MAY-2024

DEFINITION Usutu virus isolate USUV139/2020/GR nonstructural protein 5 gene, partial cds.

ACCESSION PP746541

VERSION PP746541.1

KEYWORDS .

SOURCE Usutu virus

ORGANISM [Usutu virus](#)
Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Kitrinoviricota; Flasuviricetes; Amarillovirales; Flaviviridae; Orthoflavivirus; Orthoflavivirus usutuense.

REFERENCE 1 (bases 1 to 495)

AUTHORS Panagopoulou,A., Patsoula,E., Tegos,N. and Mpimpa,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (30-APR-2024) Public Health Policy, University of West Attica, 196 Alexandras Ave., Athens 11521, Greece

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..495
/organism="Usutu virus"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="USUV139/2020/GR"
/host="Culex pipiens complex"
/db_xref="taxon:64286"
/country="Greece"
/collection_date="07-Sep-2020"

CDS <1..495
/note="NS5"
/codon_start=1
/product="nonstructural protein 5"
/protein_id="XAJ10924.1"
/translation="KNSGGVGLVQKLGYLREMSHSGGKMYADDTAGHDTRITR
ADLDNEAKVLELMEGEHRQLARAIIEITYKHVVKVMPGTGKTVMDVISREDQRGS
GQVVYALNFTNIAVQLIRLMEAEVIGQEHLES LPRKTKYAVRNL FENGEERVTR
MAVSG"

ORIGIN

```

1 aagaattctg gaggaggtgt tgaaggactt gggtcctaaa aacttggtta cattctcgt
61 gagatgagcc accattcagg tgggaaatg tacgaggatg acacagccgg ctgggacacc
121 cggataacca gagccgatct tgacaacgag gccaaagttt tggagctgat ggaaggtgag
181 cacagacaac tagccagagc aatcattgag ctgacctaca aacacaaggt ggtgaaagtt
241 atgcgacctg gcacagatgg gaagaccgtc atggatgta tttcccgaga agatcagaga
301 ggaagtggac aggttgtagc ctatgctctc aacacattca ccaacattgc cgttcagctt
361 attagactga tggaaactga aggagtgatt gggcaggaac atctggaag tcttccccgg
421 aaaaccaa at acgctgtgag aacctggctt tttgagaac gagaagaag ggtgacccgc
481 atggctgtga gtgga

```

//

Εικόνα 6.8 Αρχείο κατατεθειμένης αλληλουχίας στην GenBank του θετικού δείγματος για USUV που συλλέχθηκε τον Αύγουστο του 2020

Usutu virus isolate USUV39/2020/GR nonstructural protein 5 gene, partial cds

GenBank: PP746543.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) ☺

LOCUS PP746543 495 bp RNA linear VRL 08-MAY-2024
 DEFINITION Usutu virus isolate USUV39/2020/GR nonstructural protein 5 gene, partial cds.
 ACCESSION PP746543
 VERSION PP746543.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Usutu virus
 ORGANISM *Usutu virus*
 Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Kitrinoviricota; Flasuviricetes; Amarillovirales; Flaviviridae; OrthoFlavivirus; OrthoFlavivirus usutuense.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 495)
 AUTHORS Panagopoulou,A., Patsoula,E., Tegos,N. and Mpimpa,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-APR-2024) Public Health Policy, University of West Attica, 196 Alexandras Ave., Athens 11521, Greece
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..495
 /organism="Usutu virus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="USUV39/2020/GR"
 /host="Culex pipiens complex"
 /db_xref="taxon:64286"
 /country="Greece"
 /collection_date="24-Aug-2020"
 CDS
 <1..>495
 /note="NS5"
 /codon_start=1
 /product="nonstructural protein 5"
 /protein_id="XA710926.1"
 /translation="KNSGGGVEGLGVQKLGVILREMSHSGGKMYADDTAGWDTRITR
 ADLDNEAKVLELMEGEQRLARAIIEITYKHVVKVMRPGTDGKTYMVISREDQRGS
 GQVVTYALNTFTNIQVQLRLMEAEQVIGQEHLLESLPRKTKYAVRTWLFENGEERVTR
 MAVSG"
 ORIGIN
 1 aagaattctg gaggaggtg tgaaggactt ggtgtccaaa aacttggtta cattctcgt
 61 gagatgagcc accattcagg tgggaaatg tacgaggatg acacagccgg ctgggacacc
 121 cggataacca gagccgatct tgacaacgag gccaaagtgt tggagctgat ggaaggtgag
 181 caagacaac tagccagagc aatcattgag ctgacctaca aacacaaggt ggtgaaagt
 241 atgcgacctg gcacagatgg gaagaccgtc atggatgtga tttcccgaga agatcagaga
 301 ggaagtggac aggttgtgac ctatgctctc aacacattca ccaacattgc cgttcagctt
 361 attgactgta tggaaactga aggagtatt gggcaggaac atctggaag tcttccccgg
 421 aaaacaaat acgtgtgag aacctggctt tttgagaac gagaagaag ggtgaccgcc
 481 atggctgtga gtgga
 //

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ιός Usutu είναι ένας φλαβοϊός, ο οποίος για πρώτη φορά βρέθηκε το 1959 στη Νότια Αφρική και συγκεκριμένα κοντά στον ποταμό Usutu, από όπου και πήρε το όνομά του (109). Μεταδίδεται με το τσίμπημα κουνουπιού, κυρίως *Culex ripiens* και τα πτηνά αποτελούν τον βασικό ξενιστή του, με έρευνες να αναφέρουν και αρκετά θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, ως πιθανούς ξενιστές (94). Στην Ευρώπη, η πρώτη ανίχνευση του ιού έγινε μετά από ένα περιστατικό μαζικών θανάτων πτηνών (*Turdus merula*) το 2001 στην Αυστρία (92,109). Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη του νεοεμφανιζόμενου ιού στην Ευρώπη, οπότε και σε μία αναδρομική μελέτη επιβεβαιώθηκε η παρουσία του ιού σε πληθυσμούς πτηνών στην Τοσκάνη της Ιταλίας από το 1996 (109). Σύμφωνα με ευρήματα φυλογενετικών μελετών, ο ιός εισήχθη μέσω των διαδρομών των αποδημητικών πτηνών και μάλιστα πολλαπλές φορές πριν το 1996 (95). Συγκεκριμένα, η πρώτη πιθανή είσοδος χρονολογείται ήδη από τη δεκαετία του 1950, ενώ η δεύτερη εκτιμάται πως πραγματοποιήθηκε ύστερα το 1990 στην Ισπανία (95). Οι υποθέσεις αυτές έγιναν με βάση την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για τα γονίδια E, NS5, καθώς επίσης και δεδομένων από ολόκληρο το γονιδίωμα του ιού, συνδυαστικά με στοιχεία χαρτών που δείχνουν τις οδούς που ακολουθούσαν τα αποδημητικά πτηνά. Με αυτά τα δεδομένα γίνεται αντιληπτό ότι ο ιός κυκλοφορούσε για χρόνια στην Ευρώπη πριν από την ανίχνευσή του. Παρά το γεγονός ότι ο USUV προέρχεται από την Αφρική, είναι ελάχιστες οι μελέτες που έχουν λάβει χώρα στη συγκεκριμένη γεωγραφική ζώνη και επομένως οι πληροφορίες για τον ιό σε αυτή την ήπειρο είναι περιορισμένες (108). Οι περισσότερες έρευνες αφορούν σε ευρωπαϊκές χώρες και περιλαμβάνουν τον έλεγχο τόσο των ξενιστών (πτηνά, ιπποειδή, άνθρωπος κ.α.), όσο και των διαβιβαστών (κουνούπια) του ιού προκειμένου να διαμορφωθεί μια πληρέστερη εικόνα της κυκλοφορίας και της φύσης του, τα δεδομένα όμως εξακολουθούν να παραμένουν περιορισμένα. Καθώς ο ιός δεν αποτελεί σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία και τα ανθρώπινα περιστατικά με σοβαρή νόσηση που έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα είναι περιορισμένα (108), δεν υπάρχει έντονο ενδιαφέρον εκ μέρους της επιστημονικής κοινότητας, τις κρατικές αρχές δημόσιας υγείας και την πολιτεία ευρύτερα (94).

