



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ**  
**Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**  
**2018-2020**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**«Ορολογική διερεύνηση για τον ιό του Δυτικού Νείλου σε σκύλους στην**  
**Περιφέρεια Αττικής»**

**ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**  
**ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**Αθήνα, Απρίλιος 2021**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ**  
**Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**  
**2018-2020**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**«Ορολογική διερεύνηση για τον ιό του Δυτικού Νείλου σε σκύλους στην**  
**Περιφέρεια Αττικής»**

**ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**  
**ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ**  
**ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΑΚΗΣ**

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

- 1. Εμμανουήλ Παπαδογιαννάκης, Καθηγητής**
- 2. Πατσουλά Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια**
- 3. Νικόλαος Τέγος, Βιολόγος (ΕΔΙΠ)**

**Αθήνα, Απρίλιος 2021**

Copyright © < Ευαγγελόπουλος Κωνσταντίνος>, <2021>

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 απαραίτητως και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας.

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Ευαγγελόπουλος Κωνσταντίνος του Σωτηρίου, με αριθμό μητρώου mdy18016 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής 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».

Ο Δηλών



Ευαγγελόπουλος Κωνσταντίνος

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η ορολογική διερεύνηση για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού του Δυτικού Νείλου σε δεσποζόμενους σκύλους στην Περιφέρεια Αττικής. Ο σκύλος κατά κανόνα είναι ασυμπτωματικός στη μόλυνση από τον ιό και για το λόγο αυτό θεωρείται ως ζώο «φρουρός», δηλαδή η ανίχνευση αντισωμάτων στο ζώο αυτό σε μεγάλο αριθμό σκύλων, προειδοποιεί ότι κατά πάσα πιθανότητα επέρχεται επιδημική έξαρση της νόσου στον άνθρωπο. Η διπλωματική αυτή εργασία έχει σαν στόχο να εκτιμηθεί ο ρόλος των σκύλων ως φρουρών για τη μελέτη της επιδημιολογίας και της κυκλοφορίας του ιού του Δυτικού Νείλου στην Περιφέρεια Αττικής. Συλλέχτηκαν και εξετάστηκαν οροί από 182 δεσποζόμενους σκύλους, από τη μείζονα περιοχή της Αττικής. Για την εξέταση των ορών, χρησιμοποιήθηκε ένα Kit για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της πρωτεΐνης E του φακέλου του ιού του Δυτικού Νείλου σε ορούς αλόγων και πτηνών, με τη μέθοδο της ανταγωνιστικής ELISA (ID Screen West Nile Competition Multi-species, ID.Vet, FRANCE). Οι σκύλοι ήταν σε ποσοστό 56% αρσενικοί και 44% θηλυκοί. Σε σύνολο 182 δειγμάτων, βρέθηκαν 5 θετικά δείγματα. Παρατηρήθηκε δηλαδή χαμηλό ποσοστό οροεπιπολασμού (3%). Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά τον οροεπιπολασμό του ιού του Δυτικού Νείλου σε σκύλους στην Ελλάδα. Η μελέτη επιβεβαίωσε την ύπαρξη σκύλων θετικών (3%) σε αντισώματα ορού κατά του WNV στη Περιφέρεια Αττικής και τη γύρω περιοχή. Τα ευρήματά δείχνουν ότι αυτά τα ζώα μπορεί να διαδραματίσουν ρόλο ως φρουροί και εύκολα προσβάσιμοι ορολογικοί δείκτες του τι μπορεί να συμβεί στον ανθρώπινο πληθυσμό σε σχέση με αυτή τη ζωοανθρωπονόσο. Η πιθανή δειγματοληψία ορών σκύλων για τον προσδιορισμό της συχνότητας μόλυνσης από WNV παρέχει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της ιικής δραστηριότητας.

**Λέξεις - κλειδιά:** Ιός του Δυτικού Νείλου, ορολογική έρευνα, επιτήρηση, φρουρός, σκύλος.

## **ABSTRACT**

The purpose of this master's thesis is the serological investigation for the detection of antibodies against the West Nile virus in owned dogs in the Attica Region. Dogs are frequently infected with WNV, although most remain asymptomatic and are therefore considered as "sentinel" animals, ie the detection of WNV antibodies in a large number of dogs, warns that there is likely to be an epidemic outbreak in humans. The aim of this dissertation is to evaluate the role of dogs as sentinels for the study of the epidemiology and the circulation of the West Nile virus in the Attica Region. Serum samples collected from 182 owned dogs from the major region of Attica were examined. A commercial kit was used to detect antibodies against the protein E of the West Nile virus envelope in horse and bird sera, using the competitive ELISA method (ID Screen West Nile Competition Multi-species, ID.Vet, FRANCE ). The dogs were 56% male and 44% female. In a total of 182 samples, 5 positive samples were found. In other words, a low seroprevalence rate was observed (3%). This is the first study to investigate the seroprevalence of West Nile virus in dogs in Greece. The study confirmed the existence of dogs positive (3%) for serum antibodies against WNV in the Attica Region and the surrounding area. The findings show that these animals can play a role as "sentinels" and easily accessible serological indicators of what can happen to the human population in relation to this zoonotic disease. Possible sampling of dog serum to determine the frequency of WNV infection provides a very useful tool for assessing viral activity.

**Key-words:** West Nile virus, serological survey, surveillance, sentinel, dog.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ (WEST NILE VIRUS, WNV)

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Μοριακή επιδημιολογία

Εξελικτικός κλάδος 1

Εξελικτικός κλάδος 2

Πρόσθετοι προτεινόμενοι εξελικτικοί κλάδοι

ΚΥΚΛΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ

1. Μετάδοση με κουνούπια (Δίπτερα: *Culicidae*)

1.1. Ενζωτικός κύκλος

1.2. Φορείς-γέφυρα

2. Άλλοι πιθανοί φορείς

3. Διατήρηση και εξάπλωση

3.1. Πουλιά, φυσικοί ξενιστές για τον ιό του Δυτικού Νείλου

3.2. Άλλοι πιθανοί κύκλοι μετάδοσης για τον ιό του Δυτικού Νείλου

3.2.1. Άλλοι πιθανοί ξενιστές ενισχυτές

3.2.2. Μη ιαμική μετάδοση

3.2.3. Νέες οδοί μετάδοσης: μετάδοση χωρίς φορέα

4. Κύκλοι μετάδοσης αρμποϊών και αστικοποίηση

4.1. Καθοριστικοί παράγοντες της αστικοποίησης των αρμποϊών μέσω της ανθρώπινης μετάδοσης

5. Παράγοντες που προκαλούν αλλαγές στη κατανομή του ιού του Δυτικού Νείλου

5.1. Παράγοντες που συνδέονται με την κλιματική αλλαγή και τους πληθυσμούς κουνουπιών

5.2. Παράγοντες που συνδέονται με πληθυσμούς πουλιών

5.2.1. Κινήσεις πουλιών: μετανάστευση και διασπορά

5.2.2. Ποικιλομορφία και ανομοιογένεια ξενιστών

Επιδημιολογικά δεδομένα στην Ελλάδα

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Άνθρωπος

1. Παράγοντες κινδύνου
2. Επιπτώσεις στη δημόσια υγεία

Ζώα

## ΔΙΑΓΝΩΣΗ

1. Εργαστηριακή διάγνωση
  - 1.1. Ορολογική διάγνωση
  - 1.2. Ανίχνευση και απομόνωση του ιού
  - 1.3. Διάγνωση οξείας λοίμωξης από τον WNV
  - 1.4. Νέες μέθοδοι για ανίχνευση του WNV

## ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1. Ριμπαβιρίνη
2. Ιντερφερόνη α
3. Ανοσοσφαιρίνη

## ΠΡΟΛΗΨΗ

Εμβόλια

Έλεγχος φορέων και ατομική προστασία

Πρόληψη επιδημιών

Μοντέλα πρόβλεψης κινδύνου

1. Μοντέλα πρόβλεψης που βασίζονται σε φορείς
2. Μοντέλα με βάση τον πληθυσμό
3. Μελλοντικές προοπτικές

## ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ

1. Επιτήρηση του WNV στα πλαίσια της Ενιαίας Υγείας
2. Επιτήρηση και παρακολούθηση του WNV στην Ελλάδα

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ζώα και υλικό

Ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού του Δυτικού Νείλου



2.1. Εκτέλεση της δοκιμής

2.2. Προϋποθέσεις ελέγχου ορθής διαδικασίας / εκτίμησης αποτελέσματος.

2.3. Ηθικά ζητήματα

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά την θερινή περίοδο του Ακαδημαϊκού Έτους 2019 - 2020, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Δημόσιας Υγείας του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV), είναι ένας φλαβοϊός που μεταδίδεται με αρthropoδα, του οποίου ο κύκλος μετάδοσης περιλαμβάνει τόσο κουνούπια όσο και πουλιά ως ενισχυτικούς ξενιστές και ανθρώπους και άλογα ως τελικούς ξενιστές. Περίπου το 20% των ασθενών που έχουν μολυνθεί με WNV αναπτύσσουν πυρετό του Δυτικού Νείλου, ενώ σε λιγότερο από 1%, η μόλυνση οδηγεί σε νευρολογική νόσο του Δυτικού Νείλου. Τα τελευταία χρόνια ο ιός του Δυτικού Νείλου εξαπλώθηκε παγκόσμια και αυτή τη στιγμή είναι ενδημικός στην Αφρική, τη Μέση Ανατολή, την Ινδία, την Αυστραλία, την κεντρική και νότια Ευρώπη και την Αμερική. Ολοκληρωμένα συστήματα επιτήρησης και περιβαλλοντικά δεδομένα στοχεύουν στην ανίχνευση της κυκλοφορίας του ιού και στη μείωση του κινδύνου μόλυνσης για τον ανθρώπινο πληθυσμό τονίζοντας τον κρίσιμο ρόλο των αρχών της Ενιαίας Υγείας στη δημόσια υγεία. Μέρος της πρόληψης της μετάδοσης του ιού στον άνθρωπο αποτελούν τα προγράμματα επιτήρησης του ιού του Πυρετού του Δυτικού Νείλου στα ιπποειδή, στα πτηνά και σε άλλα ζώα ευαίσθητα στον ιό. Αποσκοπούν στον προσδιορισμό της πιθανής προέλευσης και των δεξαμενών (reservoirs) του ιού, ιδίως στα άγρια πτηνά, των γεωγραφικών περιοχών της χώρας που αποτελούν περιοχές υψηλού κινδύνου, των περιοχών όπου το νόσημα είναι πιθανό να γίνει ενδημικό, λόγω διατήρησης του ιού σε γηγενείς πληθυσμούς άγριων πτηνών, και των περιοχών όπου συμβαίνει αφανής κυκλοφορία του ιού (παρουσία του ιού χωρίς κλινικά κρούσματα σε ανθρώπους ή ζώα). Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της επιτήρησης, καθώς και κάθε άλλο διαθέσιμο σχετικό στοιχείο (π.χ. πληροφορίες εντομοεπιτήρησης), οι αρμόδιες αρχές για την επιτήρηση του ιού του WNV, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, μπορούν να εκτιμήσουν τη γεωγραφική έκταση της επιδημίας, ενώ εξάλλου, έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόσουν ανάλογα, τα υφιστάμενα μέτρα ελέγχου, επιτήρησης και πρόληψης της νόσου, για τη διασφάλιση της Δημόσιας Υγείας και της Υγείας των Ζώων. Η επιδημία WNV σε ζώα προηγείται των ανθρώπινων περιπτώσεων. Επομένως, ένα ενεργό σύστημα επιτήρησης για την

ανίχνευση κρουσμάτων σε σκύλους είναι πιθανό να βοηθήσει στην έγκαιρη προειδοποίηση των κτηνιατρικών και ανθρώπινων υγειονομικών αρχών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγητή του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, κύριο **Εμμανουήλ Παπαδογιαννάκη**, για την εκτίμηση που μου έδειξε, καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω το μέλος του Εργαστηρίου Παρασιτολογίας και Τροπικών Νοσημάτων του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, κυρία Αναστασία Μπίμπα, για τη βοήθεια που μου προσέφερε οποιαδήποτε στιγμή αυτή ήταν απαραίτητη και για την άριστη συνεργασία μας. Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου **Δήμητρα** και τους γιους μας **Αλέξανδρο-Σωτήριο** και **Νεκτάριο-Θωμά** για την αγάπη, τη στήριξη, τη συνεχή ενθάρρυνση, την κατανόηση και τις πολύτιμες συμβουλές τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) θεωρείται ιστορικά μεταξύ των λιγότερο μολυσματικών μελών του ιαπωνικής οροομάδας (οικογένεια *Flaviviridae*, γένος *Flavivirus*). Ο φυσικός κύκλος του ιού περιλαμβάνει τα πουλιά ως τον κύριο ενισχυτικό ξενιστή και πολλά είδη κουνουπιών ως φορείς. Μολύνει κυρίως κουνούπια από το γένος *Culex* που μπορούν ενδεχομένως να μεταδώσουν τον ιό σε κάθε σπονδυλωτό στο οποίο τρέφονται (Orshan et al., 2008; Andreadis, 2012; Engler et al., 2013; Steiner and Kennedy, 2013; Lustig et al., 2016a). Ενώ πολλά είδη πουλιών δεν αναπτύσσουν νόσο, πολλά είδη όπως κοράκια και κίτσες μπορεί να πεθάνουν από λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου (Gamino and Höfle, 2013). Τα θηλαστικά, κυρίως τα άλογα και οι άνθρωποι δεν είναι σε θέση να συμβάλλουν στον κύκλο μετάδοσης και ως εκ τούτου θεωρούνται τελικοί ξενιστές (Colpitts et al., 2012). Ευαίσθητα είδη ζώων έχουν αναγνωριστεί σε αυξανόμενους αριθμούς, συμπεριλαμβανομένων των πουλιών, άνθρωποι, άλογα, τάρανδος, πρόβατα, λευκόουρα ελάφια, και αρκούδες, καθώς και μικρά και μεσαία θηλαστικά (Karaca et al., 2005). Μεταξύ αυτών των ειδών, τα σκυλιά και οι γάτες έχουν επίσης αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητα σε λοίμωξη από WNV (Komar et al., 2001; Buckweitz et al., 2003; Lichtensteiger et al., 2003; Austgen et al., 2004; OZKUL et al., 2006; Lan et al., 2011). Η μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου στον άνθρωπο είναι ως επί το πλείστον ασυμπτωματική, ωστόσο, περίπου στο 20% των περιπτώσεων λοίμωξης WNV προκαλεί μια ήπια νόσο, με συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη, που ονομάζεται πυρετός του Δυτικού Νείλου (WNF), ενώ σε λιγότερο από το 1% των περιπτώσεων, κυρίως σε ηλικιωμένους και σε ανοσοκατεσταλμένους ανθρώπους, η μόλυνση οδηγεί σε μια σοβαρή νευροδισιδυτική νόσο (WNND) που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο (Hayes et al., 2005a). Περίπου το 10% των μολυσμένων αλόγων μπορεί να εμφανίζουν νευρολογικά συμπτώματα (Leblond et al., 2007). Δεν υπάρχει ειδική θεραπεία για ανθρώπους ή ζώα, και δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για τον άνθρωπο, αν και στην Ευρώπη χρησιμοποιούνται αδρανοποιημένα και ανασυνδυασμένα εμβόλια για άλογα (De Filette et al., 2012).

Κατά τα τελευταία 20 χρόνια, ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εξαπλωθεί γεωγραφικά και είναι πλέον κοινός σε χώρες της Αφρικής, της Ευρώπης, της Μέσης Ανατολής, της Βόρειας Αμερικής και της Ανατολικής Ασίας όπου μπορεί να προκαλέσει επιδημίες (Petersen et al., 2013). Ενώ η προέλευση όλων των εξελικτικών κλάδων και των γονότυπων του ιού του Δυτικού Νείλου είναι πιθανότατα η Αφρική (May et al., 2011a), ο ιός διανέμεται πρωτίστως σε άλλες περιοχές μέσω

μεταναστευτικών διαδρομών πουλιών (Mackenzie et al., 2004). Αυτό ισχύει για την εισαγωγή του ιού του Δυτικού Νείλου στην Ευρώπη, από πτηνά που μεταναστεύουν από την Αφρική στην Ευρώπη την άνοιξη (Calistri et al., 2010a).

Οι προηγούμενες μεταφορές του ιού του Δυτικού Νείλου από τον Παλαιό στον Νέο Κόσμο ήταν απροσδόκητες. Αυτές οι πανδημίες υπογραμμίζουν την αυξανόμενη απειλή των αρμποϊών που προκαλούν ζωοανθρωπονόσους, ειδικά εκείνων που είναι σε θέση να εισέλθουν σε ανθρώπινη ενίσχυση, σε κύκλους αστικής μετάδοσης που μεταδίδονται από το *Aedes aegypti* και μερικές φορές από άλλα *Aedes (Stegomyia) spp.* κουνούπια.

Η επανεμφάνιση του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV) στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη τα τελευταία χρόνια έχει εγείρει τις ανησυχίες των τοπικών αρχών και τόνισε ότι το νόσημα που μεταδίδεται από τα κουνούπια δεν περιορίζεται στις τροπικές περιοχές του κόσμου. Η πρόσφατη ιστορία έχει δείξει ότι για περιοχές όπου υπάρχουν κατάλληλα κουνούπια φορείς και ξενιστές δεξαμενές, θα υπάρξει κίνδυνος σημαντικών επιδημιών.

Η λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου αποτελεί σοβαρή επιβάρυνση για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων λόγω της ικανότητας του ιού να προκαλεί απρόβλεπτες και μεγάλες επιδημίες.

Οι ιοί που μεταδίδονται από τα κουνούπια είναι η αιτία μερικών από τις μεγαλύτερες επιβαρύνσεις για την ανθρώπινη υγεία παγκοσμίως, ιδιαίτερα σε τροπικές περιοχές όπου τόσο οι ανθρώπινοι πληθυσμοί όσο και ο αριθμός των κουνουπιών είναι μεγάλοι. Λόγω ενός συνδυασμού ανθρωπογενών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένων των επιπτώσεων στο παγκόσμιο κλίμα και τη μετανάστευση άγριων ζώων, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι εύκρατες περιοχές υφίστανται επαναλαμβανόμενη εισαγωγή ιών που μεταδίδονται από κουνούπια και την επανεμφάνιση ιών που προηγουμένως δεν ανιχνεύθηκαν με επιτήρηση. Στην Ευρώπη, οι επαναλαμβανόμενες εισαγωγές του ιού του Δυτικού Νείλου έχουν συσχετιστεί με τη μετανάστευση πουλιών από την Αφρική. Εκτός από τον αυξανόμενο αριθμό ανθρώπων που κινδυνεύουν, τα ζώα και η άγρια πανίδα, διατρέχουν επίσης κίνδυνο μόλυνσης και νόσησης.