Στον άνθρωπο, φαινομενικά ο ιός έχει μικρή επίπτωση, τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Αφρική, παρά την ολοένα και αυξανόμενη κυκλοφορία σε κουνούπια και ζώα (108). Το γεγονός αυτό, αφενός μπορεί να οφείλεται στο ότι τα περισσότερα περιστατικά είναι είτε ασυμπτωματικά, είτε με ήπια συμπτώματα, οπότε και δεν ελέγχονται ώστε να υπάρχει

λεπτομερής καταγραφή (108). Αφετέρου, είναι πιθανό να οφείλεται σε υποδιάγνωση των περιστατικών εξαιτίας των εργαλείων με τα οποία μπορεί να διαγνωστεί η νόσος (99). Στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται ορολογικές μέθοδοι για την ανίχνευση αντισωμάτων (ELISA) και μοριακές μέθοδοι (RT-PCR) για την ανίχνευση του RNA του ιού (133). Και οι δύο προσεγγίσεις εμφανίζουν περιορισμούς, καθώς κατά κύριο λόγο στον ορολογικό έλεγχο έχουν παρατηρηθεί διασταυρούμενες αντιδράσεις του USUV με τον WNV λόγω της παρόμοιας αντιγονικής δομής των δύο ιών (99). Η ανίχνευση του RNA με μοριακές μεθόδους στο αίμα ασθενών από την άλλη, μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο εντός συγκεκριμένου χρονικού πλαισίου, κατά την οποία τα επίπεδα του ιού στον άνθρωπο είναι χαμηλά, με συνέπεια τις περισσότερες φορές αυτό να καθίσταται πρακτικά αδύνατον (99). Μελέτες που αφορούν τον WNV και την ανίχνευση του ιικού RNA στα ανθρώπινα υγρά, έδειξαν ότι τα επίπεδα του RNA στον άνθρωπο παραμένουν υψηλά τις πρώτες 3-6 μέρες μετά από την είσοδο του ιού στο σώμα (134,135). Δεδομένου ότι ο USUV ανήκει στην ίδια κατηγορία με τον WNV, είναι δηλαδή και οι δύο φλαβοϊοί με παρόμοια χαρακτηριστικά και βιολογικούς κύκλους, το παράθυρο ανίχνευσης του πρώτου στον ανθρώπινο οργανισμό ομοιάζει με αυτό του WNV. Καθίσταται αντιληπτό το επίπεδο δυσκολίας της διάγνωσης και κατ' επέκταση η πιθανή υποεκτίμηση της επίπτωσης στον ανθρώπινο πληθυσμό και η ανάγκη διαμόρφωσης νέων τεχνικών αυξημένης ευαισθησίας και ειδικότητας ώστε να παρέχεται η ικανότητα επιτυχούς διαχωρισμού των δύο αυτών φλαβοϊών. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί και η παράμετρος των διαφορετικών κλάδων του ιού και η εξέλιξή τους σε μορφές πιο προσαρμοσμένες και άρα πιο παθογόνες για τον ανθρώπινο οργανισμό (136,137). Ο κλάδος EU2, συγκριτικά με τους υπόλοιπους, φαίνεται να είναι υπεύθυνος για τα σοβαρά νευρολογικά συμπτώματα (οδηγώντας μέχρι και στο θάνατο), σύμφωνα με μελέτες (137). Η εξέλιξη του ιού σε βάθος χρόνου είναι δύσκολο να προβλεφθεί, επομένως απαιτείται στενή παρακολούθηση, ολοκληρωμένη επιτήρηση και επαγρύπνηση της πολιτείας.

Η παγκοσμιοποίηση, η κλιματική αλλαγή, η ικανότητα των ανθρώπων να μετακινούνται σε οποιοδήποτε σημείο του πλανήτη εύκολα και γρήγορα, αλλά και ο ολοένα αυξανόμενος πληθυσμός, φέρνουν την ανθρωπότητα αντιμέτωπη με αναδυόμενες ασθένειες (95,138). Ακραίες καιρικές συνθήκες, όπως πλημμύρες, παρατεταμένα διαστήματα με υψηλές θερμοκρασίες και μειωμένη περίοδο χειμώνα, που είναι απόρροια της κλιματικής αλλαγής, επηρεάζουν σημαντικά το βιολογικό κύκλο του USUV (99,113). Οι συνθήκες αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την χρονική επιμήκυνση της ενεργής περιόδου δραστηριότητας των

κουνουπιών, που αποτελούν διαβιβαστές του ιού, αλλά και την εξάπλωσή τους σε οικολογικές θέσεις που έχουν μετατραπεί σε ιδανικές για την επιβίωση και αναπαραγωγή (99,138). Εκτιμήσεις βασιζόμενες σε μαθηματικά μοντέλα κλιματολογικών προβλέψεων δείχνουν ότι όσο επιδεινώνεται το φαινόμενο της κλιματικής αλλαγής, τόσο πιο συχνές θα είναι οι εξάρσεις του USUV στην Ευρώπη (139). Λόγω της οικολογικής του επέκτασης σε θέσεις όπου κυκλοφορεί ήδη ο WNV, είναι πιθανό το σενάριο του ανταγωνισμού των δύο αυτών ιών, με ενδεχόμενο αποτέλεσμα αυτό της επικράτησης του USUV (94). Αντίστοιχη περίπτωση έχει περιγραφεί σε πολιτεία της Αμερικής με άλλους φλαβοϊούς, όπως είναι ο WNV και ο SLEV, όπου ο τελευταίος ήταν ενδημικός (94). Μετά από την εισβολή του WNV στην περιοχή της Νότιας Καλιφόρνια, τα επίπεδα του SLEV μειώθηκαν δραματικά και ο WNV επικράτησε (94). Μία ακόμη μελέτη που διερευνούσε τον ανταγωνισμό του USUV και του WNV σε πληθυσμούς κουνουπιών διαβιβαστών με ταυτόχρονη μόλυνση, έδειξε να επιβεβαιώνει σε ένα βαθμό την παραπάνω θεωρία (140). Πιο συγκεκριμένα, τα κουνούπια μολύνθηκαν με τον USUV μέσω λήψης αίματος και μέσω έγχυσης και ύστερα μολύνθηκαν με τον WNV, στην πρώτη περίπτωση εμφάνιζαν «αντοχή» στον WNV ενώ στη δεύτερη περίπτωση όχι (140). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την επικράτηση του USUV έναντι του WNV για τον ίδιο διαβιβαστή και καταδεικνύουν το ρόλο του εντέρου του εντόμου στον ανταγωνισμό και τον κύκλο ζωής των ιών (140). Με αυτά τα δεδομένα καθώς και τον ολοένα αυξανόμενο αριθμό χωρών που καταγράφουν την κυκλοφορία του, καθιστώντας τον πλέον ενδημικό στην Ευρώπη (99), γίνεται αντιληπτή η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη του ιού που να εστιάζει στην μεταδοτικότητα και τον ανταγωνισμό συγκριτικά με τον WNV. Η λήψη προληπτικών μέτρων προστασίας θα μπορούσε να προφυλάξει από ενδεχόμενες εξάρσεις του USUV.

Οι έρευνες γύρω από τον USUV είναι επίσης περιορισμένες στην Ελλάδα. Μία μελέτη στην οποία διενεργήθηκε ορολογικός έλεγχος σε οικόσιτα πτηνά και συγκεκριμένα περιστέρια, κατέγραψε ένα μεμονωμένο θετικό εύρημα το 2014 στην Κεντρική Μακεδονία, στην περιοχή της Βέροιας (111). Αυτό το εύρημα είναι σημαντικό καθώς καταδεικνύει την παρουσία του ιού στους ξενιστές – πτηνά και υπονοεί ότι είναι πιθανή η κυκλοφορία του ιού και σε πληθυσμούς κουνουπιών, που είναι οι διαβιβαστές, επομένως ήταν μια αρχική παρατήρηση που έχρηζε περαιτέρω διερεύνησης. Μία δεύτερη μελέτη διενεργήθηκε από την ερευνητική μας ομάδα, σε κουνούπια του γένους *Cx. pipiens* που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Αττικής τη χρονική περίοδο 2017-2018, χωρίς όμως ενδείξεις για την κυκλοφορία του ιού σε πληθυσμούς κουνουπιών εκείνη την διετία στην Αττική (112).

Επιπροσθέτως, έχουν διενεργηθεί και ορολογικές μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό και κάποιες βρίσκονται υπό εξέλιξη, επομένως τα αποτελέσματα δεν έχουν δημοσιευθεί ακόμα, γεγονός που καταδεικνύει το ολοένα αυξημένο ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της μελέτης του USUV.

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν ομάδες (pools) κουνουπιών του γένους *Culex pipiens* αναδρομικά για τέσσερις διαδοχικές χρονιές (2020 – 2023), σε περιοχές της Αττικής, της Κεντρικής Μακεδονίας και της Θεσσαλίας. Οι περιοχές επιλέχθηκαν με γνώμονα ευρωπαϊκές μελέτες που καταδεικνύουν την πιθανή ταυτόχρονη κυκλοφορία του WNV και του USUV στα κουνούπια *Cx. pipiens*, που αποτελούν κοινό διαβιβαστή των δύο ιών (112,113,116,117,141). Εκτός από κοινό διαβιβαστή, ο WNV και ο USUV, εμφανίζουν παρόμοιους ρυθμούς και τρόπους μετάδοσης, αλλά και ξενιστές, γεγονός που ενισχύει το σενάριο της συν-κυκλοφορίας (141). Οι γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας, συνεπώς, από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα είχαν ενοχοποιηθεί στο παρελθόν ως επίκεντρα για εξάρσεις του WNV και η παρουσία του εν λόγω ιού στους διαβιβαστές έχει επιβεβαιωθεί (85,112,129,130). Τα αποτελέσματα από την παρούσα πρωταρχική και περιορισμένης έκτασης μελέτη επιβεβαίωσαν την κυκλοφορία του USUV σε τέσσερα pools κουνουπιών, με το ένα από αυτά να είναι θετικό και για WNV. Η πλειονότητα των δειγμάτων προερχόταν από την Αττική, μία από τις πιο πυκνοκατοικημένες περιοχές της χώρας. Έχει υπάρξει το επίκεντρο εξάρσεων του WNV στο παρελθόν, ενώ σποραδικά είναι τα περιστατικά που καταγράφονται τα τελευταία χρόνια (112). Τα δείγματα με προέλευση την Αττική ήταν όλα αρνητικά για USUV, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας την περίοδο 2017-2018 (112). Ομοίως, μελέτες σχετικά με την κυκλοφορία του WNV, δείχνουν πως βρίσκεται σε ύφεση στην περιοχή της Αττικής, καθώς μεμονωμένα είναι τα κρούσματα που καταγράφονται τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε κουνούπια σύμφωνα με επίσημα στοιχεία του ΕΟΔΥ (85,112,129).

Η επόμενη περιοχή που επιλέχθηκε ήταν η Κεντρική Μακεδονία, μία από τις πιο επηρεαζόμενες περιοχές της χώρας από τον WNV, που καταγράφει κάθε χρόνο αρκετά ανθρώπινα κρούσματα (85,129,130). Ειδικά τις χρονιές από τις οποίες εντάχθηκαν δείγματα στη μελέτη μας, φαίνεται πως ήταν ιδιαίτερα έντονες χρονιές σχετικά με την κυκλοφορία του WNV στην Κεντρική Μακεδονία, με αποκορύφωμα το έτος 2022 (85). Το 2022 αποτέλεσε τη δεύτερη κατά σειρά χρονιά με τα περισσότερα ανθρώπινα κρούσματα μετά το 2018, ακολουθούμενη από τη χρονιά του 2010 οπότε και καταγράφηκε η πρώτη μεγάλη έξαρση για τη χώρα (85,130). Η Κεντρική Μακεδονία, εκτός των άλλων, από γεωγραφικής

και κλιματολογικής άποψης - αρκετά ποτάμια και λίμνες, υγρασία, συχνές βροχές ακόμα και το καλοκαίρι - αποτελεί μία από τις πιο ευνοϊκές περιοχές της Ελλάδας για την ανάπτυξη μεγάλων πληθυσμών κουνουπιών και κατ' επέκταση μεταφερόμενων ασθενειών (129). Ένα ακόμη δεδομένο που συνέβαλε στην επιλογή της συγκεκριμένης περιοχής ήταν το θετικό ορολογικό εύρημα περιστεριού από προηγούμενη μελέτη (111).

Τέλος, επιλέχθηκε και η περιοχή της Θεσσαλίας, η οποία καταγράφει επίσης περιστατικά WNV και επιπρόσθετα υπέστη μια καταστροφική πλημμύρα το 2023, απόρροια της κλιματικής αλλαγής που πλήττει και τη χώρα μας (85,129,130). Η Θεσσαλία, μαζί με την Κεντρική Μακεδονία, είναι από τις πλέον επηρεαζόμενες περιοχές από τον WNV, όχι με τόσα πολλά κρούσματα αριθμητικά όπως η τελευταία, ωστόσο στοιχεία του ΕΟΔΥ τις χρονιές των εξάρσεων (2010, 2018, 2022, 2023) επιβεβαιώνουν την ευαλωτότητα και αυτής της περιοχής (85). Η καταστροφική πλημμύρα του 2023 φαίνεται πως επηρέασε τα δεδομένα για την κυκλοφορία και του WNV στην περιοχή, μαζί με εξάρσεις και άλλων ασθενειών που έπονται τέτοιων καταστροφών, με την καταγραφή αρκετών κρουσμάτων σύμφωνα με την ετήσια έκθεση του ΕΟΔΥ.

Όλα τα θετικά δείγματα προέρχονταν γεωγραφικά από την Κεντρική Μακεδονία και χρονολογικά τρία ήταν από το 2020 και ένα από το 2022. Τα ευρήματα αυτά είναι ιδιαίτερης σημασίας για την χώρα, καθώς είναι η πρώτη φορά που ανιχνεύεται ο USUV σε πληθυσμούς *Cx. ripiens*, σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη κυκλοφορία WNV και USUV σε πληθυσμούς κουνουπιών. Τοπικά και χρονικά τα αποτελέσματά μας συνάδουν με τις εξάρσεις του WNV στη χώρα, ενισχύοντας και τα αποτελέσματα άλλων ερευνών που υποστηρίζουν την συν-κυκλοφορία των δύο ιών σε πληθυσμούς κουνουπιών (113,116). Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση του ΕΟΔΥ για τη λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου τη χρονιά του 2020 στην Ελλάδα, φαίνεται πως καταγράφηκαν αρκετά κρούσματα στους ανθρώπους (116 κρούσματα σε όλη τη χώρα), με κεντρικό σημείο εστίασης την περιφέρεια της Κεντρικής Μακεδονίας (142). Στην αντίστοιχη έκθεση του ΕΟΔΥ για τη χρονιά του 2022, καταδεικνύεται μια πιο έντονη χρονιά σε σχέση με το 2020. Η επίπτωση της νόσου ήταν μεγαλύτερη, αριθμώντας 183 ανθρώπινα κρούσματα συνολικά, με σημείο εντοπισμού των περισσότερων κρουσμάτων να αποτελεί η Κεντρική Μακεδονία, για ακόμη μία φορά (88). Συγκρίνοντας τις δύο αυτές ετήσιες εκθέσεις παρατηρούμε, εκτός από τη γεωγραφική ταύτιση των κρουσμάτων και τις δύο χρονιές, με κεντρικό σημείο εξάρσεων την περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας και χρονική ταύτιση των κρουσμάτων WNV, με την κορύφωση των εξάρσεων να αφορά στους μήνες Αύγουστο και Σεπτέμβριο. Τόσο η γεωγραφική όσο