Λαμβάνοντας υπόψη τη δυνατότητα αυτών των επιδημιών να περιλαμβάνουν νευροδεδισδυτική νόσο, πρέπει να εφαρμοστούν στρατηγικές για την επιτήρηση και την αντιμετώπιση του κινδύνου εμφάνισης επιδημιών. Ενώ τα προγράμματα ελέγχου κουνουπιών ευρείας κλίμακας θα βοηθήσουν στη μείωση της αφθονίας των πληθυσμών κουνουπιών και στη συνέχεια θα μειώσουν τους κινδύνους ασθένειας, για πολλά άτομα, η χρήση εντομοαπωθητικών στο

ακάλυπτο δέρμα και επάνω από τα ρούχα και άλλων ατομικών προστατευτικών μέτρων θα παραμείνει η πρώτη γραμμή άμυνας κατά της μόλυνσης.

Η αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων απαιτεί μια σειρά από απαντήσεις τόσο σε εθνικό όσο και σε διεθνές επίπεδο. Η αύξηση της κατανόησης της μετάδοσης ιών από τα κουνούπια και η ανάπτυξη μεθόδων ταχείας ανίχνευσης και κατάλληλων θεραπευτικών (εμβόλια / αντιϊκά) αποτελούν όλα μέρος αυτής της απόκρισης (Johnson et al., 2018).

Οι σκύλοι δεν είναι σε θέση να συμβάλλουν στον κύκλο μετάδοσης και ως εκ τούτου θεωρούνται τελικοί ξενιστές. Λοιμώξεις του ιού του Δυτικού Νείλου σε σκύλους πρέπει να εμφανίζονται συχνότερα (και επομένως, νωρίτερα) από τα συμβάντα της νόσου σε ανθρώπους. Για το λόγο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως «φρουροί» για την πρόληψη μετάδοσης της νόσου στους ανθρώπους. Η ελεγχόμενη χρήση των σκύλων-φρουρών προσφέρεται επίσης για την ποσοτική αξιολόγηση των ποσοστών μόλυνσης, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη σύσταση παρεμβάσεων στη δημόσια υγεία και την υγεία των ζώων.

## A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ (WEST NILE VIRUS, WNV)

Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι φλαβοϊός της οικογένειας *Flaviviridae* που μεταδίδεται από κουνούπια. Το γένος *Flavivirus* αποτελείται από περισσότερους από 70 αναγνωρισμένους ιούς, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων από τους πιο σημαντικούς παθογόνους αρμοιούς των ανθρώπων όπως οι ιοί Zika, δάγκειου πυρετού, και κίτρινου πυρετού (Hayes et al., 2005a; Petersen et al., 2013; Medical Virology - 4th Edition). Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανήκει στο αντιγονικό σύμπλεγμα της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, που μοιράζεται αντισώματα διασταυρούμενης εξουδετέρωσης με άλλους σημαντικούς ιούς που προκαλούν εγκεφαλίτιδα στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένου του ιού ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, του ιού της εγκεφαλίτιδας St Louis και του ιού εγκεφαλίτιδας της κοιλάδας Murray. Επιπλέον, ο ιός του Δυτικού Νείλου μοιράζεται διασταυρούμενα εξουδετερωτικά αντισώματα με ιούς που είναι είτε σπάνιες είτε λιγότερο συχνές αιτίες εμφάνισης νόσων στους ανθρώπους, συμπεριλαμβανομένων των ιών Usutu, Kokobera, Stratford, Alfuy, Koutango, Yaounde και Caciracore (De Madrid and Porterfield, 1974; May et al., 2011a).

Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι μικρός σφαιρικός RNA ιός, διαμέτρου περίπου 50nm. Το μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA του, περιβάλλεται από καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας που εμπεριέχεται σε ένα λιπιδικό διπλόστοιβο φάκελο (Deubel et al., 2001; Mukhopadhyay, 2003; Medical Virology - 4th Edition). Το γονιδίωμα του ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) είναι γραμμικό, και μήκους περίπου 11 kb, με μια ομαδοποίηση περιοχών κωδικοποίησης για δομικές πρωτεΐνες στο άκρο 5' και μη δομικές πρωτεΐνες στο άκρο 3'. Η αντιγραφή πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών, με ολόκληρο το γονιδιωματικό RNA να μεταφράζεται σε μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια διασπάται στις λειτουργικές δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες από κυτταρικές και ιικές πρωτεΐνες (Gray and Webb, 2014). Μετά τη μετάδοση μέσω τσιμπήματος κουνουπιών, ο ιός του Δυτικού Νείλου αναπαράγεται στα κερατινοκύτταρα και στα δενδρικά κύτταρα του δέρματος (DCs), στα κύτταρα Langherans (LCs), στη συνέχεια μεταναστεύει στους τοπικούς λεμφαδένες από όπου ο ιός διασπείρεται στα νεφρά, τον σπλήνα και σε άλλα σπλαχνικά όργανα. Η είσοδος του ιού στο κεντρικό νευρικό σύστημα μπορεί να γίνει είτε μέσω της κυκλοφορίας του αίματος όσο και μέσω των νευρικών οδών (Ulbert, 2011).

Έχει αποδειχθεί, *in vitro* και σε μοντέλα ποντικών *in vivo*, ότι η λοίμωξη με ιό του Δυτικού Νείλου διεγείρει την φυσική ανοσοαπόκριση των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων που μοιάζουν με διόδια (TLR3) και του επαγόμενου από το ρετινοϊκό οξύ γονιδίου I (μονοπάτια RIG-I) και της επαγωγής της ιντερφερόνης τύπου I (IFN-I) καθώς και της IFN λ. Οι υποδοχείς IFN τύπου I που σηματοδοτούν τα αστροκύτταρα ρυθμίζουν τη διαπερατότητα του φραγμού αίματος-εγκεφάλου και προστατεύουν την παρεγκεφαλίδα από νευροδεδωτική λοίμωξη από το ιό του Δυτικού Νείλου. Συνεπώς, η αρνητική ρύθμιση των αποκρίσεων IFN, είτε από ξενιστές όσο και από ιογενείς παράγοντες, μπορεί να συμβάλει στην παθογένεση του ιού του Δυτικού Νείλου. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη NS1 του WNV, που εκκρίνεται κατά τη μόλυνση, καταστέλλει την επαγόμενη από TLR3 IFN σε κύτταρα ποντικού και ανθρώπου, ευνοώντας έτσι την εξάπλωση του ιού στο ΚΝΣ (Luo and Wang, 2018).



## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο ιός του Δυτικού Νείλου απομονώθηκε για πρώτη φορά τον Δεκέμβριο του 1937, από μια 37χρονη, εμπύρετη γυναίκα στην περιοχή του Δυτικού Νείλου στη Βόρεια επαρχία της Ουγκάντα, κατά τη διάρκεια μιας επιδημιολογικής μελέτης που καθόριζε την ενδημική ζώνη του κίτρινου πυρετού (Smithburn et al., 1940).

Ήταν το 1958 όταν εντοπίστηκε ο WNV στην Ευρώπη από έναν ασθενή στην Αλβανία και έκτοτε έχει ανιχνευθεί επανειλημμένα στην ήπειρο με αναφορές από πολλές χώρες για μολύνσεις σε ανθρώπους και άλογα (Chancey et al., 2015). Ο ιός δεν απομονώθηκε ξανά μέχρι τη δεκαετία του 1950, όταν περιγράφηκαν οι πρώτες επιδημίες WNV στο Ισραήλ και την Αίγυπτο (Bernkopf et al., 1953; Kardjadj et al., 2019). Μια μεγάλης κλίμακας επιδημιολογική μελέτη στη δεκαετία του 1950 εντόπισε ποσοστά οροεπιπολασμού έως και 61% στο Δέλτα του Νείλου της Αιγύπτου (Hurlbut et al., 1956). Αυτή η έκθεση ήταν η πρώτη που περιέγραψε το εποχιακό μοτίβο της μετάδοσης WNV, με την αιχμή του καλοκαιριού, και πρότεινε τον φυσικό ενζωτικό κύκλο μετάδοσης WNV μεταξύ κουνουπιών ιδιαίτερα του *Culex spp.* (Taylor et al., 1953) και πτηνών. Η πιθανότητα σημαντικής νόσου στα υποειδή αναγνωρίστηκε επίσης σε πρώιμες επιδημιολογικές μελέτες (Hurlbut et al., 1956; Joubert et al., 1970). Πριν από τη δεκαετία του 1990, η απειλή του WNV για τη δημόσια υγεία δεν εκτιμήθηκε ευρέως. Αυτό συνέβη παρά την αναγνώριση του αυξανόμενου γεωγραφικού εύρους καθώς και των συνεχιζόμενων και αναδυόμενων σποραδικών περιστατικών σε ανθρώπους που αναφέρθηκαν στην Αίγυπτο, το Ισραήλ, τη Γαλλία, τη Νότια Αφρική, τη Ρωσία, την Ισπανία, την Ινδία, καθώς και στην Αυστραλία, όπου ο ιός *Kunjin* επανατοποθετήθηκε στη συνέχεια στην ομάδα του WNV (Gray and Webb, 2014). Φαίνεται ότι υπήρξε μια αλλαγή στην επιδημιολογία του WNV στη δεκαετία του 1990, με συχνότερες περιγραφές επιδημιών σε αστικές περιοχές της Ευρώπης και της Μέσης Ανατολής που συσχετίστηκαν με μια αξιοσημείωτη αύξηση της ανθρώπινης νευροδισιδυτικής νόσου (Tsai et al., 1998; Sejvar, 2003). Η πλειονότητα της νευροδισιδυτικής νόσου σε ανοσολογικά άνοσους πληθυσμούς συσχετίστηκε με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, ιδιαίτερα στους ηλικιωμένους. Πολλές εστίες που προκάλεσαν σοβαρή εγκεφαλίτιδα στον άνθρωπο παρατηρήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1990 και στις αρχές της δεκαετίας του 2000: Αλγερία 1994 (50 περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων 8 θανάτων), Μαρόκο 1996 (μία θανατηφόρα περίπτωση), Ρουμανία 1996 (393 περιπτώσεις, 17 θάνατοι), Τυνησία 1997 (111 περιπτώσεις, 8 θάνατοι), Ρωσία 1999–2001 (361 περιπτώσεις, 40

θάνατοι), Ισραήλ 2000 (326 περιπτώσεις, 33 θάνατοι) και Γαλλία 2003 (7 περιπτώσεις, 0 θάνατοι) (Tsai et al., 1998; Bin et al., 2001a; Murgue et al., 2001a; Del Giudice et al., 2004; Schuffenecker et al., 2005; Platonov et al.). Στο Βουκουρέστι (Ρουμανία) και στο Βολγκογκράντ (Ρωσία) σημειώθηκαν επιδημίες σε αστικές περιοχές όταν κελάρια πλημμύρισαν με νερό μολυσμένο με λύματα (Tsai et al., 1998). Επιδημίες σε αυτή την κλίμακα επίσης εμφανιστήκαν στο Ισραήλ (Weinberger et al., 2001).

Το 1999, ο WNV ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στην Αμερική (Nash et al., 2001), και ενώ υπάρχουν ισχυρά φυλογενετικά στοιχεία ότι το αναδυόμενο στέλεχος της Νέας Υόρκης (NY99) προέκυψε από ένα στέλεχος που κυκλοφόρησε στο Ισραήλ από το 1998, παραμένει ασαφές πώς εισήχθη ο ιός (Lanciotti et al., 1999). Στη συνέχεια, ο WNV διαδόθηκε και στις 48 συνεχόμενες πολιτείες των ΗΠΑ καθώς και στη Νότια Αμερική, την Καραϊβική και σε όλες τις επαρχίες του Καναδά. Το 2012, παρατηρήθηκε επανεμφάνιση με περιστατικά σε ανθρώπους στη Βόρεια Αμερική σε επίπεδα που δεν παρατηρήθηκαν σε μια δεκαετία, με 5.674 ασθενείς που αναφέρθηκαν με κλινική νόσο στις ΗΠΑ και 428 κλινικές περιπτώσεις στον Καναδά. Τα επίπεδα δραστηριότητας του ιού του Δυτικού Νείλου στη Βόρεια Αμερική παρέμειναν υψηλότερα από τους ιστορικούς μέσους όρους το 2013, με 2.318 περιπτώσεις ασθενών που αναφέρθηκαν στις ΗΠΑ και 108 περιπτώσεις στον Καναδά στο τέλος της περιόδου μετάδοσης (Gray and Webb, 2014). Στην Ευρώπη, υπάρχουν αναγνωρισμένα κρούσματα WNV, που χαρακτηρίζονται από ανθρώπινη νευροδισδυτική νόσο, που χρονολογούνται από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 (Pradier et al., 2012a). Ωστόσο, από το 2008, υπήρξε μια άνευ προηγουμένου αυξημένη δραστηριότητα WNV, συμπεριλαμβανομένης της διαρκούς εμφάνισης του εξελικτικού κλάδου 2 του ιού του Δυτικού Νείλου, με ταχεία αύξηση του αριθμού των περιπτώσεων νευροδισδυτικής νόσου σε ανθρώπους και ζώα (Danis et al., 2011a; Annual Epidemiological Report 2013 [2011 data], 2013). Αναφέρθηκαν επιδημίες σε αρκετές χώρες της Ευρώπης με περιπτώσεις νευροδισδυτικής νόσου που πιθανώς σχετίζονται με περιπτώσεις σε άλογα. Στην Ιταλία μεταξύ 2008 και Οκτωβρίου 2011, παρατηρήθηκαν 39 νευροδισδυτικές περιπτώσεις σε ανθρώπους που σχετίζονται με δύο θανάτους, μαζί με 191 περιστατικά σε ίππους και 19 θανάτους (Rizzo et al., 2009; Barzon et al., 2011). Τα στελέχη του ιού του Δυτικού Νείλου που απομονώθηκαν το 2008 και το 2009 από δείγματα ιπποειδών και πουλιών (ένα περιστέρι, τρεις κίτσες) ήταν γενετικά πολύ κοντά στο στέλεχος της Τοσκάνης του 1998, καθώς και σε στελέχη του ιού που απομονώθηκαν στη Ρουμανία, τη Ρωσία, τη

Σενεγάλη και την Κένυα (Savini et al., 2008; Monaco et al., 2009). Στην Ισπανία (Ανδαλουσία) το 2010 και το 2011, αναφέρθηκαν για πρώτη φορά δύο περιπτώσεις μη θανατηφόρων ανθρώπινων περιπτώσεων και 42 περιστατικά ιπποειδών με δέκα θανάτους. Την ίδια περίοδο, σημειώθηκαν μεγάλες επιδημίες στην Ελλάδα (322 περιπτώσεις νευροδισιδυτικής νόσου σε ανθρώπους, συμπεριλαμβανομένων 39 θανάτων) και στη Ρωσία (596 περιπτώσεις νευροδισιδυτικής νόσου σε ανθρώπους, συμπεριλαμβανομένων 6 θανάτων). Άλλες χώρες όπως η Αλβανία, η Βουλγαρία, η Πορτογαλία, η Ρουμανία και η Τουρκία επηρεάστηκαν επίσης από την νόσο (Pradier et al., 2012a). Στην Ιταλία, υπήρχαν περιορισμένες αναφορές θνησιμότητας των πτηνών (Calistri et al., 2010b), σε αντίθεση με την κατάσταση στις Ηνωμένες Πολιτείες (ΗΠΑ) από το 1999, το Ισραήλ το 1998 και την Ουγγαρία το 2004-2005 (Bin et al., 2001b; McLean et al., 2002; Diamond et al., 2003a). Μερικές από αυτές τις επιδημίες στην Ευρώπη συσχετίστηκαν με την εμφάνιση του εξελικτικού κλάδου 2 του ιού του Δυτικού Νείλου που δεν απομονώθηκε ποτέ στην Ευρώπη πριν από το 2004 (Bagnarelli et al., 2011; Chaskoroulou et al., 2011; Kutasi et al., 2011; Platonov et al., 2011). Το 2012, σημειώθηκε αιχμή 937 περιπτώσεων WNV στην Ευρώπη και τις γύρω χώρες, με συνεχιζόμενη δραστηριότητα το 2013, με προκαταρκτικά στοιχεία να αναφέρουν 783 περιπτώσεις WNV σε ανθρώπους, συμπεριλαμβανομένων 86 στην Ελλάδα και 302 στη Σερβία (Gray and Webb, 2014).

Η διασπορά του ιού σε μεγάλες αποστάσεις εξαρτάται από τα πουλιά, ενώ η διασπορά του ιού σε μικρή απόσταση προκαλείται από τα κουνούπια (Liu et al., 2006; Na and Hm, 2009). Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην εξάπλωση του WNV και την ικανότητά του να προκαλεί λοίμωξη στον άνθρωπο, είναι τα μεταναστευτικά είδη πτηνών, μικρών και μεγάλων αποστάσεων (Rappole and Hubálek, 2003), τα μοτίβα ανέμου (Mackenzie et al., 2004) και η ύπαρξη συμβατών κουνουπιών φορέων. Μελέτες στο Ισραήλ, ένα σημαντικό σταυροδρόμι για τη μετανάστευση πουλιών μεταξύ Αφρικής και Ευρασίας, έχουν δείξει ότι τέσσερα διαφορετικοί γονότυποι εντός δύο εξελικτικών κλάδων του WNV κυκλοφορούν τα τελευταία χρόνια (Lustig et al., 2016a).