και η χρονική αλληλοεπικάλυψη των καταγεγραμμένων ανθρώπινων κρουσμάτων WNV και των θετικών ευρημάτων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη αποτελούν υποσχόμενες ενδείξεις για την εξαγωγή αρχικών συμπερασμάτων. Μια υπόθεση που θα μπορούσε να προταθεί και να διερευνηθεί περαιτέρω στη συνέχεια είναι πως οι κρίσιμοι μήνες εξάρσεων του WNV στις ευάλωτες περιοχές της χώρας, πιθανά να αποτελούν και περιόδους κυκλοφορίας για τον USUV. Επομένως, σε αυτό το πρώιμο στάδιο διαπίστωσης της κυκλοφορίας του ιού τα μέτρα πρόληψης και επιτήρησης μπορούν να είναι στοχευμένα και να περιλαμβάνουν και τον έλεγχο για τον USUV. Ακόμη ενισχύεται περαιτέρω και το αρχικό εύρημα με τον θετικό ορολογικό έλεγχο σε πτηνά στην περιοχή της Κ. Μακεδονίας, καθώς φαίνεται ότι ο ιός κυκλοφορεί στην περιοχή μεταξύ ξενιστών και διαβιβαστών (πτηνά, κουνούπια) (111). Η αλληλούχηση των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματά μας, ανέδειξε αυξημένο βαθμό ομοιότητας με αλληλουχίες κατατεθειμένες στη GenBank από στελέχη της Τσεχίας, της Σλοβακίας, της Αυστρίας, της Ουγγαρίας και της Κροατίας. Όλες αυτές οι χώρες γειτνιάζουν μεταξύ τους, οπότε είναι αναμενόμενη η κυκλοφορία για τα ίδια στελέχη του ιού. Τα στελέχη με τα οποία βρέθηκαν ομοιότητες ήταν απομονωμένα τόσο από πτηνά, όσο και από κουνούπια, ενώ οι ημερομηνίες συλλογής των δειγμάτων χρονολογούνται από το 2015 και μετά. Στη χώρα μας λοιπόν, ο ιός πιθανότατα να εισήλθε μεταγενέστερα μέσω αποδημητικών πτηνών που προέρχονταν από τις χώρες αυτές και μετακινούνταν προς θερμότερα κλίματα. Πιθανολογείται πως έκαναν στάση στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας, μιας και εκεί υπάρχουν σημαντικοί υδροβιότοποι, ήταν μολυσμένα με τον USUV και τον μετέφεραν σε πληθυσμούς κουνουπιών της περιοχής. Εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού ομοιότητας που εμφανίζουν οι ελληνικές αλληλουχίες μεταξύ τους, αλλά και με τις λοιπές ευρωπαϊκές αλληλουχίες και με τα μέχρι τώρα δεδομένα, δεν φαίνεται η είσοδος του ιού να οφείλεται σε ανεξάρτητα γεγονότα. Δεδομένα για την ταυτότητα του ιού στο θετικό περιστέρι που βρέθηκε το 2014 δεν υπάρχουν, οπότε δεν είναι εφικτός ο ακριβής χρονικός προσδιορισμός της αρχικής εισόδου του ιού στη χώρα και αν αυτό συνέβη μία ή περισσότερες φορές. Περισσότερες πληροφορίες για την ταυτότητα και την προέλευση των απομονωμένων στελεχών USUV θα μπορούσε να δώσει η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος του ιού και στη συνέχεια μελέτες σύγκρισης και φυλογενετικής ανάλυσης.

Συμπερασματικά, μέσω της παρούσας εργασίας, θέτονται τα θεμέλια για τη διεξαγωγή πρόσθετων ερευνητικών μελετών, αναφορικά με τον ιό Usutu. Μελλοντικοί ερευνητικοί στόχοι θα μπορούσαν να αφορούν στον έλεγχο αυξημένου αριθμού pools κουνουπιών που

θα προέρχονται από άλλες περιοχές της χώρας, εκτός αυτών που εξετάστηκαν και από διαφορετικές χρονιές. Τα επιπλέον δείγματα προς έλεγχο θα μπορούσαν να προέρχονται από περιοχές ευάλωτες για την κυκλοφορία του WNV, μιας και καταδείχθηκε και στη δική μας εργασία η συν-κυκλοφορία των δύο ιών, για τις χρονιές πριν από το 2020, αλλά και από τη φετινή χρονιά και ύστερα. Συνυπολογίζοντας αποτελέσματα από μελέτες που καταγράφουν την κυκλοφορία του WNV όλο το χρόνο και όχι μόνο τους θερινούς μήνες όπως αρχικά πιστευόταν (131), το χρονικό παράθυρο επιλογής δειγμάτων για την ανίχνευση του USUV θα μπορούσε να επεκταθεί από τους θερινούς μήνες σε όλο το χρόνο. Ενδιαφέρον θα αποτελούσε και ο αναδρομικός έλεγχος περιοχών που δεν έχει καταγραφεί κυκλοφορία του WNV, έτσι ώστε να υπάρχει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της κατάστασης της χώρας σχετικά με την κυκλοφορία των δύο αυτών ιών. Επιπρόσθετα, το επιστημονικό ενδιαφέρον θα μπορούσε να επεκταθεί περαιτέρω και στον άνθρωπο και να υλοποιηθούν ορολογικές μελέτες σε κατοίκους ευάλωτων περιοχών της Ελλάδας προς αυτή την κατεύθυνση, αλλά και σε άλλους δυνητικούς ξενιστές του USUV (διάφορα είδη άγριων και οικόσιτων πτηνών, θηλαστικά) προκειμένου να υπάρχει πληρέστερη εικόνα της τρέχουσας κατάστασης. Στα πλαίσια της Ενιαίας Υγείας, αυτή η προσέγγιση αναμένεται να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση της σημαντικότητας και της επίπτωσης του συγκεκριμένου αρμοπιού για τη δημόσια υγεία, αλλά και τους πιθανούς παράγοντες κινδύνου. Η λεπτομερέστερη κατανόηση των τρόπων μετάδοσης, της κυκλοφορίας του ιού, θα οδηγήσει ακολούθως στην ανάπτυξη ειδικών και ευαίσθητων διαγνωστικών μεθόδων, με τις οποίες θα μπορούν να διαχωριστούν αποτελεσματικά οι δύο φλαβοϊοί (WNV και USUV), σε συνδυασμό με την εκπαίδευση των επαγγελματιών υγείας στην αναγνώριση και σύνδεση της κλινικής εικόνας της νόσου με τον USUV.

Αθροιστικά όλες αυτές οι γνώσεις αναμένεται να οδηγήσουν σε μεγαλύτερη ετοιμότητα της Ελλάδας απέναντι στον USUV, καθώς φαίνεται πως εξαπλώνεται με πολύ γρήγορους ρυθμούς στις γειτονικές ευρωπαϊκές χώρες. Μια χώρα της μεσογειακής λεκάνης, όπως η Ελλάδα, στην οποία ενδημεί ο WNV και πλήττεται από την κλιματική αλλαγή είναι αναγκαίο να έχει στην φαρέτρα της όπλα προστασίας έναντι των αναδυόμενων και νέο-αναδυόμενων ασθενειών που μεταδίδονται με διαβιβαστές, τόσο για ενδημικά είδη, όσο και χωροκατακτητικά. Μέτρα που λαμβάνονται για τον WNV, σύμφωνα με το σχέδιο δράσης του Υπουργείου Υγείας, όπως είναι η επιτήρηση στους ανθρώπους μέσω της ενημέρωσης και της ευαισθητοποίησης των κλινικών ιατρών για τα συμπτώματα που προκαλεί ο WNV, η επιτήρηση σε ιπποειδή, πτηνά και κουνούπια, θα μπορούσαν ανάλογα να εφαρμοσθούν

και για τον USUV (143). Απαραίτητη προϋπόθεση για να λειτουργήσουν τα παραπάνω προληπτικά μέτρα είναι η συνεργασία και επικοινωνία των διαφόρων φορέων, πάντοτε υπό το πρίσμα της Ενιαίας Υγείας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cheng Y, Tjaden NB, Jaeschke A, Lühken R, Ziegler U, Thomas SM, et al. Evaluating the risk for Usutu virus circulation in Europe: comparison of environmental niche models and epidemiological models. *Int J Health Geogr.* 2018 Dec;17(1):35.
2. Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic L, Tabain I, Stevanovic V, et al. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens.* 2020 Aug 26;9(9):699.
3. Angeloni G, Bertola M, Lazzaro E, Morini M, Masi G, Sinigaglia A, et al. Epidemiology, surveillance and diagnosis of Usutu virus infection in the EU/EEA, 2012 to 2021. *Eurosurveillance* [Internet]. 2023 Aug 17 [cited 2024 Apr 22];28(33). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.33.2200929>
4. Roesch F, Fajardo A, Moratorio G, Vignuzzi M. Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses.* 2019 Jul 12;11(7):640.
5. Siljic M, Sehovic R, Jankovic M, Stamenkovic G, Loncar A, Todorovic M, et al. Evolutionary dynamics of Usutu virus: Worldwide dispersal patterns and transmission dynamics in Europe. *Front Microbiol.* 2023 Mar 23;14:1145981.
6. Cadar D, Simonin Y. Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on Horizon? *Viruses.* 2022 Dec 27;15(1):77.
7. Giunti G, Becker N, Benelli G. Invasive mosquito vectors in Europe: From bioecology to surveillance and management. *Acta Trop.* 2023 Mar;239:106832.
8. WHO (2024). Vector-borne diseases [Internet]. [cited 2024 Mar 30]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
9. Hawkes FM, Hopkins RJ. The mosquito: An introduction. In: Hall M, Tamir D, editors. *Mosquitopia: The Place of Pests in a Healthy World* [Internet]. New York: Routledge; 2022 [cited 2024 Mar 26]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585164/>
10. Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, et al. *Mosquitoes and Their Control* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cited 2024 May 27]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-92874-4>
11. Peach DAH, Gries G. Mosquito phytophagy – sources exploited, ecological function, and evolutionary transition to haematophagy. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 2020;168(2):120–36.
12. Marín-López A, Raduwan H, Chen TY, Utrilla-Trigo S, Wolfhard DP, Fikrig E. Mosquito Salivary Proteins and Arbovirus Infection: From Viral Enhancers to Potential Targets for Vaccines. *Pathogens.* 2023 Mar;12(3):371.
13. Yee DA, Dean Bermond C, Reyes-Torres LJ, Fijman NS, Scavo NA, Nelsen J, et al. Robust network stability of mosquitoes and human pathogens of medical importance. *Parasit Vectors.* 2022 Jun 20;15(1):216.
14. Nebbak A, Almeras L, Parola P, Bitam I. Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) and Mosquito-Borne Diseases in North Africa. *Insects.* 2022 Oct 20;13(10):962.
15. Dahmana H, Mediannikov O. Mosquito-Borne Diseases Emergence/Resurgence and How to Effectively Control It Biologically. *Pathogens.* 2020 Apr 23;9(4):310.

16. Trammell CE, Goodman AG. Host Factors That Control Mosquito-Borne Viral Infections in Humans and Their Vector. *Viruses*. 2021 Apr 24;13(5):748.
17. Agboli, Leggewie, Altinli, Schnettler. Mosquito-Specific Viruses—Transmission and Interaction. *Viruses*. 2019 Sep 17;11(9):873.
18. Kendie FA, Hailegebriel W/kiros T, Nibret Semegn E, Ferede MW. Prevalence of Malaria among Adults in Ethiopia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Trop Med*. 2021 Mar 4;2021:8863002.
19. WHO (2024). Malaria [Internet]. [cited 2024 Aug 30]. Available from: <https://www.who.int/health-topics/malaria>
20. Bertola M, Mazzucato M, Pombi M, Montarsi F. Updated occurrence and bionomics of potential malaria vectors in Europe: a systematic review (2000–2021). *Parasit Vectors*. 2022 Mar 15;15:88.
21. WHO (2023). World malaria report 2023 [Internet]. [cited 2024 Aug 30]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240086173>
22. Biset G, Tadess AW, Tegegne KD, Tilahun L, Atnafu N. Malaria among under-five children in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Malar J*. 2022 Nov 16;21:338.
23. EOΔY (2023). malaria_annual_report_2023_gr.pdf [Internet]. [cited 2024 Aug 30]. Available from: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2024/06/malaria_annual_report_2023_gr.pdf
24. Perera R, Wickremasinghe R, Newby G, Caldera A, Fernando D, Mendis K. Malaria Control, Elimination, and Prevention as Components of Health Security: A Review. *Am J Trop Med Hyg*. 2022 Oct;107(4):747–53.
25. Chala B, Hamde F. Emerging and Re-emerging Vector-Borne Infectious Diseases and the Challenges for Control: A Review. *Front Public Health*. 2021 Oct 5;9:715759.
26. WHO (2021). Global technical strategy for malaria 2016-2030, 2021 update [Internet]. [cited 2024 Aug 30]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240031357>
27. Al-Osaimi HM, Kanan M, Marghlani L, Al-Rowaili B, Albalawi R, Saad A, et al. A systematic review on malaria and dengue vaccines for the effective management of these mosquito borne diseases: Improving public health. *Hum Vaccin Immunother*. 20(1):2337985.
28. WHO (2024). Malaria vaccines (RTS,S and R21) [Internet]. [cited 2024 Aug 31]. Available from: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/q-a-on-rt-s-malaria-vaccine>
29. Khan MB, Yang ZS, Lin CY, Hsu MC, Urbina AN, Assavalapsakul W, et al. Dengue overview: An updated systemic review. *Journal of Infection and Public Health*. 2023 Oct 1;16(10):1625–42.
30. WHO (2024). Dengue and severe dengue [Internet]. [cited 2024 Aug 31]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
31. Wang WH, Urbina AN, Chang MR, Assavalapsakul W, Lu PL, Chen YH, et al. Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020 Dec 1;53(6):963–78.