Η επιδημιολογία του ιού του Δυτικού Νείλου είναι πολύπλοκη, αποτελούμενη από έναν κύκλο μόλυνσης μεταξύ ειδών κουνουπιών φορέων του νοσήματος και άγριων πουλιών που δρουν σαν δεξαμενές, αλλά με διαρροή σε ανθρώπους και άλογα, που μπορεί να οδηγήσει σε νόσο. Αυτό επιτυγχάνεται με φορείς γέφυρα, δηλαδή πληθυσμοί κουνουπιών που τσιμπάνε και είδη

πτηνών και θηλαστικών. Παραδείγματα αυτού περιλαμβάνουν πληθυσμούς *Culex pipiens* (Vogels et al., 2016) ειδικά εκείνους της νότιας Ευρώπης, και *Culex modestus* (Balenghien et al., 2008). Η παρουσία του *Ae. albopictus* στη νότια Ευρώπη παρέχει εύφορο έδαφος για την εισαγωγή ιών που μεταδίδονται από κουνούπια *Aedes* από ιαμικούς ανθρώπους που ταξιδεύουν από ενδημικές περιοχές (Johnson et al., 2018). Οικολογικές μελέτες στη νότια (Roiz et al., 2015) και βόρεια (Medlock and Vaux, 2015) Ευρώπη το εξηγεί και με τις δύο να δείχνουν μέγιστη αφθονία συγκεκριμένων ειδών κατά τους θερινούς μήνες. Κατά τη διάρκεια αυτών των κορυφώσεων λαμβάνει χώρα αυτόχθονη μετάδοση του ιού και αναφέρονται κρούσματα της νόσου που μεταδίδεται από κουνούπια. Εκτός από τα ντόπια κουνούπια, η Ευρώπη έχει αποικιστεί από μια σειρά εισβολέων κουνουπιών του γένους *Aedes* (Πίνακας 1) που έχουν μελετηθεί εκτενώς (Medlock et al., 2012; Schaffner et al., 2013). Η αρχική εισαγωγή του καθενός και η επακόλουθη εξάπλωση προέκυψαν από την ανθρώπινη μεταφορά αποξηραμένων αυγών, για παράδειγμα σε μεταχειρισμένα ελαστικά ή μετακίνηση ενηλίκων κουνουπιών με αυτοκίνητα (Eritja et al., 2017).

**Πίνακας 1. Χωροκατακτητικά είδη κουνουπιών που εντοπίστηκαν στην Ευρώπη**

<b>Λατινικό όνομα</b>	<b>Κοινή ονομασία</b>	<b>Προέλευση</b>
<i>Aedes albopictus</i>	Ασιατικό κουνούπι τίγρης	Νοτιοανατολική Ασία
<i>Aedes aegypti</i>	Κουνούπι κίτρινου πυρετού	Τροπικές και υποτροπικές περιοχές
<i>Aedes japonicus</i>	Ασιατικό κουνούπι θάμνων	Ανατολική Ασία
<i>Aedes atropalpus</i>	Αμερικανικό κουνούπι βραχωδών λιμνών	Βόρεια Αμερική
<i>Aedes koreicus</i>	Καμία	Κορέα, Ιαπωνία, βορειοανατολική Κίνα

Πηγή: (Johnson et al., 2018)

Η παρουσία άφθονων πληθυσμών του *Ae. Albopictus* αυξάνει τον κίνδυνο αυτόχθονης μετάδοσης νόσων εντός του ανθρώπινου πληθυσμού όπου και αν βρίσκεται, καθώς είναι ανθρωπόφιλο και επιθετικό, προκαλεί μεγάλη ενόχληση, και είναι φορέας πολλών ιών. Αυτό

το πρόβλημα επηρεάζει έναν αυξανόμενο αριθμό χωρών σε ολόκληρη την Ευρώπη (Johnson et al., 2018).

### **Μοριακή επιδημιολογία**

Μέχρι το 2004, στην Ευρώπη είχαν βρεθεί μόνο στελέχη Lineage 1 και Lineage 3 του WNV. Το στέλεχος Lineage 2 απομονώθηκε αρχικά το 2004 στην Ουγγαρία και το 2008 στην Αυστρία, και για πρώτη φορά προκάλεσε μεγάλη επιδημία λοίμωξης από WNV το 2010 στην Ελλάδα, με 262 κλινικά περιστατικά σε ανθρώπους και 35 θανάτους (Chaskoroulou et al., 2013). Από τότε, έχουν αναφερθεί κρούσματα που αφορούν τη γενεαλογία 2 του WNV σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ιταλίας, της Σερβίας και της Ελλάδας. Στη φύση, ο ιός κυκλοφορεί σε έναν άγριο / αγροτικό κύκλο, μεταξύ των πουλιών και των ορνιθόφιλων κουνουπιών, ιδίως των μελών του γένους *Culex*, και κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες μεταφέρεται σε ανθρώπινους οικισμούς όπου μολύνει ανθρώπους και ιπποειδή προκαλώντας μεγάλες επιδημίες. Η βροχόπτωση, η θερμοκρασία και η χρήση / διαχείριση του τοπίου είναι από τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές παραμέτρους που επηρεάζουν τους κύκλους ζωής του κουνουπιού, του ιού, των ενισχυτικών και τυχαίων ξενιστών και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (Day and Shaman, 2011). Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών, τα κρούσματα λοίμωξης από WNV είναι εξαιρετικά σποραδικά και εστιακά στη φύση, παρουσιάζοντας υψηλή μεταβλητότητα στην ανάπτυξή τους και στη συχνότητα εμφάνισης σε διαφορετικές περιοχές. Απαιτούνται μελέτες σε τοπικά επίπεδα που συγκρίνουν διαφορετικούς οικοτόπους και κοινότητες κουνουπιών / σπονδυλωτών για να προσδιορίσουν πώς οι περιβαλλοντικές παράμετροι επηρεάζουν τη δυναμική του πληθυσμού του φορέα και τη μετάδοση ασθενειών και πώς οι παρεμβάσεις ελέγχου κουνουπιών μπορούν να αλλάξουν αυτές τις δυναμικές (Chaskoroulou et al., 2016).

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ευθυγραμμίζεται σε τουλάχιστον επτά εξελικτικούς κλάδους με βάση την ομολογία νουκλεϊκών οξέων, με τους κύριους εξελικτικούς κλάδους να έχουν αποκλίνουσες διαφορές νουκλεοτιδίων 25% –30% (Lanciotti et al., 1999; May et al., 2011a; Papa et al., 2011a). Μόνο οι εξελικτικοί κλάδοι 1 και 2 έχουν εμπλακεί στην εμφάνιση νόσου στον άνθρωπο. Η φυλογενετική ταξινόμηση δεν συσχετίζεται σταθερά με τη γεωγραφική κατανομή του ιού του Δυτικού Νείλου, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην ευρεία διάδοση του ιού από είδη μεταναστευτικών πουλιών (Gray and Webb, 2014).

## **Εξελικτικός κλάδος 1**

Ο εξελικτικός κλάδος 1 του ιού του Δυτικού Νείλου έχει μια ευρεία γεωγραφική κατανομή, συμπεριλαμβανομένης της Αφρικής, της Ευρώπης, της Αυστραλίας, της Ασίας, της Βόρειας και Κεντρικής Αμερικής, καθώς και της Μέσης Ανατολής (Lanciotti et al., 1999). Ο εξελικτικός κλάδος 1 μπορεί περαιτέρω να χωριστεί σε τρεις υποκλάδους (1a, 1b, 1c). Ο υποκλάδος 1a είναι ο πιο διαδεδομένος, ανιχνεύτηκε στην Αφρική, την Ευρώπη, την Αμερική (συμπεριλαμβανομένου του στελέχους NY99) και τη Μέση Ανατολή. Το 2011, απομονώθηκε ο υποκλάδος 1a του ιού του Δυτικού Νείλου από τον ορό ενός εμπύρετου ασθενούς για πρώτη φορά στην Ινδία, κατά τη διάρκεια μιας επιδημίας νευροδιεισδυτικής νόσου (Balakrishnan et al., 2013). Ο υποκλάδος 1a περιλάμβανε στελέχη που ανιχνεύτηκαν σε εστίες εγκεφαλίτιδας σε ανθρώπους, συμπεριλαμβανομένης της επιδημίας στη Βόρεια Αμερική (Lanciotti et al., 1999). Ο υποκλάδος 1b, που αναφέρεται επίσης ως ιός Kunjin, είναι μια ασυνήθιστη αιτία ενδημικής νόσου του ανθρώπου στην Αυστραλία και πιθανώς βρίσκεται επίσης στη Νοτιοανατολική Ασία και την Παπούα Νέα Γουινέα (Hall et al., 2002; Gray et al., 2011a). Ενώ αναφέρθηκαν λίγα περιστατικά σε ανθρώπους, μια σημαντική επιδημία στα άλογα αναφέρθηκε στη νοτιοανατολική Αυστραλία το 2011 (Frost et al., 2012). Ο υποκλάδος 1c βρίσκεται μόνο στην Ινδία. Έχει προταθεί ότι οι απομονώσεις που είχαν ταξινομηθεί προηγουμένως ως υποκλάδος 1c να ταξινομηθεί εκ νέου σαν εξελικτικός κλάδος 5 (Bondre et al., 2007).

## **Εξελικτικός κλάδος 2**

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 2000, ο εξελικτικός κλάδος 2 του ιού του Δυτικού Νείλου περιοριζόταν κυρίως στην Αφρική, όπου υπήρξε αιτία ήπιας εμπύρετης νόσου στους ανθρώπους, σπάνια εξελίχθηκε σε σοβαρή νόσο και συνήθως δεν σχετιζόταν με επιδημίες (Lanciotti et al., 1999). Ωστόσο, το 2004 και το 2005, ο εξελικτικός κλάδος 2 του ιού του Δυτικού Νείλου εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε άγρια πτηνά στην Ουγγαρία, με επακόλουθη ταχεία εξάπλωση σε μεγάλο μέρος της κεντρικής Ευρώπης (Bakonyi et al., 2005, 2006). Αυτοί οι ιοί του εξελικτικού κλάδου 2 έχουν εμπλακεί σε περιστατικά νευροδιεισδυτικής νόσου των πτηνών, των ιπποειδών και των ανθρώπων με σχετικούς θανάτους, συμπεριλαμβανομένων περιπτώσεων που αναφέρθηκαν στη Ρωσία, την Ουγγαρία, την Ιταλία και την Ελλάδα (May et al., 2011b; Para et al., 2011a; Magurano et al., 2012; Barzon et al., 2013d). Μια μεγάλη και συνεχιζόμενη επιδημία νευροδιεισδυτικής νόσου στην Ελλάδα έχει αποδοθεί στον εξελικτικό

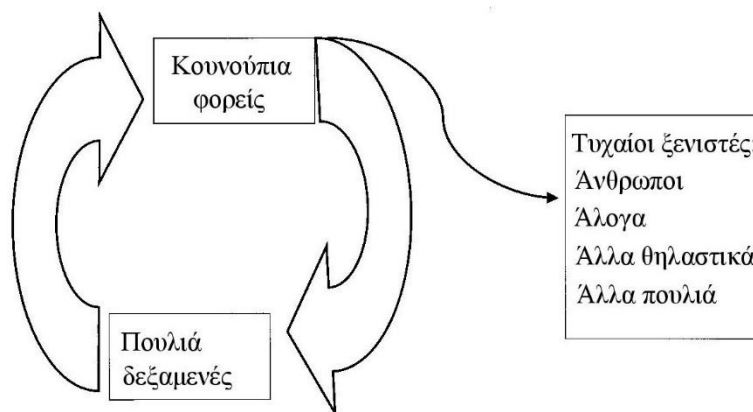
κλάδο 2 του ιού του Δυτικού Νείλου, η οποία σε ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδιώματος βρέθηκε να είναι πολύ παρόμοια με το στέλεχος του 2004 που απομονώθηκε στην Ουγγαρία (Barzon et al., 2013b; Sing, 2014). Οι εξελικτικοί κλάδοι 1 και 2 του ιού του Δυτικού Νείλου θεωρούνται πλέον ενδημικές στη νοτιοανατολική Ευρώπη, με αύξηση πάνω από 700% των περιπτώσεων που αναφέρθηκαν στην περιοχή από το 2009 (Annual Epidemiological Report 2013 [2011 data], 2013).

### **Πρόσθετοι προτεινόμενοι εξελικτικοί κλάδοι**

Ο ιός του Δυτικού Νείλου που ανήκει στον εξελικτικό κλάδο 3 απομονώθηκε για πρώτη φορά κοντά στα σύνορα της Αυστρίας και της Τσεχικής Δημοκρατίας το 1997. Ο εξελικτικός κλάδος 3 του ιού του Δυτικού Νείλου αναφέρεται επίσης ως ιός Rabensburg, και πήρε το όνομά του από την κοντινή αυστριακή πόλη όπου απομονώθηκαν τα πρώτα μολυσμένα κουνούπια *Culex ripiens* (Hubálek et al., 1998; Bakonyi et al., 2005). Με βάση τη γονιδιωματική και αντιγονική ποικιλομορφία, έχει προταθεί στον ιό Rabensburg να αποδοθεί ένα νέο είδος στην ομάδα ιών της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας. Ο εξελικτικός κλάδος 3 δεν έχει απομονωθεί από τον άνθρωπο και το παθογόνο δυναμικό παραμένει αβέβαιο, ιδιαίτερα καθώς ο ιός Rabensburg έχει αποδειχθεί ότι δεν μολύνει καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών ή πτηνών, ούτε μολύνει πειραματικά εκτεθειμένα πτηνά (Aliota et al., 2012). Πρόσθετες υποδιαιρέσεις εξελικτικών κλάδων έχουν προταθεί για νέες απομονώσεις φλαβοϊών, συμπεριλαμβανομένου του εξελικτικού κλάδου 4 του ιού του Δυτικού Νείλου, που απομονώθηκε για πρώτη φορά από ένα κρότωνο *Dermacentor marginatus* στα βουνά του Καυκάσου στη Ρωσία (Lvov et al., 2004). Ο εξελικτικός κλάδος 5 του ιού του Δυτικού Νείλου έχει προταθεί για μια ομάδα απομονώσεων σε ανθρώπους και κουνούπια στην Ινδία ήδη από τη δεκαετία του 1950 που είχαν ομαδοποιηθεί στον κλάδο 1c. Ο εξελικτικός κλάδος 6 του ιού του Δυτικού Νείλου έχει προταθεί για ιούς που έχουν απομονωθεί από τα κουνούπια *C. ripiens* στη νότια Ισπανία το 2006 και σχετίζεται στενότερα με τον εξελικτικό κλάδο 4. Ο ιός Koutango, ο οποίος απομονώθηκε για πρώτη φορά στη Σενεγάλη, αναγνωρίζεται επί του παρόντος ως ξεχωριστό είδος, αλλά μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν επιπλέον εξελικτικό κλάδο 7 του ιού του Δυτικού Νείλου. Η ανθρώπινη παθογένεια των εξελικτικών κλάδων 4, 6 και 7 του ιού του Δυτικού Νείλου είναι ελάχιστα κατανοητή, και δεν αναφέρεται μόλυνση σε άνθρωπο (Gray and Webb, 2014).

## ΚΥΚΛΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ

Ο ιός του Δυτικού Νείλου διατηρείται σε ενζωτικούς κύκλους που περιλαμβάνουν διάφορα είδη πτηνών, τα οποία ενεργούν ως ενισχυτικοί ξενιστές - δεξαμενές (the principal reservoir hosts, Σχήμα 1) και κουνούπια που ανήκουν κυρίως στο σύμπλεγμα *Culex ripiens*, αν και άλλα είδη κουνουπιών εμπλέκονται επίσης την εξάπλωση του ιού (Marcantonio et al., 2015). Έχει αποδειχθεί ότι μολύνει ένα ευρύ φάσμα θηλαστικών (σκύλοι, άλογα, πρόβατα, κατσίκες, βοοειδή, γάτες, νυχτερίδες) και ερπετών (Currenti et al., 2020). Ενώ πάνω από 60 είδη κουνουπιών έχουν εμπλακεί στη μετάδοση του WNV, τα βασικά είδη φορέα είναι αυτά που ανήκουν στο γένος *Culex* (Colpitts et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, τα κουνούπια που ανήκουν στο σύμπλεγμα *C. ripiens* (δηλ. *C. ripiens ripiens*, *C. ripiens molestus* και *Culex quinquefasciatus*), τα οποία έχουν εξαπλωθεί στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη οδηγούν τη μετάδοση του WNV, με μεταβλητές συμπεριφορές και φυσιολογίες που εμφανίζονται από τα μεμονωμένα είδη, επηρεάζοντας τον τοπικό κίνδυνο μετάδοσης (Farajollahi et al., 2011). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία μεταξύ 2008 και 2014 ανίχνευσε τον ιό σε τρία είδη κουνουπιών που ανήκουν σε δύο γένη: *Culex ripiens s.l.*, *Culex modestus* και *Ochlerotatus caspius* (Mancini et al., 2017).



**Σχήμα 1. Ο βασικός κύκλος μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου.** Ορισμένα πουλιά, κυρίως μέλη της τάξης *Passeriformes*, χρησιμεύουν ως κύριοι ενισχυτικοί ξενιστές δεξαμενές για τη μόλυνση κουνουπιών φορέων, κυρίως ορνιθοφιλικών ειδών *Culex*. Οι σημαντικοί ξενιστές δεξαμενές και φορείς ενδέχεται να ποικίλλουν ανά περιοχή. Άνθρωποι, άλογα, άλλα θηλαστικά και άλλα πουλιά είναι τυχαίοι ξενιστές που συνήθως δεν συμμετέχουν στον κύκλο μετάδοσης.