32. ECDC (2024). Dengue worldwide overview [Internet]. 2024 [cited 2024 Aug 31]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>
33. ΕΟΔΥ (2024). Αυξημένος κίνδυνος Δάγκειου πυρετού σε ταξιδιώτες σε ενδημικές χώρες του εξωτερικού – Μέτρα πρόληψης [Internet]. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. 2024 [cited 2024 Aug 31]. Available from: https://eody.gov.gr/kindinos_daggios_pyretos_exoteriko/
34. WHO (2024). Yellow fever [Internet]. [cited 2024 Aug 31]. Available from: <https://www.who.int/health-topics/yellow-fever>
35. Giancchetti E, Cianchi V, Torelli A, Montomoli E. Yellow Fever: Origin, Epidemiology, Preventive Strategies and Future Prospects. *Vaccines (Basel)*. 2022 Feb 27;10(3):372.
36. Oyono MG, Kenmoe S, Abanda NN, Takuissu GR, Ebogo-Belobo JT, Kenfack-Momo R, et al. Epidemiology of yellow fever virus in humans, arthropods, and non-human primates in sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Jul 22;16(7):e0010610.
37. ECDC (2019). AER-Yellow-Fever-2019.pdf [Internet]. [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-Yellow-Fever-2019.pdf>
38. WHO (2024). Zika virus [Internet]. [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
39. WHO (2024). Chikungunya fact sheet [Internet]. [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
40. de Lima Cavalcanti TYV, Pereira MR, de Paula SO, Franca RF de O. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. *Viruses*. 2022 May 5;14(5):969.
41. ECDC (2017). Factsheet about Zika virus disease [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/zika-virus-infection/facts/factsheet>
42. Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama MF, Zhou M, Huang Y, et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*. 2020 Apr 1;543:34–42.
43. WHO (2022). zika-epidemiology-update_february-2022_clean-version.pdf [Internet]. [cited 2024 Sep 1]. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/emergencies/zika/zika-epidemiology-update_february-2022_clean-version.pdf?sfvrsn=c4cec7b7_13&download=true
44. ECDC (2017). Chikungunya virus disease [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-virus-disease>
45. Bartholomeeusen K, Daniel M, LaBeaud DA, Gasque P, Peeling RW, Stephenson KE, et al. Chikungunya fever. *Nat Rev Dis Primers*. 2023 Apr 6;9(1):17.
46. ECDC (2017). Local transmission of chikungunya virus in mainland EU/EEA, 2007–present [Internet]. 2019 [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/chikungunya-virus-disease/surveillance-threats-and-outbreaks/local>
47. WHO (2024). Climate change [Internet]. [cited 2024 Aug 27]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/climate-change-and-health>

48. Palmeiro-Silva Y, Aravena-Contreras R, Izcue Gana J, González Tapia R, Kelman I. Climate-related health impact indicators for public health surveillance in a changing climate: a systematic review and local suitability analysis. *Lancet Reg Health Am*. 2024 Jul 29;38:100854.
49. Tidman R, Abela-Ridder B, de Castañeda RR. The impact of climate change on neglected tropical diseases: a systematic review. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2021 Jan 28;115(2):147–68.
50. Gizaw Z, Salubi E, Pietroniro A, Schuster-Wallace CJ. Impacts of climate change on water-related mosquito-borne diseases in temperate regions: A systematic review of literature and meta-analysis. *Acta Tropica*. 2024 Oct 1;258:107324.
51. Bezerra-Santos MA, Dantas-Torres F, Benelli G, Otranto D. Emerging parasites and vectors in a rapidly changing world: from ecology to management. *Acta Tropica*. 2023 Feb 1;238:106746.
52. Nelms BM, Macedo PA, Kothera L, Savage HM, Reisen WK. Overwintering Biology of *Culex* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in the Sacramento Valley of California. *jnl med entom*. 2013 Jul 1;50(4):773–90.
53. Sauer FG, Lange U, Schmidt-Chanasit J, Kiel E, Wiatrowska B, Myczko Ł, et al. Overwintering *Culex torrentium* in abandoned animal burrows as a reservoir for arboviruses in Central Europe. *One Health*. 2023 Jun;16:100572.
54. Semenza JC, Paz S. Climate change and infectious disease in Europe: Impact, projection and adaptation. *The Lancet Regional Health – Europe* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2024 Sep 4];9. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lanep/article/PIIS2666-7762\(21\)00216-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanep/article/PIIS2666-7762(21)00216-7/fulltext)
55. Colón-González FJ, Sewe MO, Tompkins AM, Sjödin H, Casallas A, Rocklöv J, et al. Projecting the risk of mosquito-borne diseases in a warmer and more populated world: a multi-model, multi-scenario intercomparison modelling study. *Lancet Planet Health*. 2021 Jul 7;5(7):e404–14.
56. Tsantalidou A, Arvanitakis G, Georgoulas AK, Akritidis D, Zanis P, Fornasiero D, et al. A Data Driven Approach for Analyzing the Effect of Climate Change on Mosquito Abundance in Europe. *Remote Sensing*. 2023 Jan;15(24):5649.
57. Ibáñez-Justicia A, Smits N, den Hartog W, van de Vossenberg B, De Wolf K, Deblauwe I, et al. Detection of Exotic Mosquito Species (Diptera: Culicidae) at International Airports in Europe. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 May;17(10):3450.
58. Lühken R, Brattig N, Becker N. Introduction of invasive mosquito species into Europe and prospects for arbovirus transmission and vector control in an era of globalization. *Infect Dis Poverty*. 2023 Nov 30;12(1):109.
59. ECDC (2024). Local transmission of dengue virus in mainland EU/EEA, 2010-present [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 9]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/dengue/surveillance-and-disease-data/autochthonous-transmission-dengue-virus-eueea>
60. Ainsworth C. Tropical diseases move north. *Nature* [Internet]. 2023 Nov 9 [cited 2024 Sep 4]; Available from: <https://www.nature.com/articles/d41586-023-03476-7>
61. ECDC (2017). *Aedes aegypti* - Factsheet for experts [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 9]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-aegypti>

62. ECDC (2017). *Aedes koreicus* - Factsheet for experts [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 9]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-koreicus>
63. ECDC (2017). *Aedes japonicus* - Factsheet for experts [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 9]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-japonicus>
64. Onen H, Luzala MM, Kigozi S, Sikumbili RM, Muanga CJK, Zola EN, et al. Mosquito-Borne Diseases and Their Control Strategies: An Overview Focused on Green Synthesized Plant-Based Metallic Nanoparticles. *Insects*. 2023 Feb 23;14(3):221.
65. Qian X, Qi Z. Mosquito-Borne Flaviviruses and Current Therapeutic Advances. *Viruses*. 2022 Jun 5;14(6):1226.
66. Jones RT, Ant TH, Cameron MM, Logan JG. Novel control strategies for mosquito-borne diseases. *Phil Trans R Soc B*. 2021 Feb 15;376(1818):20190802.
67. Vereecken S, Vanslebrouck A, Kramer IM, Müller R. Phenotypic insecticide resistance status of the *Culex pipiens* complex: a European perspective. *Parasites Vectors*. 2022 Nov 12;15(1):423.
68. Shaikevich EV, Vinogradova EB, Bouattour A, Gouveia de Almeida AP. Genetic diversity of *Culex pipiens* mosquitoes in distinct populations from Europe: contribution of *Cx. quinquefasciatus* in Mediterranean populations. *Parasites & Vectors*. 2016 Jan 27;9(1):47.
69. Aardema ML, vonHoldt BM, Fritz ML, Davis SR. Global evaluation of taxonomic relationships and admixture within the *Culex pipiens* complex of mosquitoes. *Parasites & Vectors*. 2020 Jan 8;13(1):8.
70. Haba Y, McBride L. Origin and status of *Culex pipiens* mosquito ecotypes. *Current Biology*. 2022 Mar;32(5):R237–46.
71. Chaturanga WGD, Karunaratne SHPP, Fernando BR, De Silva WAPP. Diversity, distribution, abundance, and feeding pattern of tropical ornithophilic mosquitoes. *J Vector Ecol*. 2018 Jun;43(1):158–67.
72. Asgharian H, Chang PL, Lysenkov S, Scobeyeva VA, Reisen WK, Nuzhdin SV. Evolutionary genomics of *Culex pipiens*: global and local adaptations associated with climate, life-history traits and anthropogenic factors. *Proc Biol Sci*. 2015 Jul 7;282(1810):20150728.
73. Tolsá-García MJ, Wehmeyer ML, Lühken R, Roiz D. Worldwide transmission and infection risk of mosquito vectors of West Nile, St. Louis encephalitis, Usutu and Japanese encephalitis viruses: a systematic review. *Sci Rep*. 2023 Jan 6;13(1):308.
74. Ruybal JE, Kramer LD, Kilpatrick AM. Geographic variation in the response of *Culex pipiens* life history traits to temperature. *Parasit Vectors*. 2016 Feb 29;9:116.
75. Brugman VA, Hernández-Triana LM, Medlock JM, Fooks AR, Carpenter S, Johnson N. The Role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in Virus Transmission in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018 Feb;15(2):389.
76. Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM. “BIRD BITING” MOSQUITOES AND HUMAN DISEASE: A REVIEW OF THE ROLE OF CULEX PIPIENS COMPLEX MOSQUITOES IN EPIDEMIOLOGY. *Infect Genet Evol*. 2011 Oct;11(7):1577–85.