Πηγή: (Komar, 2001a)



Αυτά τα κουνούπια είναι κατά κύριο λόγο ορνιθόφιλα είδη (προτιμούν να τρέφονται από πουλιά) και θεωρούνται αποτελεσματικοί ενζωτικοί φορείς (δηλαδή, μετάδοση από πουλί σε κουνούπι σε πουλί). Ωστόσο, δεδομένου ότι τα κουνούπια είναι συχνά άφθονα και συνδέονται στενά με αστικά περιβάλλοντα και με τα ανώριμα στάδια πολλών ειδών που βρίσκονται σε υδρόβιους οικοτόπους εντός ανθρωπογενών δομών, η εγγύτητά τους με τον άνθρωπο οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο να δράσουν ως επιζωτικοί φορείς (δηλαδή, μετάδοση από πουλί σε κουνούπι σε άνθρωπο). Η μετάβαση σε βελτιωμένες στρατηγικές εξοικονόμησης νερού σε αστικές περιοχές (δηλ. η κατασκευή υγροτόπων διατήρησης της άγριας πανίδας) μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο WNV, με αλλαγές στους πληθυσμούς ξενιστών φορέων και δεξαμενών (Vo et al., 2007; Allan et al., 2009). Ενώ τα κουνούπια *Culex spp.* είναι οι πρωταρχικοί φορείς, σε ορισμένες περιοχές, μια σειρά ειδών κουνουπιών που ανήκουν σε άλλα γένη μπορεί να παίζουν δευτερεύοντες ρόλους στους κύκλους μετάδοσης. Κάποια άλλα είδη, μπορεί να τσιμπάνε τα πουλιά, αλλά γενικά προτιμούν ξενιστές θηλαστικά. Αυτή η αλλαγή προτίμησης ξενιστή για διατροφή καθιστά δύσκολη την πρόβλεψη των επιδημιών. Κατά την εκτίμηση των τοπικών παραγόντων κινδύνου, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη μια σειρά βιολογικών και οικολογικών παραγόντων κινδύνου (Gray and Webb, 2014). Στη Βόρεια Αμερική, οι εργαστηριακές μελέτες δείχνουν με συνέπεια ότι τα κουνούπια *Culex spp.* είναι αποτελεσματικοί ενζωτικοί ή ενισχυτικοί φορείς (Turell et al., 2001, 2005). Ομοίως, στην Ευρώπη, τα κουνούπια *Culex spp.* έχουν αναγνωριστεί ως οι πρωταρχικοί φορείς του WNV (Hubálek and Halouzka, 1999). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ενώ μέλη του συμπλέγματος *C. pipiens* εμφανίζονται τόσο στη Βόρεια Αμερική όσο και στην Ευρώπη, υπάρχουν διαφορές σε άλλα *Culex spp.*. Διαφορές, μεταξύ και εντός των δύο περιοχών, που πρέπει να ληφθούν υπόψη, κατά την αξιολόγηση των τοπικών κινδύνων. Για παράδειγμα, στη Βόρεια Αμερική, το *Culex tarsalis* θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους φορείς του WNV, ενώ σε ορισμένες περιοχές της Ευρώπης, το *Culex modestus* έχει εμπλακεί ως τοπικά σημαντικός φορέας (Balenghien et al., 2006; Colpitts et al., 2012). Ωστόσο, μια σειρά ενδημικών κουνουπιών στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη μπορεί να διαδραματίσει έναν τοπικά σημαντικό ρόλο στην ενζωτική και / ή επιδημική μετάδοση του WNV. Αυτές οι διακυμάνσεις του κινδύνου μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στη διαθεσιμότητα κατάλληλων οικοτόπων κουνουπιών, στη σχετική αφθονία των κουνουπιών *Culex spp.* και στη προτίμηση ξενιστή για διατροφή τους, με ορισμένα είδη να είναι πιο πιθανό να δρουν ως ενζωτικοί παρά

ως επιζωοτικοί φορείς (Muñoz et al., 2012). Διάφορα μεταναστευτικά και γηγενή είδη πτηνών δρουν για τη διάδοση και την ενίσχυση του WNV, με τον βαθμό και τη διάρκεια της ιαιμίας να ποικίλλει ανά είδος (Kilpatrick et al., 2009). Το υψηλό επίπεδο της ιαιμίας του WNV σε ευαίσθητα πτηνά ξενιστές είναι αρκετό για να μολύνει τα κουνούπια και σε πειραματικές συνθήκες, έχει αποδειχθεί ότι είναι επαρκές για τη μετάδοση από πτηνό σε πτηνό (Komar et al., 2003). Ο θάνατος των πτηνών ξενιστών μπορεί να είναι ένα πρώιμο σημάδι επιδημιών WNV, όπως αποδείχθηκε στην επιδημία στη Βόρεια Αμερική το 1999 (Anderson et al., 1999). Αντίθετα, όπως φαίνεται με την πιο πρόσφατη εισαγωγή του εξελικτικού κλάδου 2 του ιού στη νοτιοανατολική Ευρώπη και τη διάδοση του εξελικτικού κλάδου 1 του ιού στη Νότια Αμερική, οι αναφορές για άρρωστα ή νεκρά πτηνά μπορεί να είναι λιγιστές (Gray and Webb, 2014).

## **1. Μετάδοση με κουνούπια (Δίπτερα: *Culicidae*)**

### **1.1. Ενζωοτικός κύκλος**

Στην Ευρώπη και την Αφρική, οι κύριοι ενζωοτικοί φορείς είναι τα *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. univittatus* και *Cx. Antennatus* (Hubálek and Halouzka, 1999). Τα μολυσματικά κουνούπια μεταφέρουν τον WNV στους σιελογόνους αδένες τους και έτσι μπορούν να μολύνουν ευαίσθητα σπονδυλωτά ξενιστές κατά τη διάρκεια της σίτισης. Ο ιός μπορεί να ανιχνευθεί σε όλους σχεδόν τους ιστούς του κουνουπιού, ιδίως στον εγκέφαλο και το κοιλιακό νεύρο με τα συναφή γάγγλια. Η μόλυνση των φορέων συμβαίνει κυρίως όταν τρέφονται με ιαιμικούς ξενιστές, ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η διωθητική μετάδοση εμφανίζεται σε ένα μικρό ποσοστό μολυσμένων *Cx. pipiens* (Dohm et al., 2002b). Ακόμη και σε αυτούς τους χαμηλούς ρυθμούς μετάδοσης, η διωθητική μετάδοση μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην οικολογία του ιού. Μετά τη μόλυνση, ακολουθεί μια εξωγενής περίοδος επώασης που εξαρτάται από τη θερμοκρασία, κατά την οποία ο ιός αντιγράφεται και εισέρχεται στους σιελογόνους αδένες. Συνήθως, αυτή η περίοδος διαρκεί δύο εβδομάδες κατά τη διάρκεια θερμών περιόδων, αλλά είναι ευαίσθητη τόσο στη θερμοκρασία όσο και στην υγρασία (Cornel et al., 1993). Μετά από αυτήν την περίοδο, τα κουνούπια μπορούν να μεταδώσουν τον ιό σε ευαίσθητους ξενιστές. Η διατήρηση μιας επιδημίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μακροζωία των κουνουπιών και την ταχύτητα ανάπτυξης του ιού (και τα δύο επηρεάζονται από τη θερμοκρασία) (Pradier et al., 2012a).

## 1.2. Φορείς-γέφυρα

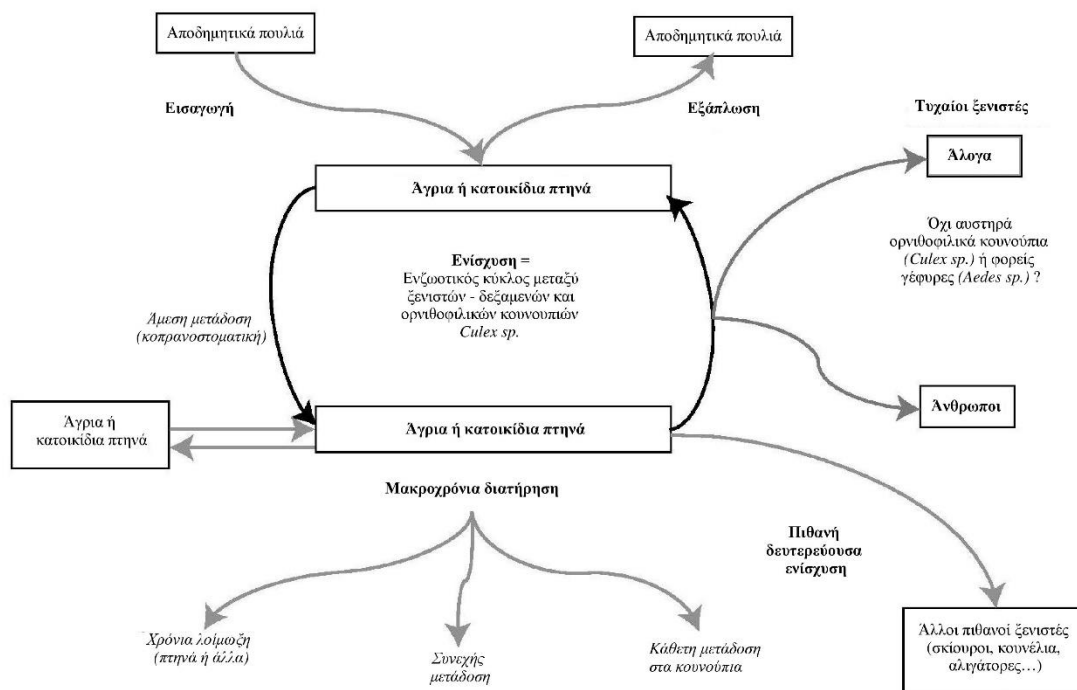
Οι φορείς γέφυρα που είναι διαφορετικοί από τα είδη ενζωοτικών φορέων δεν εμπλέκονται στη διατήρηση του WNV, λόγω των προτιμήσεων διατροφής τους (κυρίως θηλαστικών), αλλά μπορούν να εμπλακούν στην επιζωοτική μετάδοση του WNV από πουλιά σε ανθρώπους και / ή άλογα. Για να προσδιοριστεί η πιθανότητα ενός είδους κουνουπιού να είναι ένας αποτελεσματικός φορέας, είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη όχι μόνο η ικανότητα του φορέα για τον WNV σε εργαστηριακές συνθήκες αλλά και η αφθονία, η προτίμηση ξενιστή για διατροφή, η μόλυνση με άλλους ιούς με παρόμοιους κύκλους μετάδοσης και εάν ο WNV έχει απομονωθεί από αυτό το είδος υπό φυσικές συνθήκες (Turell et al., 2005; Kilpatrick et al., 2006). Η πυκνότητα του πληθυσμού, οι μελέτες ξενιστή διατροφής και οι γενετικές αναλύσεις έχουν ενοχοποιήσει το *Cx. pipiens* ως τον πιο σημαντικό φορέα γέφυρα στην Ανατολική Ευρώπη και τη Ρωσία (Fyodorova et al., 2006). Μη αυτογενείς πληθυσμοί *Cx. Pipiens (pipiens)*, που τρέφονται κυρίως με πουλιά, θα μπορούσαν να υβριδοποιηθούν με αυτογενείς πληθυσμούς *Cx. Pipiens (molestus)* στα τέλη του καλοκαιριού και στη συνέχεια να τρέφονται με πουλιά ή θηλαστικά (Spielman, 2001). Αυξημένη διατροφή σε θηλαστικά από *Cx. pipiens* αργά την εποχή σε εύκρατα κλίματα είναι μια κοινή παρατήρηση. Γενετικές μελέτες δείχνουν ότι οι πληθυσμοί *Cx. Pipiens* στις ΗΠΑ είναι ένα μείγμα γονότυπων *pipiens-molestus-quinquefasciatus* και ως εκ τούτου εκφράζουν διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Kilpatrick et al., 2006). Τα *Culex pipiens* μπορεί επομένως να εμπλέκονται στην ενίσχυση του WNV στις αρχές της σεζόν σε ενζωοτικούς κύκλους και να χρησιμεύουν ως φορείς γέφυρα όταν γίνονται άφθονα τα αυτογενή - μη αυτογενή υβρίδια (Spielman, 2001; Kilpatrick et al., 2006).

## 2. Άλλοι πιθανοί φορείς

Ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει ανιχνευθεί σε ιπποβοσκίδες στις ΗΠΑ, χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής Taqman (RT-PCR) (Farajollahi et al., 2005), και απομονώθηκε από μαλακά τσιμπούρια στο Ισραήλ (Mumcuoglu et al., 2005) και από σκληρά τσιμπούρια στη Ρωσία. Ο πιθανός ρόλος άλλων εντόμων που δαγκώνουν (π.χ. μύγες, μύγες άμμου και μαύρες μύγες) πρέπει να διερευνηθεί (Pradier et al., 2012a).

### 3. Διατήρηση και εξάπλωση

Οι πιθανοί μηχανισμοί διατήρησης του WNV εντός μιας ενζωτικής εστίας περιλαμβάνουν συνεχή ενζωτική μετάδοση χαμηλού επιπέδου, κάθετη μετάδοση από κουνούπια φορείς και χρόνια λοίμωξη στα πουλιά (Baqar et al., 1993; Komar et al., 2003; Reisen et al., 2006) (Σχήμα 2). Η κάθετη μετάδοση του WNV στα κουνούπια *Culex* και *Aedes* έχει αποδειχθεί πειραματικά (Baqar et al., 1993) και ο ιός έχει απομονωθεί από προνύμφες *Cx. univittatus* που συλλέχθηκαν από το πεδίο στην Κέννα (Miller et al., 2000). Το εάν αυτά τα χαμηλά ποσοστά κάθετης μετάδοσης παρέχουν έναν αποτελεσματικό τρόπο διατήρησης του ιού παραμένει ασαφές (Pradier et al., 2012a).



Σχήμα 2. Κύκλος μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου

Πηγή: (Pradier et al., 2012a)

### **3.1. Πουλιά, φυσικοί ξενιστές για τον ιό του Δυτικού Νείλου**

Τα πουλιά θα διατηρήσουν μια μολυσματική ιαιμία για 1 έως 4 ημέρες μετά την έκθεση, μετά την οποία θα αναπτύξουν ισόβια ανοσία (Jourdain et al., 2007). Στην Ευρώπη, η θνησιμότητα των πτηνών που σχετίζεται με τη μόλυνση από WNV είναι σπάνια, ωστόσο, στο Ισραήλ, την Ουγγαρία και την Ισπανία, αρκετοί πελαργοί, χήνες και αρπακτικά έχει αναφερθεί ότι πέθαναν από μόλυνση από WNV (Malkinson et al., 2002; Bakonyi et al., 2006; Jiménez-Clavero et al., 2008). Στη Βόρεια Αμερική, η εμφάνιση του WNV στη Νέα Υόρκη αποκαλύφθηκε από τους θανάτους χιλιάδων πουλιών (Steele et al., 2000). Σε εργαστηριακές μελέτες, τα Στρουθιόμορφα (ωδικά πτηνά), τα Χαραδριόμορφα (παρυδάτια πουλιά), Γλαυκόμορφα (κουκουβάγιες) και τα Ιερακόμορφα (γεράκια) ανέπτυξαν επίπεδα ιαιμίας επαρκή για να μολύνουν τα περισσότερα κουνούπια ( $10^5$  μονάδες σχηματισμού πλάκας / ml ορού για *Cx. Pipiens*, για παράδειγμα) (Komar et al., 2003).

### **3.2. Άλλοι πιθανοί κύκλοι μετάδοσης για τον ιό του Δυτικού Νείλου**

#### **3.2.1. Άλλοι πιθανοί ξενιστές ενισχυτές**

Οι άνθρωποι, τα άλογα και τα περισσότερα άλλα θηλαστικά είναι τυχαίοι (αδιέξοδοι) ξενιστές του WNV επειδή δεν προκαλούν σημαντική ιαιμία και δεν συμβάλλουν στον κύκλο μετάδοσης (MI et al., 2002). Ο ιός έχει ανιχνευθεί σε πολλά ζώα, όπως νυχτερίδες, γάτες, σκύλους, ρακούν, κουνέλια, κατσίκες, τάρανδους, αλπακάς, καμήλες, μεφίτιδες, φώκιες λιμανιών, αρπακτικά, αμφίβια και ερπετά, τα περισσότερα από τα οποία θεωρούνται τυχαίοι ξενιστές (Lichtensteiger et al., 2003; Jacobson et al., 2005). Ωστόσο, οι σκίουροι, ο Ραβδωτός ταμίας (*Tamias striatus*), τα κουνέλια Συλβιλαγός ο φλοριδανός (*Sylvilagus floridanus*), και ορισμένα είδη λεμούριου και αλιγάτορα έχουν αρκετά υψηλά επίπεδα ιαιμίας για να μολύνουν τουλάχιστον ένα μικρό ποσοστό κουνουπιών και μπορεί να είναι κατάλληλοι ξενιστές ενίσχυσης για τον WNV (Pradier et al., 2012b).

#### **3.2.2. Μη ιαιμική μετάδοση**

Η πιθανή μόλυνση των κουνουπιών που τρέφονται με μη μολυσμένους ξενιστές αλλά κοντά σε άλλα μολυσμένα κουνούπια έχει προταθεί από ορισμένους συγγραφείς (Higgs et al., 2005). Το φαινόμενο της συν-διατροφής (η μετάδοση με συν-διατροφή συμβαίνει όταν μολυσμένοι και

μη μολυσμένοι φορείς τρέφονται σε χωροχρονική εγγύτητα μεταξύ τους στον ίδιο ξενιστή δεξαμενή) είναι γνωστό στα τσιμπούρια (Randolph et al., 1996). Αυτός ο μηχανισμός θα μπορούσε να επιταχύνει σε μεγάλο βαθμό τη δημιουργία επιδημίας WNV σε μια δεδομένη περιοχή, ανεξάρτητα από τον πολλαπλασιασμό του ιού και την ανάπτυξη της ιαιμίας στους ενισχυτικούς ξενιστές. Ο μηχανισμός μετάδοσης κατά τη διάρκεια της συν-διατροφής θα πρέπει να καθοριστεί για άλλους πιθανούς φορείς του WNV προκειμένου να εκτιμηθεί η σημασία του στη μόλυνση των κουνουπιών με αυτόν τον ιό (Pradier et al., 2012b).

### **3.2.3. Νέες οδοί μετάδοσης: μετάδοση χωρίς φορέα**

Έχει αποδειχθεί η μετάδοση του WNV μεταξύ των κοράκων στο ίδιο κλουβί και της στοματικής μετάδοσης σε κοράκια από μολυσμένα ψοφίμια (Komar et al., 2003). Η άμεση μετάδοση έχει επίσης αποδειχθεί σε αλιγάτορες, οικόσιτες γαλοπούλες στο Ουισκόνσιν και οικόσιτες χήνες στον Καναδά (Banet-Noach et al., 2003; Glaser et al., 2003; Jacobson et al., 2005). Στους ανθρώπους, ο πιο σημαντικός τομέας ανησυχίας όσον αφορά τους νέους τρόπους μετάδοσης του WNV είναι η μετάγγιση μολυσμένων συστατικών του αίματος, η οποία τεκμηριώθηκε σε μια ομάδα ασθενών, μερικοί από τους οποίους ήταν ανοσοκατεσταλμένοι, στις ΗΠΑ το 2002 (Pealer et al., 2003). Ορολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 2000 μεταξύ αιμοδοτών που ζούσαν στη Νότια Γαλλία έδειξαν σημαντικό επιπολασμό αντισωμάτων IgG και IgM του WNV. Αυτές οι περιπτώσεις οδήγησαν στην εφαρμογή ολοκληρωμένης παρακολούθησης των αιμοδοσιών (Pradier et al., 2012a). Η μόλυνση μπορεί επίσης να συμβεί με μεταμόσχευση οργάνων, ιστών και μεταμόσχευση κυττάρων (Ulbert, 2011). Μπορεί επίσης να μεταδοθεί κατά το χειρισμό ιστών μολυσμένων ζώων μέσω διαδερμικού ενοφθαλμισμού σε εργαστήρια και διαπλακουντιακά από τη μητέρα στο έμβρυο και κατά το θηλασμό (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002a; Gossner et al., 2017). Έχουν αναφερθεί επίσης και περιπτώσεις μόλυνσης από WNV μέσω αιμοκάθαρσης (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2004). Τέλος, έχει αναφερθεί μόλυνση από WNV σαν επαγγελματική νόσος σε εργαστηριακούς και κτηνιάτρους μέσω διαδερμικού εμβολιασμού και πιθανώς μέσω έκθεσης σε αεροζόλ, για παράδειγμα κατά τη διάρκεια νεκροψίας αλόγου (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002b; Venter et al., 2010).

#### 4. Κύκλοι μετάδοσης αρμυοίων και αστικοποίηση

Οι ιοί που μεταδίδονται με αρθρώποδα (αρμυοίοι) μεταδίδονται βιολογικά (που απαιτούν αντιγραφή στο αρθρώποδο) μεταξύ σπονδυλωτών ξενιστών από μια μεγάλη ποικιλία φορέων, συμπεριλαμβανομένων των κουνουπιών, των κροτώνων και άλλων. Όλοι οι αρμυοίοι που επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία είναι παθογόνα που προκαλούν ζωοανθρωπονόσους (Weaver and Reisen, 2010a). Αυτοί οι ιοί που προκαλούν μεγάλες επιδημίες, συνήθως σε πόλεις, μεταδίδονται από κουνούπια και περιστασιακά και άλλα αρθρώποδα, όπως το *Culicoides spp.*

Οι κύκλοι και οι μηχανισμοί διατήρησης και μετάδοσης σε ανθρώπους των παθογόνων που μεταδίδονται από κουνούπια μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες:

1. Η συντριπτική πλειονότητα των αρμυοίων μολύνει τους ανθρώπους «κατά λάθος» μέσω διαρροής, όταν ένας φορέας δαγκώνει πρώτα έναν ιαιμικό ενζωτικό ξενιστή και στη συνέχεια, μετά από εξωγενή επώαση, με αντιγραφή και διάδοση στο σάλιο, μεταδίδεται κατά τη διάρκεια μιας επόμενης σίτισης πάνω σε άνθρωπο. Παραδείγματα αρμυοίων που προκαλούν σημαντική νόσο στον άνθρωπο μόνο μέσω ενζωτικής διαρροής περιλαμβάνουν τους ιούς του Δυτικού Νείλου (WNV) και την εγκεφαλίτιδα από κρότωνες.
2. Μερικοί αρμυοίοι είναι σε θέση να υποστούν δευτερογενή ενίσχυση σε οικόσιτα ζώα για να αυξήσουν τα επίπεδα κυκλοφορίας και κατά συνέπεια σαν φυσικό επακόλουθο λοιμώξεις σε ανθρώπους.
3. Οι αρμυοίοι που μπορούν να υποστούν άμεση ανθρώπινη ενίσχυση και να παρακάμψουν τους ενζωτικούς ξενιστές έχουν τη δυνατότητα να μολύνουν ακόμη περισσότερους ανθρώπους και να εξαπλωθούν γρήγορα και ευρέως μέσω μολυσμένων ταξιδιωτών, με αεροπορικό ταξίδι ενός άγνωστου, επωαστικού ατόμου που επιτρέπει διηπειρωτική εξάπλωση εντός ωρών (Wilder-Smith et al., 2017).

##### 4.1. Καθοριστικοί παράγοντες της αστικοποίησης των αρμυοίων μέσω της ανθρώπινης μετάδοσης

Αν και η ενζωτική μετάδοση αρμυοίων μπορεί να είναι ευρεία σε αστικά περιβάλλοντα, όπως ο κύκλος του WNV στα πουλιά, τα υψηλότερα επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου στις αστικές περιοχές εμφανίζονται γενικά με μετάδοση μεταξύ ανθρώπων μέσω ανθρωπόφιλων κουνουπιών φορέων, ειδικά του *A. aegypti*. Η αποτελεσματικότητα αυτού του είδους ανθρώπινης ενίσχυσης αστικού κύκλου εξαρτάται από: 1) την ικανότητα του αρμυοίου να

παράγει ένα αρκετά υψηλό επίπεδο ιαιμίας στον άνθρωπο για να μολύνει κουνούπια δυνητικούς φορείς, 2) τη διαθεσιμότητα των κουνουπιών με επαρκή ικανότητα φορέας για μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο. Ορισμένοι αρμοποιοί, όπως ο WNV, παράγουν μόνο χαμηλά επίπεδα ανθρώπινης ιαιμίας (Barzon et al., 2015), τα οποία μπορεί εν μέρει να εξηγήσουν την απουσία της μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Εκτός από την ικανότητα του φορέα (η εγγενής ευαισθησία σε μόλυνση ενός δεδομένου είδους αρthropόδου και η ικανότητά του να μεταδίδει μετά από εξωγενή επώαση), η πιο περιεκτική ικανότητα φορέας περιλαμβάνει άλλους κρίσιμους παράγοντες που σε ορισμένες περιπτώσεις είναι πιο σημαντικοί. Ο τύπος, ο οποίος προσπαθεί να ποσοτικοποιήσει τον ημερήσιο ρυθμό με τον οποίο προκύπτουν νέες μολύνσεις από μια μολυσματική περίπτωση ( $C$ , ή  $R_0$ ), είναι:  $C = ma^2br^n / - \ln p$  στον οποίο

- $m$  = μέγεθος πληθυσμού του φορέα, συγκεκριμένα ο αριθμός των φορέων ανά ενισχυτικό ξενιστή,
- $a$  = ημερήσιο ποσοστό δαγκώματος ενός θηλυκού κουνουπιού σε ανθρώπους,
- $b$  = κλάσμα φορέων που μεταδίδουν ιό σε μη μολυσμένο ξενιστή κατά τη διάρκεια της σίτισης,
- $p$  = ημερήσιο ποσοστό επιβίωσης του φορέα (η επιβίωση πρέπει να είναι επαρκής για να δαγκώσει έναν μολυσμένο ξενιστή, να υποβληθεί σε εξωγενή επώαση που μπορεί να είναι έως και 14 ημέρες), στη συνέχεια να δαγκώσει έναν ευαίσθητο ξενιστή για μετάδοση, για ενίσχυση, πρέπει να δαγκωθούν πολλοί ευαίσθητοι ξενιστές τουλάχιστον περιστασιακά.
- $n$  = αριθμός ημερών μεταξύ της μόλυνσης του φορέα και της πρώτης ικανότητάς του να μεταδίδει (εξωγενής περίοδος επώασης) και ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση περιλαμβάνει την πυκνότητα του φορέα σε σχέση με τους πιθανούς ενισχυτικούς ξενιστές, όπως οι άνθρωποι σε αστικούς κύκλους, και ο ρυθμός δαγκώματος του φορέα στον ενισχυτικό ξενιστή (συχνά αντικατοπτρίζεται στη προτίμηση του ξενιστή ή στον υψηλό βαθμό πρόσβασης). Αυτά καθορίζουν εάν υπάρχει επαρκής συχνότητα διαδοχικού γεύματος πάνω σε αυτούς τους ξενιστές για μετάδοση. Επίσης κρίσιμη είναι η επαρκής μακροζωία για λοίμωξη και εξωγενή επώαση (η περίοδος μεταξύ της αρχικής στοματικής λοίμωξης και της εμφάνισης ιού στο σάλιο), και η ελάχιστη διάρκεια της εξωγενούς περιόδου επώασης ή του χρόνου μεταξύ των γευμάτων (Weaver, 2018).

## **5. Παράγοντες που προκαλούν αλλαγές στη κατανομή του ιού του Δυτικού Νείλου**



## **5.1. Παράγοντες που συνδέονται με την κλιματική αλλαγή και τους πληθυσμούς κουνουπιών**

Ήδη από το 1999, ο Epstein πρότεινε ότι ένας ήπιος χειμώνας που ακολουθείται από ξηρές περιόδους άνοιξης και καλοκαιριού, καύσωνες τον Ιούλιο και καταιγίδες με βροχοπτώσεις στις αρχές του φθινοπώρου θα ευνοούσαν την εμφάνιση νόσων που μεταδίδονται από κουνούπια (Epstein, 2001). Κατά τη διάρκεια της επιδημίας WNV στο Ισραήλ το 2000, η ελάχιστη θερμοκρασία βρέθηκε να είναι ο πιο σημαντικός κλιματικός παράγοντας που ενθάρρυνε την πρόωρη εμφάνιση της νόσου (Paz, 2006). Παρόμοια ήταν η εξέλιξη της επιδημίας στη Ρουμανία το 1996 (Tsai et al., 1998). Κάθε μία από αυτές τις επιδημίες εμφανίστηκε μετά από ένα μακρύ καύσωνα. Το κλίμα επηρεάζει σημαντικά την αφθονία των κουνουπιών φορέων, τη βιολογία και τη φυσιολογία τους (Rogers and Randolph, 2006), καθώς είναι πολύ ευαίσθητα στις καιρικές συνθήκες σε πολλά στάδια του κύκλου ζωής τους. Η επίδραση της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής στα νοσήματα που μεταδίδονται από φορείς μπορεί να είναι θετική ή αρνητική. Για παράδειγμα, είναι πιθανό ότι, η αύξηση της θερμοκρασίας θα οδηγήσει όχι μόνο σε αύξηση του ρυθμού δαγκώματος του φορέα και της ταχύτητας ανάπτυξης ιών στο κουνούπι, αλλά και σε αύξηση του ποσοστού θνησιμότητας του φορέα (Rogers and Randolph, 2006). Η μετάβαση από χαμηλή μετάδοση σε αυξημένη μετάδοση λόγω των επιδράσεων της θερμοκρασίας φαίνεται να συμβαίνει σε ένα στενό εύρος θερμοκρασιών, υποδεικνύοντας ότι συνήθως υπάρχει μια βέλτιστη θερμοκρασία για μετάδοση (Kilpatrick et al., 2008). Η ξηρασία φέρνει σε στενή επαφή τα πουλιά ξενιστές και τα κουνούπια φορείς και διευκολύνει τον επιζωοτικό κύκλο και την ενίσχυση των αρμοπιδίων σε αυτούς τους πληθυσμούς (Epstein, 2001). Στο Νότο της Γαλλίας, μια αναδρομική μελέτη για την επιδημία WNV του 2000 έδειξε ότι το ποσοστό δαγκώματος του *Cx. Modestus* συσχετίστηκε θετικά με τη θερμοκρασία και την υγρασία, σε συνδυασμό με τις βροχοπτώσεις και τις ώρες ηλιοφάνειας (Pradier et al., 2012a).

## **5.2. Παράγοντες που συνδέονται με πληθυσμούς πουλιών**

### **5.2.1. Κινήσεις πουλιών: μετανάστευση και διασπορά**

Κατά τη διάρκεια των μεταναστευτικών μετακινήσεων, τα πουλιά μπορεί να μεταφέρουν παθογόνα που μπορούν να μεταδοθούν μεταξύ ειδών σε χώρους αναπαραγωγής, κατά τη διάρκεια του χειμώνα και σε σημεία στάσης όπου συγκεντρώνονται πολλά πουλιά διαφόρων

ειδών. Ένα παράδειγμα της πιθανής εισαγωγής του WNV από μεταναστευτικά πτηνά εμφανίστηκε στο Ισραήλ το 1998, όταν αναφέρθηκαν επιδημία του ιού σε φάρμες με χήνες και στοιχεία μόλυνσης σε νεκρά αποδημητικά πτηνά (Bin et al., 2001a). Παρόλο που είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι μεταναστεύσεις πουλιών είναι σημαντικοί παράγοντες που επιτρέπουν στον WNV να μετακινηθεί μεταξύ Αφρικής και Ευρώπης, υπάρχει ένα χάσμα γνώσεων μεταξύ του τι είναι γνωστό για τις μεταναστεύσεις των πτηνών και της πλήρους κατανόησης των φαινομένων που διέπει τις διηπειρωτικές μετακινήσεις του WNV. Πρώτον, πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένες πτυχές της φυσιολογίας των πτηνών και της παθολογίας της λοίμωξης από WNV. Για παράδειγμα, η διάρκεια της ιαιμίας και ο σχετικός κίνδυνος μετάδοσης σε φορείς κουνουπιών δεν υπερβαίνει τις 3 έως 4 ημέρες στις περισσότερες περιπτώσεις, ενώ η διηπειρωτική μετανάστευση από ενδημικές περιοχές στην υποσαχάρια Αφρική μπορεί εύκολα να διαρκέσει 15 έως 20 ημέρες για ένα γρήγορο μεταναστευτικό πουλί. Θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι το στρες κατά τη μετανάστευση μπορεί να επιμηκύνει την ιαιμική περίοδο, αλλά είναι απίθανο ένα άρρωστο πουλί να μπορεί να πετάξει για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα (Pradier et al., 2012a). Δεύτερον, συχνά θεωρείται δεδομένο ότι η κατεύθυνση της εισαγωγής του WNV είναι από την Αφρική στην Ευρώπη, κάτι που λίγα στοιχεία το υποστηρίζουν, ενώ υπάρχουν πολύ πιο συνεπή στοιχεία που υποστηρίζουν την εισαγωγή στην αντίθετη κατεύθυνση. Για παράδειγμα, η μόνη απομόνωση του WNV από πουλιά σε προφανή μετανάστευση περιγράφηκε στο Ισραήλ σε ένα κοπάδι μολυσμένων πελαργών που μετανάστευαν από την Ευρώπη στην Αφρική (Malkinson et al., 2002). Επιπλέον, οι περίοδοι μετάδοσης στην Αφρική και την Ευρώπη υποστηρίζουν την άποψη ότι ο ιός ταξιδεύει από την Ευρώπη στην Αφρική πιο εύκολα από ό, τι στην αντίθετη κατεύθυνση. Έτσι, η περίοδος μετάδοσης σε ενδημικά μέρη της υποσαχάριας Αφρικής, όπως στη Σενεγάλη, είναι από τον Οκτώβριο έως τον Ιανουάριο, αλλά το κύριο σώμα της μετανάστευσης των πτηνών εμφανίζεται από τα τέλη Φεβρουαρίου έως τον Μάιο. Είναι επομένως σχεδόν αδύνατο να μολυνθεί οποιοδήποτε μεταναστευτικό πουλί κατά τη διάρκεια της περιόδου μετανάστευσης. Επιπλέον, στην εύκρατη Ευρώπη ο ιός κυκλοφορεί το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, ακριβώς όταν τα περισσότερα μεταναστευτικά πουλιά επιστρέφουν στη χειμερινή τους διαμονή στην Αφρική. Τέλος, πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι μηχανισμοί που δεν σχετίζονται με τη μετανάστευση των πτηνών. Το εμπόριο πτηνών και προϊόντων πουλιών (νόμιμο ή παράνομο) θα μπορούσε επίσης να είναι υπεύθυνο για ορισμένες από τις εισαγωγές στην Ευρώπη. Ένα

παράδειγμα διηπειρωτικής εισαγωγής του WNV, πιθανώς ανεξάρτητο από τα μεταναστευτικά πτηνά, ήταν το ξέσπασμα του WNV στη Νέα Υόρκη το 1999, όπου σημειώθηκαν τα πρώτα περιστατικά της νόσου κοντά στο αεροδρόμιο (Lanciotti et al., 1999). Αν και οι γενετικές σχέσεις μεταξύ αφρικανικών και ευρωπαϊκών στελεχών του WNV υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός μηχανισμού μετατόπισης στον οποίο τα μεταναστευτικά πτηνά παίζουν πιθανό ρόλο, οι λεπτομέρειες ενός τέτοιου ρόλου δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητές (Pradier et al., 2012a).

### **5.2.2. Ποικιλομορφία και ανομοιογένεια ξενιστών**

Η βιοποικιλότητα θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά το ποσοστό επαφής μεταξύ ξενιστών ή μεταξύ ξενιστών και φορέων. Ωστόσο, φαίνεται να παίζει διφορούμενο ρόλο στην κυκλοφορία του WNV, με δύο αντίθετα αποτελέσματα, διότι το αποτέλεσμα μπορεί να εξαρτάται από τη βιοποικιλότητα κάθε τοποθεσίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αύξηση της βιοποικιλότητας θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μετάδοσης WNV. Στη Βόρεια Αμερική, η μετάδοση του ιού κυριαρχείται από ακραία ετερογένεια στην κοινότητα των πτηνών ξενιστών, με ένα μόνο είδος, τον Αμερικανικό Κοκκινολαίμη (*Turdus migratorius*), να είναι υπεύθυνος για την πλειονότητα των μολυσματικών κουνουπιών με WNV (Marm Kilpatrick et al., 2006). Στη νότια Γαλλία το 2003, οι δύο περιοχές με θετικά IgM άλογα βρίσκονταν κοντά σε προστατευμένες φυσικές ζώνες όπου η βιοποικιλότητα ήταν μεγαλύτερη από οπουδήποτε αλλού (Durand et al., 2005). Σε μια άλλη περίπτωση, η αυξημένη ποικιλομορφία των πτηνών στις ανατολικές ΗΠΑ συσχετίστηκε με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης λοίμωξης WNV σε άνθρωπο, απεικονίζοντας την έννοια, «αποτέλεσμα αραίωσης», και αποδεικνύοντας ότι η ποικιλομορφία της άγριας πανίδας μπορεί να βοηθήσει στην προστασία των ανθρώπινων πληθυσμών από μολυσματικά νοσήματα. Όπου η φυσική ποικιλομορφία των σπονδυλωτών είναι υψηλή, τα κουνούπια φορείς μπορούν να γευματίσουν από μια μεγάλη ποικιλία ξενιστών, κυρίως φτωχών δεξαμενών του WNV, με αποτέλεσμα χαμηλότερο επιπολασμό της λοίμωξης. Ο πλούτος (αριθμοί) μη παθητικών ειδών έχει αρνητικά συσχετιστεί τόσο με τα ποσοστά μόλυνσης από κουνούπια όσο και από τον άνθρωπο για τον WNV. Σε αυτές τις καταστάσεις η διατήρηση της ποικιλομορφίας των πτηνών και η βιοποικιλότητα εν γένει μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη των επιδημιών WNV (Pradier et al., 2012a).