77. WHO (2024). West Nile virus [Internet]. [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>
78. Bampali M, Konstantinidis K, Kellis EE, Pouni T, Mitroulis I, Kottaridi C, et al. West Nile Disease Symptoms and Comorbidities: A Systematic Review and Analysis of Cases. *Trop Med Infect Dis.* 2022 Sep 8;7(9):236.
79. Koch RT, Erazo D, Folly AJ, Johnson N, Dellicour S, Grubaugh ND, et al. Genomic epidemiology of West Nile virus in Europe. *One Health.* 2024 Jun 1;18:100664.
80. Lu L, Zhang F, Munnink BBO, Munger E, Sikkema RS, Pappa S, et al. West Nile virus spread in Europe: Phylogeographic pattern analysis and key drivers. *PLOS Pathogens.* 2024;20(1):e1011880.
81. Farooq Z, Sjödin H, Semenza JC, Tozan Y, Sewe MO, Wallin J, et al. European projections of West Nile virus transmission under climate change scenarios. *One Health.* 2023 Jun 1;16:100509.
82. Engler O, Savini G, Papa A, Figuerola J, Groschup MH, Kampen H, et al. European Surveillance for West Nile Virus in Mosquito Populations. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2013 Oct;10(10):4869–95.
83. ECDC (2024). Historical data by year - West Nile virus seasonal surveillance [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical>
84. ECDC (2024). Worsening spread of mosquito-borne disease outbreaks in EU/EEA, according to latest ECDC figures [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 4]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/worsening-spread-mosquito-borne-disease-outbreaks-eueea-according-latest-ecdc-figures>
85. Pervanidou D, Kefaloudi CN, Vakali A, Tsakalidou O, Karatheodorou M, Tsioka K, et al. The 2022 West Nile Virus Season in Greece; A Quite Intense Season. *Viruses.* 2023 Jun 29;15(7):1481.
86. EOΔY (2013). *etisia_ekthesi_idn_2010_ellada_revised_2013.pdf* [Internet]. [cited 2024 Sep 12]. Available from: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/etisia_ekthesi_idn_2010_ellada_revised_2013.pdf
87. EOΔY (2019). *Annual_Report_WNV_2018_GR.pdf* [Internet]. [cited 2024 Sep 12]. Available from: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/04/Annual_Report_WNV_2018_GR.pdf
88. EOΔY (2023). *annual_report_wnv_2022_gr.pdf* [Internet]. [cited 2024 Aug 30]. Available from: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2023/04/annual_report_wnv_2022_gr.pdf
89. CDC (2024). West Nile Virus. 2024 [cited 2024 Sep 12]. Historic Data (1999-2023). Available from: <https://www.cdc.gov/west-nile-virus/data-maps/historic-data.html>
90. Ronca SE, Ruff JC, Murray KO. A 20-year historical review of West Nile virus since its initial emergence in North America: Has West Nile virus become a neglected tropical disease? *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2021;15(5):e0009190.
91. Simonin Y. Usutu, West Nile, and Tick-Borne Encephalitis Viruses. *Viruses.* 2022 Sep 25;14(10):2120.

92. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van De Perre P, et al. Usutu virus: A new threat? *Epidemiol Infect.* 2019;147:e232.
93. Gaibani P, Rossini G. An overview of Usutu virus. *Microbes and Infection.* 2017 Jul 1;19(7):382–7.
94. Roesch F, Fajardo A, Moratorio G, Vignuzzi M. Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses.* 2019 Jul 12;11(7):640.
95. Engel D, Jöst H, Wink M, Börstler J, Bosch S, Garigliany MM, et al. Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa. *mBio.* 2016 Feb 2;7(1):e01938-15.
96. Prat M, Jeanneau M, Rakotoarivony I, Duhayon M, Simonin Y, Savini G, et al. Virulence and transmission vary between Usutu virus lineages in *Culex pipiens*. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2024;18(6):e0012295.
97. Zecchin B, Fusaro A, Milani A, Schivo A, Ravagnan S, Ormelli S, et al. The central role of Italy in the spatial spread of USUTU virus in Europe. *Virus Evolution.* 2021 Jan 20;7(1):veab048.
98. Bakonyi T, Erdélyi K, Brunthaler R, Dán Á, Weissenböck H, Nowotny N. Usutu virus, Austria and Hungary, 2010–2016. *Emerg Microbes Infect.* 2017 Oct;6(10):e85.
99. Simonin Y. Circulation of West Nile Virus and Usutu Virus in Europe: Overview and Challenges. *Viruses.* 2024 Apr 12;16(4):599.
100. Cadar D, Simonin Y. Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on Horizon? *Viruses.* 2022 Dec 27;15(1):77.
101. Oude Munnink BB, Münger E, Nieuwenhuijse DF, Kohl R, Van Der Linden A, Schapendonk CME, et al. Genomic monitoring to understand the emergence and spread of Usutu virus in the Netherlands, 2016–2018. *Sci Rep.* 2020 Feb 18;10(1):2798.
102. Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn RJ. Coupling of Replication and Assembly in Flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2014 Dec;0:134–42.
103. Van Leur SW, Heunis T, Munnur D, Sanyal S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence.* 2021 Dec 31;12(1):2814–38.
104. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2012 Apr;2(2):168–75.
105. Agliani G, Giglia G, Marshall EM, Gröne A, Rockx BHG, Van Den Brand JMA. Pathological features of West Nile and Usutu virus natural infections in wild and domestic animals and in humans: A comparative review. *One Health.* 2023 Jun;16:100525.
106. Giglia G, Agliani G, Munnink BBO, Sikkema RS, Mandara MT, Lepri E, et al. Pathology and Pathogenesis of Eurasian Blackbirds (*Turdus merula*) Naturally Infected with Usutu Virus. *Viruses.* 2021 Jul 28;13(8):1481.
107. Gaibani P, Barp N, Massari M, Negri EA, Rossini G, Vocale C, et al. Case report of Usutu virus infection in an immunocompromised patient in Italy, 2022. *J Neurovirol.* 2023 Jun 1;29(3):364–6.