## **Επιδημιολογικά δεδομένα στην Ελλάδα**

Το 2010, στην Ελλάδα καταγράφηκε για πρώτη φορά μια επιδημία λοίμωξης από WNV, η δεύτερη μεγαλύτερη στην Ευρώπη τις τελευταίες δύο δεκαετίες, με 262 κλινικά περιστατικά σε ανθρώπους και 35 θανάτους (Chaskoroulou et al., 2011). Ο εξελικτικός κλάδος WNV 2 ταυτοποιήθηκε από ανθρώπινους ορούς, κοτόπουλα φρουρούς, άγρια πτηνά και κουνούπια *Culex* (Papa et al., 2011b; Valiakos et al., 2011; Chaskoroulou et al., 2013). Ο ιός κατά πάσα πιθανότητα κατάφερε να ξεχειμωνιάσει και να εξαπλωθεί γρήγορα σε όλη τη χώρα τα επόμενα χρόνια (2010-2013), με αποτέλεσμα περισσότερους από 600 επιβεβαιωμένες μολύνσεις σε ανθρώπους και 70 θανάτους (Chaskoroulou et al., 2016). Η αγροτική περιοχή της Δυτικής Θεσσαλονίκης στη Κεντρική Μακεδονία βρισκόταν στο επίκεντρο της μεγάλης επιδημίας του 2010 στην Ελλάδα. Μέχρι το 2013 καταγράφηκαν περιστατικά σε ανθρώπους στην περιοχή αυτή. Η μετάδοση του WNV έχει επίσης καταγραφεί τακτικά (ή συνεχώς) σε κουνούπια και πουλιά-φρουρούς (κοτόπουλα, περιστέρια) (Chaskoroulou et al., 2011, 2013; Papa et al., 2011b).

## ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

### Άνθρωπος

Στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών ο ιός του Δυτικού Νείλου μεταδίδεται μετά από το τσίμπημα ενός μολυσμένου κουνουπιού. Η κατανόηση της κλινικής επιδημιολογίας της λοίμωξης από WNV περιπλέκεται από τον μεγάλο αριθμό περιπτώσεων που είναι είτε ασυμπτωματικές είτε δεν παρουσιάζουν ιατρική φροντίδα λόγω ήπιων συμπτωμάτων. Επιπλέον, είναι καλά αποδεδειγμένο ότι η γενετική παραλλαγή του WNV είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της παθογένειας, συμπεριλαμβανομένης της τάσης να εισβάλει στις μήνιγγες (Beasley et al., 2001, 2004). Αυτή η διακύμανση της παθογένειας έχει αποδειχθεί από την έκταση της ανθρώπινης νευροδιεισδυτικής νόσου που παρατηρείται με τα επιδημικά στελέχη στη βόρεια Αμερική και τη λεκάνη της Μεσογείου, έναντι των ενδημικών στελεχών της Αφρικής και της Αυστραλίας (Gray et al., 2011b; Frost et al., 2012; Lim et al., 2013).

Σε περίπου 1% όλων των μολυσμένων ασθενών, η λοίμωξη από ιό του Δυτικού Νείλου εξελίσσεται σε κλινική νόσο που σχετίζεται με σοβαρές νευρολογικές εκδηλώσεις, όπως η άσηπτη μηνιγγίτιδα, η εγκεφαλίτιδα και η οξεία χαλαρή παράλυση. Παρόλο που οι περισσότερες λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι υποκλινικές, τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν από έναν αυτοπεριοριζόμενο πυρετό έως σοβαρή νευρολογική νόσο (Ulbert, 2011).

Περίπου το 80% των μολύνσεων με ιό του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους είναι ασυμπτωματικές (Petersen and Marfin, 2002). Ο πυρετός του Δυτικού Νείλου εμφανίζεται ως ένα νόσημα τύπου γρίπης και χαρακτηρίζεται από μέτριο ή υψηλό πυρετό διάρκειας 3 έως 5 ημερών (περίοδος επώασης 3 έως 6 ημέρες). Ορίζεται ως η παρουσία τουλάχιστον τριών από τα κλινικά κριτήρια, που περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, γενικευμένη αδυναμία, πυρετό, σοβαρό μυϊκό πόνο, πόνο στις αρθρώσεις, ρίγη, πόνο στα μάτια ή ροδόλα εξάνθημα (Zou et al., 2010). Το ωοειδές ή ροδόλα εξάνθημα (Ferguson et al., 2005) εμφανίζεται σε περίπου 50% των περιπτώσεων, εξαπλώνεται από τον κορμό στα άκρα και το κεφάλι. Παρατηρείται επίσης λεμφαδενοπάθεια, ανορεξία, ναυτία, κοιλιακό άλγος, διάρροια, μυοσίτιδα, ορχίτιδα και αναπνευστικά συμπτώματα (Smith et al., 2004). Σπάνια έχουν αναφερθεί ηπατοσπληνομεγαλία, ηπατίτιδα, παγκρεατίτιδα, μυοκαρδίτιδα (Pergam et al., 2006) και αιμορραγικός πυρετός (Paddock et al., 2006). Η νευροδιεισδυτική νόσος μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις ομάδες που περιλαμβάνουν μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση (Kramer et al., 2007). Η

οξεία ασηπτική μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα εμφανίζεται περιστασιακά (<15% των περιπτώσεων), (Roos, 2004). Οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν επικαλυπτόμενα σύνδρομα, συμπεριλαμβανομένης της μηνιγγοεγκεφαλίτιδας. Η μηνιγγίτιδα του WNV χαρακτηρίζεται από πυρετό και σημάδια μηνιγγικού ερεθισμού, όπως πονοκέφαλο, δυσκαμψία στο λαιμό και φωτοφοβία. Η εγκεφαλίτιδα παρουσιάζει ένα ευρύ κλινικό εύρος, από μια ήπια, αυτοπεριοριζόμενη κατάσταση σύγχυσης έως μεταβαλλόμενο επίπεδο συνείδησης με συναφή εστιακά νευρολογικά σημεία, όπως αταξία, τρόμο και περιστασιακά επιληπτικές κρίσεις, κώμα και θάνατο (Kramer et al., 2007). Η θνησιμότητα που σχετίζεται με την επιδημία εγκεφαλίτιδας WNV, τόσο στη Βόρεια Αμερική όσο και στην Ελλάδα, είναι περίπου 20% (Bode et al., 2006; Danis et al., 2011a, 2011b). Όχι συχνές εκδηλώσεις λοίμωξης από WNV μπορεί να περιλαμβάνουν φλεγμονώδη ηπατίτιδα, παγκρεατίτιδα, ραβδομύλυση, μυοκαρδίτιδα, μυοσίτιδα και ορχίτιδα. Η συγγενής λοίμωξη περιγράφεται στα τέλη της εγκυμοσύνης. Ωστόσο, σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία, δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντικά αυξημένος ρυθμός ανωμαλιών του εμβρύου μετά από λοίμωξη από WNV κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Gray and Webb, 2014). Η οξεία χαλαρή παράλυση εμφανίζεται σε ποσοστό έως και 17,5% των ασθενών με νευροδισδυτική νόσο δευτερογενώς από την πρόσθια μυελίτιδα που προκαλείται από άμεση ιική εισβολή στα πρόσθια κέρατα (Leis and Stokic, 2012; Téllez-Zenteno et al., 2013), η οποία χαρακτηρίζεται από ασύμμετρη αδυναμία των άκρων, ελάττωση αντανακλαστικών και αισθητικές διαταραχές. Η κλινική της εικόνα είναι παρόμοια με αυτή της πολιομυελίτιδας και απαιτείται διαφορική διάγνωση από το σύνδρομο *Guillain-Barré* (οξεία μεταλοιμώδης πολυριζονευρίτιδα) (Murray et al., 2011). Αν και οι ασθενείς σπάνια περιγράφουν οπτικά συμπτώματα, η χοριορετινίτιδα και άλλες οφθαλμικές εκδηλώσεις του WNV είναι ιδιαίτερα συχνές (Khairallah et al., 2004; Garg and Jampol, 2005). Μπορεί να χρειαστεί έως ένα έτος για ανάρρωση μετά από εγκεφαλίτιδα. Τα πιο κοινά συμπτώματα που παραμένουν ένα χρόνο μετά τη λοίμωξη είναι η ανορεξία (77,3%) και η μυϊκή αδυναμία (72,7%), ακολουθούμενα από την ανεπάρκεια μνήμης (36,4%) και την κατάθλιψη (22,7%). Επιπρόσθετα, σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενείς στη φάση ανάρρωσης μπορεί να παρουσιάζουν εμμένουσα ή χρόνια λοίμωξη, όπως αυτή διαπιστώνεται από θετική PCR στα ούρα, γεγονός που επιβεβαιώνει ιικό πολλαπλασιασμό στο νεφρικό ιστό (Murray et al., 2011). Για κάθε αναφερόμενη περίπτωση WNNΔ σε άνθρωπο, εκτιμάται ότι υπάρχουν 140 άτομα με ασυμπτωματικές ή ελαφρώς συμπτωματικές λοιμώξεις. Από αυτά, εκτιμάται ότι 30 είναι άτομα

με μη νευροδισδυτικό WNF. Υπολογίζεται ότι περισσότερα από 1 εκατομμύριο άτομα έχουν μολυνθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 1999 έως το 2006. Σε μια μελέτη μεταξύ 98 ανθρώπων που είχαν προσβληθεί με νευροδισδυτικό WNF, εκτός από τον πυρετό, τα πιο κοινά κλινικά συμπτώματα ήταν η κόπωση (96%), πονοκέφαλος (71%), μυϊκή αδυναμία (61%) και δυσκολία συγκέντρωσης (53%). Ένα γενικευμένο, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα μπορεί επίσης να εμφανιστεί 5 έως 12 ημέρες μετά την έναρξη της νόσου (Trevejo and Eidson, 2008).

## **1. Παράγοντες κινδύνου**

Η συχνότητα εμφάνισης νευροδισδυτικής νόσου (WNND) και θανάτου αυξάνεται με την ηλικία σε ποσοστό 2% για ασθενείς άνω των 65 ετών (Danis et al., 2011a; Carson et al., 2012; Petersen et al., 2013). Άλλοι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης νευροδισδυτικής νόσου αντί του πυρετού του Δυτικού Νείλου (WNF) περιλαμβάνουν το ανδρικό φύλο, την υπέρταση, τον σακχαρώδη διαβήτη (Jean et al., 2007), την υπερκατανάλωση αλκοόλ και το ιστορικό καρκίνου (Gray and Webb, 2014). Η υπέρταση και η εγκεφαλική αγγειακή νόσος προάγουν πιθανώς την είσοδο και την αντιγραφή του ιού στο ενδοθήλιο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ο διαβήτης και η υπέρταση είναι και οι δύο ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για αυξημένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Οι ανοσοκατεσταλμένοι άνθρωποι διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο για λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου. Η διέγερση μιας ειδικής, εξουδετερωτικής απόκρισης IgM, νωρίς κατά τη διάρκεια της λοίμωξης WNV, περιορίζει την ιαμία και τη διάδοση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και προστατεύει από θανατηφόρο λοίμωξη (Diamond et al., 2003b).

## **2. Επιπτώσεις στη δημόσια υγεία**

Ο ρόλος των ζώων στην ανακάλυψη του WNV παρέχει ένα ακόμη παράδειγμα του τρόπου με τον οποίο τα ζώα ενεργούν ως φρουροί για αναδυόμενες ασθένειες. Τονίζει επίσης τον ζωτικό ρόλο που διαδραματίζουν οι κτηνίατροι στην αναγνώριση των αναδυόμενων ασθενειών, πολλές από τις οποίες επηρεάζουν τον άνθρωπο. Μια πρόσφατη επισκόπηση των μακροπρόθεσμων αποτελεσμάτων κατέδειξε την ανάγκη για μελλοντικές μελέτες για την παρακολούθηση του παρκινσονισμού και του συνδρόμου μετά από πολιομυελίτιδα ως κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με λοίμωξη WNV (Trevejo and Eidson, 2008).

## **Ζώα**

Μετά τη μόλυνση με ιό του Δυτικού Νείλου, περίπου το 10% των ίπων παρουσιάζουν νευρολογικές διαταραχές. Εκτός από τον πυρετό ( $> 38,5^{\circ} \text{C}$ ), τα κλινικά συμπτώματα WNV σε ίππους οφείλονται σχεδόν αποκλειστικά σε βλάβες του κεντρικού νευρικού συστήματος: αταξία στα οπίσθια άκρα και / ή τα πρόσθια άκρα, μη φυσιολογική συμπεριφορά, πάρεση, παράλυση, μυϊκός τρόμος, μυοκλονία, λήθαργος και διαταραχή λειτουργίας των κρανιακών νεύρων. Τα ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ κλινικά προσβεβλημένων ίπων εκτιμήθηκαν περίπου στο 40% έως 50% (Murgue et al., 2001b). Τα επίπεδα της ιαμίας στα μολυσμένα άλογα είναι πολύ χαμηλά σε μέγεθος και διάρκεια για να μολύνουν αποτελεσματικά τους φορείς, επιβεβαιώνοντας ότι τα άλογα είναι απίθανο να χρησιμεύσουν ως ενισχυτικοί ξενιστές για τον WNV (MI et al., 2002). Σε σκύλους έχουν αναφερθεί εγκεφαλίτιδα και μυοκαρδίτιδα (Lichtensteiger et al., 2003). Τα ποντίκια και άλλα εργαστηριακά τρωκτικά μετά τη μόλυνση με WNV, αναπτύσσουν εγκεφαλίτιδα που έχει πολλές ομοιότητες με την νόσο στον άνθρωπο (Kimura et al., 2010). Εκτός από την οροθετικότητα, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την εμφάνιση WNV στα πρόβατα. Μια περίπτωση θηλυκού προβάτου τεσσάρων ετών με λοίμωξη από WNV και νευρολογικά συμπτώματα έχει περιγραφεί στην Ουγγαρία. Τα ερπετά είναι επίσης ευαίσθητα στη μόλυνση. Τα κλινικά συμπτώματα που παρατηρούνται σε αλιγάτορες είναι ανορεξία, λήθαργος, τρόμος πρόθεσης, κολύμπι με τις πλευρές τους, περιστροφή στο νερό και οπισθότονος. Ο θάνατος επέρχεται 24 με 48 ώρες μετά την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Στην Ουγγαρία το 2004, ένα γεράκι (*Accipiter gentilis*) πέθανε μετά από εμφάνιση συμπτωμάτων από το κεντρικό νευρικό λόγω μόλυνσης από ένα στέλεχος του εξελικτικού κλάδου 2 (Pradier et al., 2012a).



## ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η πρόσφατη εμφάνιση επιδημίας του ιού Zika στην Αμερική και την Ασία έχει προσθέσει ένα άλλο επίπεδο πολυπλοκότητας στη διάγνωση του WNV λόγω σημαντικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ πολλών μελών της οικογένειας *Flaviviridae* όπως οι ιοί Zika, Δάγκειου πυρετού, Usutu και Δυτικού Νείλου. Η διάγνωση είναι ιδιαίτερα δύσκολη σε άτομα που ζουν σε περιοχές με συν-κυκλοφορία φλαβοϊών καθώς και σε ταξιδιώτες από ενδημικές χώρες του WNV που ταξιδεύουν σε περιοχές που έχουν μολυνθεί από Zika ή Δάγκειο πυρετό ή αντίστροφα.

### 1. Εργαστηριακή διάγνωση

Για την ανίχνευση και τη διάγνωση του ιού του Δυτικού Νείλου, η δοκιμή αντισωμάτων είναι αυτή τη στιγμή η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση. Τα αντισώματα ανοσοσφαιρίνης M (IgM) και ανοσοσφαιρίνης G (IgG) μπορούν συνήθως να ανιχνευθούν έως την 4<sup>η</sup> ημέρα και την 8<sup>η</sup> ημέρα μετά έναρξη των συμπτωμάτων, αντίστοιχα (Busch et al., 2008) και συνεπώς η ανίχνευση μόνο IgM αντισωμάτων ή IgG ορομετατροπής μπορεί να καταδείξει οξεία λοίμωξη WNV. Διατίθενται πολυάριθμα εμπορικά κιτ για ανίχνευση αντισωμάτων WNV τα οποία βασίζονται κυρίως στην ανίχνευση συγκεκριμένων αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης του φακέλου (E) του WNV χρησιμοποιώντας είτε ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης (ELISA) είτε δοκιμή ανοσοφθορισμού (IFA). Τα πλεονεκτήματα αυτών των ποιοτικών προσδιορισμών είναι ότι είναι πολύ εύκολα στη χρήση σε εργαστηριακό περιβάλλον, τα αποτελέσματα είναι ως επί το πλείστον αναπαραγώγιμα και μέρος του πρωτοκόλλου τους μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα WNV IgM μπορούν να παραμείνουν στον ορό για μήνες και ακόμη και χρόνια μετά τη μόλυνση (Prince et al., 2005; Busch et al., 2008; A et al., 2011; Murray et al., 2013, 2013; Papa et al., 2015) και υπάρχει σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ όλων των φλαβοϊών, είναι συχνά δύσκολο να διαγνωστεί η οξεία μόλυνση WNV με βάση αυτά τα εμπορικά κιτ μόνο.

#### 1.1. Ορολογική διάγνωση

Η βάση της διάγνωσης της λοίμωξης από WNV είναι η ανίχνευση αντισωμάτων IgM στον ορό ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF). Σε περισσότερο από το 98% των συμπτωματικών ασθενών

θα ανιχνευτούν IgM στον ορό μετά την πρώτη εβδομάδα της νόσου (Tilley et al., 2006). Τα WNV IgM μπορούν να παραμείνουν στον ορό για χρόνια σε ορισμένους ασθενείς, γεγονός που μπορεί να εμποδίσει τη διάγνωση και την παρακολούθηση των οξέων λοιμώξεων, ιδιαίτερα στο πλαίσιο των ετήσιων εποχιακών επιδημιών (A et al., 2011; Ko et al., 2013). Η κλινική διάγνωση της WNV λοίμωξης επιβεβαιώνεται εργαστηριακά με ανίχνευση IgM αντισωμάτων έναντι του WNV στο ENY και με αυξανόμενους τίτλους αντι-WNV IgG αντισωμάτων σε διαδοχικά δείγματα ορού ή ENY με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Περιστασιακά ψευδώς θετικά μπορεί να παρατηρηθούν σε ασθενείς με προηγούμενη λοίμωξη από φλαβοϊούς ή που έχουν εμβολιαστεί κατά του κίτρινου πυρετού και της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας. Η διαδικασία της οροεξουδετέρωσης (PRNT, plaque-reduction neutralization test) που εφαρμόζεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια ανιχνεύει εξουδετερωτικά αντισώματα και συμβάλει στον προσδιορισμό του φλαβοϊού που είναι υπεύθυνος για τη λοίμωξη και τον αποκλεισμό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Gray and Webb, 2014). Υπάρχουν διάφοροι τύποι πρωτοκόλλων εξουδετέρωσης με παρόμοια απόδοση που διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους [εξουδετέρωση μείωσης πλάκας (PRNT) 50 ή PRNT90], τη μέθοδο ανίχνευσης κυτταροπαθούς αποτελέσματος (CPE) (άμεση, χρώση, ανίχνευση με IFA) και τις χρησιμοποιούμενες πλάκες (για PRNT ή μικρο-εξουδετέρωση).

## **1.2. Ανίχνευση και απομόνωση του ιού**

Η χρήση τεχνικών ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων έχει δώσει την ευκαιρία για τη διάγνωση του WNV σε ασθενείς πριν από την παραγωγή IgM αντισωμάτων, με την κυκλοφορία ανιχνεύσιμων επιπέδων WNV RNA στο αίμα, κατά μέσο όρο, 4 ημέρες πριν από την πρώτη ανίχνευση IgM αντισωμάτων. Η μετάδοση του WNV μέσω της αιμοδοσίας ή της δωρεάς οργάνων έχει καταγραφεί στις Ηνωμένες Πολιτείες (Gyure, 2009) και στην Ευρώπη (Morelli et al., 2010; Costa et al., 2011; Rabel et al., 2011; Inojosa et al., 2012). Το 80% των WNV λοιμώξεων σε ανθρώπους είναι ασυμπτωματικοί και τα περισσότερα άτομα δεν γνωρίζουν ότι έχουν μολυνθεί με WNV, ειδικά σε περιοχές ενδημικές για WNV (Hayes et al., 2005a). Επομένως η ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων WNV για τον έλεγχο των προϊόντων αίματος σε ενδημικές περιοχές και η εισαγωγή τέτοιων μέτρων σε αυτές τις περιοχές έχει ουσιαστικά εξαλείψει την μετάδοση WNV μέσω της αιμοδοσίας ή δωρεάς οργάνων. Είναι δυνατή η απομόνωση του WNV με καλλιέργεια αίματος ή CSF (Gray and Webb, 2014).

### **1.3. Διάγνωση οξείας λοίμωξης από τον WNV**

Τα τελευταία χρόνια, η ανίχνευση ιικού γονιδιώματος σε σωματικά υγρά με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) έχει γίνει η μέθοδος ρουτίνας διάγνωσης για πολλές ιογενείς λοιμώξεις λόγω της τυποποιημένης διαδικασίας, της επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας, της υψηλής ευαισθησίας και της ειδικότητας, του γρήγορου χρόνου διεκπεραίωσης και της ευκολίας χρήσης (Boonham et al., 2014). Δυστυχώς τα περισσότερα νοσήματα που προκαλούνται από φλαβοϊούς συμπεριλαμβανομένου του ιού του Δυτικού Νείλου, η μοριακή διάγνωση με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) των δειγμάτων ορού, πλάσματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού (CSF) είναι περιορισμένης αξίας για διάγνωση ρουτίνας λόγω χαμηλού επιπέδου και βραχείας διάρκειας ιαιμίας που προκαλείται από αυτούς τους ιούς (Busch et al., 2006, 2008; Barzon et al., 2013a; Lustig et al., 2016c). Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο WNV διατηρείται στα νεφρά και ως εκ τούτου μπορεί να ανιχνευθεί σε δείγματα ούρων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το πλάσμα, το CSF ή τον ορό (Barzon et al., 2013a, 2013c, 2014, 2015). Επιπλέον, δεδομένου ότι ο WNV αποδείχθηκε ότι προσκολλάται στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Rios et al., 2007) μπορεί να παραμείνει για μήνες σε πλήρες αίμα αιμοδοτών (Lanteri et al., 2014). Επιπλέον, δεδομένου ότι ο WNV μπορεί να μεταφερθεί μέσω του αίματος (Pealer et al., 2003; Montgomery et al., 2006), ο έλεγχος αιμοδοσίας αίματος και οργάνων που λαμβάνονται από άτομα που ζουν σε ενδημικές περιοχές WNV είναι σημαντικός για τον εντοπισμό δειγμάτων που έχουν μολυνθεί με WNV (Pisani et al., 2016). Ανακαλύφθηκε πρόσφατα ότι κατά τη διάρκεια της οξείας λοίμωξης WNV, το RNA του WNV μπορεί να ανιχνευθεί στο 86,8 % των δειγμάτων ολικού αίματος, στο 26 % ορού, στο 16,6 % CSF, στο 20% πλάσματος και στο 58,3% ούρων σε ασθενείς με λοίμωξη με WNV, αποδεικνύοντας την ανωτερότητα και την αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης WNV RNA σε ολικό αίμα για τη διάγνωση οξείας μόλυνσης (Lustig et al., 2016b).

### **1.4. Νέες μέθοδοι για ανίχνευση του WNV**

Οι ορολογικές μέθοδοι υποβοηθούμενες από την ανίχνευση ιικού νουκλεϊκού οξέος με qRT-PCR, πιθανότατα, θα συνεχίσουν να είναι οι πρωταρχικές και προτιμώμενες διαγνωστικές μέθοδοι για το WNV. Ωστόσο, η καθιέρωση μεθόδων αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) τα τελευταία χρόνια, οι οποίες ονομάζονται επίσης αλληλούχιση υψηλής απόδοσης, οδήγησαν

στην αυξημένη χρήση της NGS για συμπλήρωση της διάγνωσης και παρακολούθηση μολυσματικών ασθενειών που προκαλούνται τόσο από βακτήρια (Deurenberg et al., 2017) όσο και από ιούς (Höper et al., 2016; Casadellà and Paredes, 2017; Ramamurthy et al., 2017). Η πιο σημαντική διαγνωστική εφαρμογή για την NGS είναι πιθανώς η αλάνθαστη αναγνώριση παθογόνων σε κλινικά δείγματα. Όσον αφορά τον WNV, ένα παράδειγμα είναι η ταυτοποίηση του WNV με NGS σε δείγμα CSF που ελήφθη από ασθενή με μηνιγγοεγκεφαλίτιδα 14 ετών (Wilson et al., 2017). Σε μια πρόσφατη μελέτη, δείγματα πλάσματος από 12 περιπτώσεις ανεξήγητων εμπύρετων νόσων στην Τανζανία διερευνήθηκαν με τη μέθοδο NGS και ταυτοποίησαν τον WNV σε δύο δείγματα (Williams et al., 2018). Αυτά τα παραδείγματα καταδεικνύουν την προσθετική αξία που μπορεί να παρέχει η NGS ακόμη και στη διάγνωση ιών με βραχεία ιαμμία όπως ο WNV. Η μέθοδος NGS μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε επιδημιολογική διερεύνηση (Zana et al., 2016). Πρόσφατα, προέκυψε μια καινοφανής μέθοδος για την ανίχνευση RNA φλαβοϊών, συμπεριλαμβανομένου του WNV από σωματικά υγρά. Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR-cas13, χρησιμοποιήθηκε μια φθορίζουσα πρωτεΐνη για τον εντοπισμό και την ανίχνευση των RNA φλαβοϊών που υπάρχουν σε δείγματα ασθενών δημιουργώντας μια πλατφόρμα διάγνωσης ιών με υψηλή απόδοση και ελάχιστες απαιτήσεις εξοπλισμού ή επεξεργασίας δείγματος (Myhrvold et al., 2018). Αυτή η πλατφόρμα είναι συγκρίσιμη με την ευαισθησία της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR), είναι γρήγορη (κάτω των 2 ωρών) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική πλατφόρμα σε περιοχές με περιορισμένους πόρους ή ακόμη και να ανταγωνιστεί τις τρέχουσες μοριακές διαγνωστικές συσκευές που κυκλοφορούν στην αγορά (Lustig et al., 2018a).

## ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο κατά της λοίμωξης από WNV για ανθρώπους. Συνιστάται η ατομική προστασία από τσιμπήματα κουνουπιών για άτομα που κατοικούν ή επισκέπτονται πληγείσες περιοχές, ειδικά σε ηλικιωμένους και σε ανοσοκατεσταλμένους που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών συμπτωμάτων. Τα ατομικά προστατευτικά μέτρα για τη μείωση του κινδύνου τσιμπήματος κουνουπιών περιλαμβάνουν τη χρήση εντομοαπωθητικών σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στην ετικέτα των προϊόντων και χρήση κατάλληλων ενδυμάτων που καλύπτουν όσο περισσότερο γίνεται το σώμα όπως μακρυμάνικα πουκάμισα και παντελόνια. Επιπλέον συνιστάται η χρήση σιτών στα παράθυρα και στις πόρτες (Factsheet about West Nile virus infection). Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά της νόσου του WNV είναι κυρίως υποστηρικτικές, καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα εγκεκριμένα εμβόλια ή ειδικές αντιϊκές θεραπείες για ανθρώπινη χρήση (Diamond, 2005; Sejvar, 2014). Ωστόσο, στην κτηνιατρική πρακτική έχουν ήδη αναπτυχθεί επιτυχημένες στρατηγικές για την πρόληψη λοιμώξεων από WNV. Υπάρχουν τέσσερα εμβόλια με άδεια από το USDA διαθέσιμα για ιπποειδή που παρέχουν ανοσία για τουλάχιστον ένα έτος (West Nile Virus | AAEP). Από τότε που έχουν πάρει έγκριση αυτά τα εμβόλια, τα περιστατικά λοίμωξης στα άλογα, από τον ιό του Δυτικού Νείλου, στις ΗΠΑ έχουν μειωθεί (Ng et al., 2003; El Garch et al., 2008). Εμβόλια υπομονάδας και DNA έχουν επίσης αναπτυχθεί για την προστασία μικρών ζώων και παρέχουν καλή προστασία έναντι της ιογενούς λοίμωξης (Ledizet et al., 2005; Ledgerwood et al., 2011).

Παρά την πρόοδο της έρευνας καθώς και τις αυξανόμενες ανησυχίες για τη δημόσια υγεία, δεν έχει αναπτυχθεί κανένα αποτελεσματικό φάρμακο για τη θεραπεία από WNV. Υπάρχει σαφής ανάγκη ανάπτυξης θεραπειών. Οι κλινικές δοκιμές για θεραπείες ειδικές για τον WNV ήταν προβληματικές, λόγω της σποραδικής εμφάνισης περιπτώσεων και της δυσκολίας πρόβλεψης επιδημιών από έτος σε έτος. Επιπλέον, οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζονται αργά, μπορεί να έχει καθυστερήσει η διάγνωση και συχνά είναι ηλικιωμένοι με ιατρικές συννοσηρότητες (Sayao et al., 2004; Petersen et al., 2013). Επί του παρόντος, οι οδηγίες συνιστούν στους ασθενείς με εγκεφαλίτιδα από WNV να λαμβάνουν υποστηρικτικές θεραπείες ακολουθούμενες από εντατική αποκατάσταση (Tunkel et al., 2008). Μόλις διαπιστωθεί νευροδιεισδυτική νόσος, η θεραπεία εστιάζεται στην πρόληψη δευτερογενούς εγκεφαλικού τραυματισμού με τη διαχείριση της υπότασης, της υποξαιμίας, της ενδοκρανιακής υπέρτασης, της υπεργλυκαιμίας, της αναιμίας, καθώς και των επιληπτικών κρίσεων (Kramer, 2013). Ο ρόλος των

κορτικοστεροειδών στη νευροδεδισδυτική νόσο ωστόσο παραμένει αμφιλεγόμενος λόγω της έλλειψης αποδεικτικών στοιχείων και ανησυχιών ότι η ανοσοκαταστολή μπορεί να επιδεινώσει τα αποτελέσματα. Υπάρχουν τρεις υποψήφιες αντιϊκές θεραπείες, συμπεριλαμβανομένης της ριμπαβιρίνης, της ιντερφερόνης (IFN-α) και της ειδικής για τον WNV ανοσοσφαιρίνης (Diamond, 2009; Baharuddin et al., 2014).

## 1. Ριμπαβιρίνη

Η ριμπαβιρίνη (*ribavirin*) είναι ένα συνθετικό νουκλεοσιδικό ανάλογο το οποίο έχει δείξει *in vitro* δραστικότητα έναντι μερικών RNA και DNA ιών και χρησιμοποιείται ευρύτερα στη θεραπεία της ηπατίτιδας C και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV) (Calvaruso and Craxì, 2012; Waghmare et al., 2013). Έχει αποδειχθεί σε διάφορες *in vitro* μελέτες η δραστικότητα υψηλής δόσης ριμπαβιρίνης για WNV (Anderson and Rahal, 2002; Morrey et al., 2002). Δεν υπάρχουν κλινικές δοκιμές που να αξιολογούν το ρόλο της ριμπαβιρίνης σε ανθρώπους με λοίμωξη WNV. Μετά από μια μεγάλη επιδημία WNV στο Ισραήλ το 2000, μια αναδρομική ανασκόπηση 37 ασθενών που έλαβαν ριμπαβιρίνη ανέφερε αυξημένη θνησιμότητα στην ομάδα που έλαβε θεραπεία. Ωστόσο, αυτό μπορεί να οφείλεται σε συστηματικό σφάλμα της θεραπείας ασθενών με πιο σοβαρή νόσο (Chowers et al., 2001). Η διαφορά μεταξύ της *in vitro* και της *in vivo* αποτελεσματικότητας της ριμπαβιρίνης μπορεί να αποδοθεί σε κακή βιοδιαθεσιμότητα και περιορισμένη διείσδυση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Με μια *per os* δόση ριμπαβιρίνης 2.400 mg ημερησίως, η επιτευχθείσα συγκέντρωση στον ορό ήταν 12-40 φορές χαμηλότερη από τη συγκέντρωση που απαιτείται για ένα *in vitro* ανασταλτικό αποτέλεσμα. Πρέπει να συγκεντρωθούν περαιτέρω δεδομένα για τον άνθρωπο και τα ζώα προτού προταθεί η ριμπαβιρίνη για τη θεραπεία της νόσου από τον WNV. Οι κατευθυντήριες γραμμές της Αμερικανικής Εταιρείας για εγκεφαλίτιδες από μολυσματικές νόσους, είναι κατά της χρήσης ριμπαβιρίνης σε ασθενείς με εγκεφαλίτιδα WNV (Gray and Webb, 2014).

## 2. Ιντερφερόνη α

Οι ιντερφερόνες (IFNs) είναι γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως ουσίες, που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ανήκουν, συνεπώς, στις κυτταροκίνες. Κύρια δράση των ιντερφερονών είναι η προστασία έναντι των ιογενών λοιμώξεων και των κακοήθων

νεοπλασιών. Ενεργοποιούν τα φυσικά κύτταρα φονείς και τα μακροφάγα, ώστε να καταστρέψουν τα μολυσμένα από ιούς κύτταρα. Η ιντερφερόνη-α χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη ριμπαβιρίνη στη θεραπεία της ιογενούς ηπατίτιδας C (Brassard et al., 2002; Borden et al., 2007). Το ανασταλτικό αποτέλεσμα της ιντερφερόνης-α σε λοίμωξη από τον WNV έχει αποδειχθεί σε κυτταρική καλλιέργεια πρωτευόντων σε συγκέντρωση που είναι εύκολα επιτεύξιμη στον ανθρώπινο ορό (Anderson and Rahal, 2002). Ο προστατευτικός ρόλος των IFN μετά τη μόλυνση από τον WNV επίσης συνάγεται από τη σημαντική αύξηση της θνησιμότητας σε πειραματικά μολυσμένα ποντίκια με ανεπάρκεια υποδοχέων IFN-α / β (Samuel and Diamond, 2005). Οι ενδείξεις για τη χρήση της IFN-α στον άνθρωπο περιορίζονται σε αναφορές περιπτώσεων μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, όπου τα αποτελέσματα είναι ανάμεικτα (Sayao et al., 2004; Kalil et al., 2005; Lewis and Amsden, 2007). Οι ιντερφερόνες δεν διεισδύουν στο ENY, οπότε ο βιολογικός μηχανισμός για την αναφερόμενη σε περιπτώσεις μηνιγγοεγκεφαλίτιδας απόκριση, παραμένει ανεξήγητος. Ωστόσο, λόγω της ανώτερης δράσης της ιντερφερόνης-α έναντι της ριμπαβιρίνης σε κυτταρική καλλιέργεια, των διαθέσιμων δεδομένων ασφάλειας σε ανθρώπινη χρήση, καθώς και του γεγονότος ότι οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις είναι εύκολα επιτεύξιμες στον ανθρώπινο ορό, η χρήση ιντερφερόνης-α δικαιολογεί περαιτέρω κλινικές δοκιμές για ασθενείς με λοίμωξη από τον WNV (Gray and Webb, 2014).