108. Akinsulie OC, Adesola RO, Bakre A, Adebowale OO, Adeleke R, Ogunleye SC, et al. Usutu virus: An emerging flavivirus with potential threat to public health in Africa: Nigeria as a case study. *Front Vet Sci.* 2023 Feb 16;10:1115501.
109. Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe. *Viruses.* 2015 Jan 19;7(1):219–38.
110. Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic L, Tabain I, Stevanovic V, et al. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens.* 2020 Aug 26;9(9):699.
111. Chaintoutis SC, Dovas CI, Papanastassopoulou M, Gewehr S, Danis K, Beck C, et al. Evaluation of a West Nile virus surveillance and early warning system in Greece, based on domestic pigeons. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2014 Mar;37(2):131–41.
112. Beleri S, Balatsos G, Karras V, Tegos N, Sereti F, Rachiotis G, et al. Seasonal Phenological Patterns and Flavivirus Vectorial Capacity of Medically Important Mosquito Species in a Wetland and an Urban Area of Attica, Greece. *TropicalMed.* 2021 Sep 28;6(4):176.
113. Zannoli S., Sambri V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms.* 2019 Jun 26;7(7):184.
114. Llorente F, García-Irazábal A, Pérez-Ramírez E, Cano-Gómez C, Sarasa M, Vázquez A, et al. Influence of flavivirus co-circulation in serological diagnostics and surveillance: A model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses. *Transbound Emerg Dis.* 2019 Sep;66(5):2100–6.
115. Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, et al. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *Journal of Virological Methods.* 2013 May 1;189(2):321–7.
116. Čabanová V, Šikutová S, Straková P, Šebesta O, Vichová B, Zubříková D, et al. Co-Circulation of West Nile and Usutu Flaviviruses in Mosquitoes in Slovakia, 2018. *Viruses.* 2019 Jul;11(7):639.
117. Klobucar A, Savic V, Curman Posavec M, Petrinic S, Kuhar U, Toplak I, et al. Screening of Mosquitoes for West Nile Virus and Usutu Virus in Croatia, 2015–2020. *TropicalMed.* 2021 Apr 2;6(2):45.
118. Bakran-Lebl K, Camp JV, Kolodziejek J, Weidinger P, Hufnagl P, Cabal Rosel A, et al. Diversity of West Nile and Usutu virus strains in mosquitoes at an international airport in Austria. *Transboundary Emerging Dis.* 2022 Jul;69(4):2096–109.
119. Constant O, Gil P, Barthelemy J, Bolloré K, Foulongne V, Desmetz C, et al. One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 2022 Jun 23 [cited 2024 Apr 22];27(25). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.25.2200068>
120. Bravo-Barriga D, Ferraguti M, Magallanes S, Aguilera-Sepúlveda P, Llorente F, Pérez-Ramírez E, et al. Identification of Usutu Virus Africa 3 Lineage in a Survey of Mosquitoes and Birds from Urban Areas of Western Spain. Simulundu E, editor. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2023 Feb 22;2023:1–10.

121. Sambri V, Groschup MH, Bialonski A, Becker N, Maus D, Eiden M, et al. Isolation of Usutu Virus in Germany. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011 Sep 1;85(3):551–3.
122. Vilibic-Cavlek T, Savic V, Petrovic T, Toplak I, Barbic L, Petric D, et al. Emerging Trends in the Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Southern Europe. *Front Vet Sci*. 2019 Dec 6;6:437.
123. Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE, Gould EA. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *Journal of General Virology*. 2003 Oct 1;84(10):2807–17.
124. Tamba M, Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Albieri A, Sambri V, et al. Detection of Usutu Virus Within a West Nile Virus Surveillance Program in Northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011 May;11(5):551–7.
125. Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, Stiasny K, Aberle JH, Zoufaly A, et al. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Euro Surveill*. 2018 Oct;23(43):1800545.
126. Sinigaglia A, Pacenti M, Martello T, Pagni S, Franchin E, Barzon L. West Nile virus infection in individuals with pre-existing Usutu virus immunity, northern Italy, 2018. *Euro Surveill*. 2019 Dec;24(21):1900261.
127. Vilibic-Cavlek T, Kaic B, Barbic L, Pem-Novosel I, Slavic-Vrzic V, Lesnikar V, et al. First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infection*. 2014 Aug;42(4):689–95.
128. Panagopoulou A, Tegos N, Beleri S, Mpimpa A, Balatsos G, Michaelakis A, et al. Molecular detection of Usutu virus in pools of *Culex pipiens* mosquitoes in Greece. *Acta Tropica*. 2024 Oct 1;258:107330.
129. Vakali A, Beleri S, Tegos N, Fytrou A, Mpimpa A, Sergeantanis TN, et al. Entomological Surveillance Activities in Regions in Greece: Data on Mosquito Species Abundance and West Nile Virus Detection in *Culex pipiens* Pools (2019–2020). *TropicalMed*. 2022 Dec 20;8(1):1.
130. Patsoula E, Vakali A, Balatsos G, Pervanidou D, Beleri S, Tegos N, et al. West Nile Virus Circulation in Mosquitoes in Greece (2010–2013). *BioMed Research International*. 2016 May 12;2016:e2450682.
131. Balatsos G, Beleri S, Tegos N, Bisia M, Karras V, Zavitsanou E, et al. Overwintering West Nile virus in active *Culex pipiens* mosquito populations in Greece. *Parasites & Vectors*. 2024 Jul 2;17(1):286.
132. Hubálek Z, Rudolf I, Čapek M, Bakonyi T, Betášová L, Nowotny N. Usutu Virus in Blackbirds (*Turdus merula*), Czech Republic, 2011-2012. *Transbound Emerg Dis*. 2014 Jun;61(3):273–6.
133. Vázquez A, Jiménez-Clavero MA, Franco L, Donoso-Mantke O, Sambri V, Niedrig M, et al. Usutu virus – potential risk of human disease in Europe. *Eurosurveillance* [Internet]. 2011 Aug 4 [cited 2024 Apr 22];16(31). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.16.31.19935-en>
134. Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, et al. Virus and Antibody Dynamics in Acute West Nile Virus Infection. *J INFECT DIS*. 2008 Oct;198(7):984–93.

135. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. 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*. 2000 Nov;38(11):4066–71.
136. Marion C, Constant O, Barthelemy J, Desmetz C, Martin MF, Lapeyre L, et al. Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. *Journal of Neuroinflammation*. 2021 Jan 6;18.
137. Van Bree JWM, Linthout C, Van Dijk T, Abbo SR, Fros JJ, Koenraadt CJM, et al. Competition between two Usutu virus isolates in cell culture and in the common house mosquito *Culex pipiens*. *Front Microbiol*. 2023 May 24;14:1195621.
138. Cheng Y, Tjaden NB, Jaeschke A, Lühken R, Ziegler U, Thomas SM, et al. Evaluating the risk for Usutu virus circulation in Europe: comparison of environmental niche models and epidemiological models. *Int J Health Geogr*. 2018 Dec;17(1):35.
139. Weidinger P, Kolodziejek J, Bakonyi T, Brunthaler R, Erdélyi K, Weissenböck H, et al. Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017–2018. *Transbound Emerg Dis*. 2020 Jan;67(1):298–307.
140. Wang H, Abbo SR, Visser TM, Westenberg M, Geertsema C, Fros JJ, et al. Competition between Usutu virus and West Nile virus during simultaneous and sequential infection of *Culex pipiens* mosquitoes. *Emerging Microbes & Infections*. 2020 Jan;9(1):2642–52.
141. Martinet JP, Bohers C, Vazeille M, Ferté H, Mousson L, Mathieu B, et al. Assessing vector competence of mosquitoes from northeastern France to West Nile virus and Usutu virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2023;17(6):e0011144.
142. EOΔY (2020). *annual_report_wnv_2020_gr.pdf* [Internet]. [cited 2024 Aug 30]. Available from: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/09/annual_report_wnv_2020_gr.pdf
143. EOΔY (2023). *annual_report_wnv_2023_gr.pdf* [Internet]. [cited 2024 Jul 22]. Available from: https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2023/07/annual_report_wnv_2023_gr.pdf