### **3. Ανοσοσφαιρίνη**

Η παθητική ανοσοποίηση, με τη μορφή ανοσοσφαιρίνης ή μονοκλωνικών αντισωμάτων, έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στη θεραπεία πολλών φλαβοϊών, συμπεριλαμβανομένου του WNV (Agrawal and Petersen, 2003; Ben-Nathan et al., 2009). Ένα σταθερό εύρημα στις μελέτες σε ζώα με WNV είναι ότι ο χρόνος παρέμβασης της ανοσοσφαιρίνης είναι βασικός, για να αλλάξει η κλινική πορεία. Η πρώιμη θεραπεία (ημέρα 1-2 μετά τη μόλυνση), συνήθως πριν από την εμφάνιση κλινικά εμφανούς νόσου, σχετίζεται με σχεδόν 100% επιβίωση τόσο σε ποντίκια όσο και σε χάμστερ, αλλά το θεραπευτικό όφελος μειώνεται σημαντικά όταν καθυστερήσει πέραν των 2-5 ημερών. Τα δημοσιευμένα δεδομένα σε ανθρώπους περιορίζονται σε αναφορές περιπτώσεων ασθενών, όπου η χορήγηση ανοσοσφαιρίνης ειδικής έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου ήταν αποτελεσματική (Walid and Mahmoud, 2009), και προς το παρόν, παραμένουν

ανεπαρκή για να συστήσουν ανοσοσφαιρίνη για τη θεραπεία της λοίμωξης από WNV (Gray and Webb, 2014).



## ΠΡΟΛΗΨΗ

Η μείωση του κινδύνου από τον WNV για την κοινότητα απαιτεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση που περιλαμβάνει την καταπολέμηση των κουνουπιών, την τροποποίηση ανθρώπινων και περιβαλλοντικών παραγόντων, καθώς και ενεργά προγράμματα επιτήρησης. Ενώ ο εμβολιασμός των αλόγων έχει εφαρμοστεί ευρέως σε ορισμένες ενδημικές περιοχές, δεν έχει καταχωριστεί εμβόλιο για τον άνθρωπο (Gray and Webb, 2014).

Τα μέτρα πρόληψης κατά του ιού του Δυτικού Νείλου βασίζονται εν μέρει σε μεθόδους για τη μείωση του αριθμού των κουνουπιών που έχουν μολυνθεί από τον ιό του Δυτικού Νείλου. Προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών εφαρμόζονται από τις Αρχές και χρησιμοποιούν ολοκληρωμένες αρχές διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών. Προσδιορίζουν προληπτικά τις εστίες των κουνουπιών φορέων και χρησιμοποιούν διάφορες μεθόδους, όπως την εξάλειψη των τόπων αναπαραγωγής, την εξάλειψη των προνυμφών και των ενηλίκων κουνουπιών για την αποτροπή της επίτευξης επιπέδων που αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης σε ανθρώπους. Όταν αυξάνεται η συχνότητα εμφάνισης κρουσμάτων σε ανθρώπους ή η επιτήρηση πληθυσμών κουνουπιών φορέων υποδηλώνει επικείμενη επιδημία στον άνθρωπο, ο άμεσος στόχος είναι να μειωθεί γρήγορα ο αριθμός των μολυσμένων ενήλικων κουνουπιών με εκτεταμένη εφαρμογή ψεκασμών υπερμικρού όγκου οργανοφωσφορικών ή συνθετικών εντομοκτόνων πυρεθροειδών (Petersen et al., 2013). Οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία που σχετίζονται με ψεκασμούς υπερμικρού όγκου οργανοφωσφορικών ή συνθετικών εντομοκτόνων πυρεθροειδών φαίνονται αμελητέοι, κυρίως επειδή ο χρόνος εφαρμογής και ο υπερμικρός όγκος των χρησιμοποιούμενων εντομοκτόνων έχουν ως αποτέλεσμα ελάχιστη έκθεση του ανθρώπου (Currier et al., 2005; Duprey et al., 2008). Η χρήση εντομοαπωθητικών έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο μόλυνσης από τον ιό του Δυτικού Νείλου (Mostashari et al., 2001). Δυστυχώς, λίγοι άνθρωποι αναφέρουν τακτική χρήση εντομοαπωθητικών ακόμη και κατά τη διάρκεια επιδημιών. Τα εμπορικά διαθέσιμα εντομοαπωθητικά που περιέχουν DEET, IR3535, λάδι ευκαλύπτου και πικαριδίνη είναι καταχωρημένα από την Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος βάσει των εξαιρετικών προφίλ ασφάλειας και της αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητάς τους στη μείωση ή πρόληψη του δαγκώματος των κουνουπιών. Πολλά άλλα μη εμπορικά προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο, όπως εκείνα που περιέχουν έλαιο κιτρονέλλας, λάδι κέδρου, γεράνι, λάδι μέντας έχουν μη αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα (Petersen et al., 2013).

Μέχρι να διατεθεί εμπορικά ένα εμβόλιο κατά του WNV που προορίζεται για ανθρώπινη χρήση, η πιο αποτελεσματική προφύλαξη κατά της μόλυνσης από WNV παραμένει ο έλεγχος του φορέων και η χρήση εντομοαπωθητικών για την προστασία από τσιμπήματα μολυσμένων κουνουπιών (Castro-Jorge et al., 2019). Περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας, μηνιγγίτιδας και άλλων ασθενειών που επηρεάζουν το ΚΝΣ χωρίς σαφή αιτιολογία, είτε σε ζώα είτε σε ανθρώπους, θα πρέπει πάντα να περιλαμβάνουν τη νευρολογική νόσο του ιού του Δυτικού Νείλου στη διαφορική διάγνωση. Η αναφορά και ο έλεγχος νεκρών πτηνών για την παρουσία λοιμώξεων από WNV είναι σημαντικά, για τα προγράμματα επιτήρησης. Πρέπει να διεξάγεται συνεχώς επιτήρηση στα έντομα και σε ζώα-φρουρούς με στόχο την έγκαιρη αναγνώριση της κυκλοφορίας του ιού (Castro-Jorge et al., 2019). Η ενεργή επιτήρηση για μολύνσεις από τον WNV σε πληθυσμούς κουνουπιών και πτηνών, σε συνδυασμό με την ανάλυση δεδομένων για το κλίμα και το περιβάλλον, μπορεί επίσης να επιτρέψει την ανίχνευση του WNV πριν από την έναρξη της νόσου σε πληθυσμούς ιπποειδών ή ανθρώπων, και ως εκ τούτου να προβλέψει τον χρόνο και τις τοποθεσίες μελλοντικών επιδημιών της νόσου (Lustig et al., 2018a).

## **Εμβόλια**

Παρά την ευρεία χρήση αποτελεσματικών εμβολίων στους ίππους, δεν υπάρχει διαθέσιμο ανθρώπινο εμβόλιο (Beasley, 2011). Ωστόσο, ορισμένα υποψήφια εμβόλια έχουν υποβληθεί σε δοκιμές αρχικής ασφάλειας και δοσολογίας σε ανθρώπους (Ledgerwood et al., 2011; Durbin et al., 2013). Ένα σημαντικό εμπόδιο για την περαιτέρω ανάπτυξη εμβολίων για τον WNV είναι το κόστος-όφελος μιας τέτοιας παρέμβασης. Έχει προταθεί ότι καθολικά προγράμματα εμβολιασμού είναι απίθανο να είναι οικονομικά αποδοτικά (Kaiser, 2012). Το κόστος-όφελος του εμβολιασμού θα μπορούσε να είναι θετικό εάν στόχευε στον ηλικιωμένο πληθυσμό, δεδομένου ότι άνθρωποι αυτής της ηλικίας βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για νευροδιεισδυτική νόσο. Για αυτόν τον λόγο, η ανάπτυξη ενός εμβολίου για ανθρώπινη χρήση θα πρέπει να περιλαμβάνει μελέτες ασφάλειας και αποτελεσματικότητας στον ηλικιωμένο πληθυσμό. Επιπλέον, η πρόσφατη εμφάνιση ιών του εξελικτικού κλάδου 2 που προκαλούν νόσο σε ανθρώπους και ζώα στην Ευρώπη απαιτεί τα εμβόλια να είναι αποτελεσματικά έναντι πολλαπλών παραλλαγών του WNV (Beasley, 2011). Επειδή οι άνθρωποι είναι τελικοί ξενιστές, ένα πρόγραμμα εμβολιασμού στον άνθρωπο δεν θα επηρεάσει τη ενίσχυση του ιού στη φύση (Petersen et al., 2013).

## **Έλεγχος φορέων και ατομική προστασία**

Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα στρατηγικών καταπολέμησης των κουνουπιών που στοχεύουν σε pronύμφες και σε ακμαία κουνούπια. Η καταλληλότερη στρατηγική θα πρέπει να καθορίζεται με βάση την ειδική για κάθε τοποθεσία κατανόηση των φορέων, συμπεριλαμβανομένων του βιοτόπου τους και της δυναμικής των ξενιστών. Πέρα από τη χρήση εντομοκτόνων από τις τοπικές αρχές, και στα σπίτια μπορεί να μειωθεί ο πληθυσμός των κουνουπιών αλλά και τα άτομα μπορούν ουσιαστικά να μειώσουν τον κίνδυνο από τον WNV εφαρμόζοντας μέτρα ατομικής προστασίας (Gray and Webb, 2014). Η ατομική ευθύνη είναι πιθανό να παρέχει την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στον WNV. Διατίθενται μια σειρά από μέτρα ατομικής προστασίας, όπως η χρήση δικτυών, εντομοαπωθητικών, καθώς και παγίδων κουνουπιών και άλλων συσκευών τα οποία είναι αποτελεσματικά για την πρόληψη των τσιμπημάτων κουνουπιών (Goodyer et al., 2010; Debboun and Strickman, 2013). Δύναται να χρησιμοποιηθούν εντομοαπωθητικά που περιέχουν N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET), 2-(2-hydroxyethyl)-1-piperidinecarboxylic acid 1-methylpropyl ester (icaridin), and p-methane 3, 8-diol (PMD) τα οποία έχουν ελάχιστες αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου (Goodyer and Behrens, 1998).

## **Πρόληψη επιδημιών**

Οι κλιματολογικές συνθήκες επιδρούν στις περιόδους επώασης των κουνουπιών ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος (Dohm et al., 2002a). Μελέτες των επιδημιών του WNV στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, έχουν προσδιορίσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες ως δυνητικά σημαντικούς παράγοντες της δραστηριότητας του ιού. Άλλες μελέτες στη Βόρεια Αμερική έχουν εντοπίσει υψηλό κίνδυνο που σχετίζεται με αστικά περιβάλλοντα (Gibney et al., 2012; Beasley et al., 2013; Paz and Semenza, 2013). Η αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών μπορεί επίσης να επηρεάσει τους πληθυσμούς ξενιστών δεξαμενών, συμπεριλαμβανομένης της μετανάστευσης πληθυσμών πτηνών σε νέες περιοχές ή άλλων αλλαγών που φέρνουν τα πτηνά ξενιστές, τα κουνούπια φορείς και τους ανθρώπινους πληθυσμούς σε εγγύτητα (Gray and Webb, 2014). Ενώ έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια για την ανάπτυξη προγνωστικών μοντέλων δραστηριότητας του WNV στη Βόρεια Αμερική (Carney et al., 2011; Kilpatrick and Pape, 2013), οι επιδημίες παραμένουν απρόβλεπτες (Zeller and Schuffenecker, 2004). Μοντέλα που επιτρέπουν την πρόβλεψη επιδημιών σε χώρες ή ηπείρους είναι απίθανο να αναπτυχθούν,

καθώς οι επιπτώσεις της αστικοποίησης και της περιβαλλοντικής αλλαγής δεν είναι ομοιόμορφες, ακόμη και σε γειτονικές περιοχές (Morin and Comrie, 2013). Ωστόσο, υπάρχει ακόμη περιθώριο για την ανάπτυξη στατιστικών και μαθηματικών μοντέλων που θα βοηθήσουν στην πρόβλεψη των επιδημιών σε τοπικό επίπεδο (Chevalier et al., 2014).

### **Μοντέλα πρόβλεψης κινδύνου**

Οι μέθοδοι που στοχεύουν στην πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνισης WNV βασίζονται σε στατιστικά ή μαθηματικά μοντέλα. Ο στόχος είναι να προσδιοριστούν βασικές παράμετροι που θα μπορούσαν να περιληφθούν σε συστήματα παρακολούθησης ρουτίνας και να επιτρέψουν την έγκαιρη προειδοποίηση και την εφαρμογή μέτρων ελέγχου (Rogers, 2006).

#### **1. Μοντέλα πρόβλεψης που βασίζονται σε φορείς**

Έχει αναπτυχθεί ένα θεωρητικό μοντέλο που επιτρέπει τον υπολογισμό της δυναμικής του πληθυσμού των κουνουπιών *Aedes* και *Culex* που αναπαράγονται σε λιμνούλες που σχηματίζονται από τη βροχή (Porphyre et al., 2005). Η δυναμική της αφθονίας των φορέων εξαρτάται από τη δυναμική των πλημμυρών και από τη βιοοικολογία των ειδών των κουνουπιών και την τοπογραφία των τόπων αναπαραγωγής. Αυτά τα μοντέλα έχουν επίσης λάβει υπόψη την ικανότητα πτήσης και διασποράς των φορέων. Για παράδειγμα, το *Culex modestus* διανύει μικρή απόσταση πτήσης σε ανοιχτούς χώρους, αλλά μπορεί να πετάξει μεγαλύτερες αποστάσεις κατά μήκος διαδρόμων βλάστησης (Pradier et al., 2012a).

#### **2. Μοντέλα με βάση τον πληθυσμό**

Άλλες μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ περιστατικών της νόσου σε ξενιστές (δεξαμενές ή / και παρεμφερείς φορείς, ανθρώπους ή άλογα) και το περιβάλλον, προκειμένου να δημιουργηθούν προγνωστικά μοντέλα για τον κίνδυνο μετάδοσης. Αυτή η προσέγγιση, είναι κυρίως στατιστική, και έχει το πλεονέκτημα ότι απαιτεί λιγότερες πληροφορίες σχετικά με τους πληθυσμούς του φορέα, αλλά το μειονέκτημα της ανάγκης ταυτοποιημένων περιπτώσεων WNV από τα συστήματα επιτήρησης. Επομένως απαιτείται εξωτερική επικύρωση αυτών των μοντέλων (Pradier et al., 2008).

### 3. Μελλοντικές προοπτικές

Ο WNV είναι ένας από τους πιο ευρέως διαδεδομένους αρμποιούς στον κόσμο, που βρίσκεται σε όλες τις ηπείρους εκτός από την Ανταρκτική (Kramer et al., 2008). Η εισβολή τυπικά ακολουθείται από ταχεία υποχώρηση της νόσου (Hayes et al., 2005b), αλλά στη συνέχεια συμβαίνουν περιοδικές επανεμφάνσεις όποτε επαρκείς πληθυσμοί φορέων και ευπαθών πτηνών διασταυρώνονται κάτω από επιτρεπτές κλιματολογικές συνθήκες (Weaver and Reisen, 2010b). Η επανεμφάνιση του ιού του Δυτικού Νείλου το 2012 μετά από αρκετά χρόνια ύφεσης στις Ηνωμένες Πολιτείες υποδηλώνει ότι ο ιός θα συνεχίσει να παράγει απρόβλεπτες τοπικές και περιφερειακές επιδημίες. Αυτές οι επιδημίες σχετίζονται με σημαντική μακροπρόθεσμη και βραχυπρόθεσμη νοσηρότητα από τη νευροδιεισδυτική νόσο του ιού του Δυτικού Νείλου και τον πυρετό του Δυτικού Νείλου, αντίστοιχα.

Επομένως, τα προγράμματα βιώσιμης επιτήρησης και διαχείρισης των φορέων από τις τοπικές Αρχές είναι κρίσιμα, ιδίως σε μητροπολιτικές περιοχές με ιστορικό ιού του Δυτικού Νείλου και μεγάλους ανθρώπινους πληθυσμούς σε κίνδυνο. Τα σχέδια ανταπόκρισης των Αρχών πρέπει να περιλαμβάνουν διατάξεις για την ταχεία εφαρμογή επεμβάσεων καταπολέμησης των κουνουπιών μεγάλης κλίμακας όταν η επιτήρηση δείχνει ότι είναι απαραίτητα τέτοια μέτρα. Η περαιτέρω αξιολόγηση των πληθυσμών στόχων και η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας ενός εμβολίου θα βοηθήσουν στον προσδιορισμό της ανάγκης για συνεχή ανάπτυξη ανθρώπινου εμβολίου (Petersen et al., 2013).

## ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ

Η νόσος του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV) είναι μια σημαντική αναδυόμενη ασθένεια που μεταδίδεται από φορέα, με την επιτήρηση να είναι το κλειδί για την παρακολούθηση περιοχών για τη δραστηριότητα του ιού.

Πτηνά σε αιχμαλωσία καθώς και άγρια πτηνά χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες ως ζωντανό φρουροί σε προγράμματα επιτήρησης αρμυοίων. Οι φρουροί πρέπει να είναι χρήσιμοι τόσο για την ανίχνευση όσο και για την παρακολούθηση της μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου. Για να μειωθούν οι κίνδυνοι από τον WNV, πρέπει να υπάρχουν κατάλληλα προγράμματα επιτήρησης. Η εντομολογική επιτήρηση των πληθυσμών του φορέα μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, αλλά πρέπει να επικεντρωθεί στη συλλογή κυρίως κουνουπιών *Culex spp.*. Ένας συνδυασμός παγίδων ενηλίκων που αναζητούν ξενιστές και παγίδων ωοτοκίας, είναι πιθανό να συλλέξουν επαρκή δεδομένα για να βοηθήσουν την τοπική διαχείριση του κινδύνου από τον WNV (Kilpatrick and Pape, 2013). Η πρώτη ένδειξη της δραστηριότητας του WNV μπορεί να αναγνωριστεί μέσω της οροεπιτήρησης των ζώων-φρουρών, ως μέρος προγραμμάτων επιτήρησης αρμυοίων, από το θάνατο πληθυσμών άγριων πτηνών ή από τον εντοπισμό συμπτωμάτων της νόσου σε άλλα είδη θηλαστικών, ιδιαίτερα στα άλογα (Lanciotti et al., 1999; Komar, 2001a; Frost et al., 2012). Ο έλεγχος της αιμοδοσίας σε ενδημικές περιοχές έχει επίσης αναδειχθεί ως ένα σημαντικό εργαλείο επιτήρησης της λοίμωξης από WNV σε ανθρώπους. Η ετοιμότητα και η ευαισθητοποίηση μεταξύ των τοπικών αρχών είναι κρίσιμης σημασίας, αλλά υπάρχουν συχνά ουσιαστικές διαφορές στην πράξη μεταξύ των περιφερειακών δικαιοδοσιών (Cito et al., 2013).

### 1. Επιτήρηση του WNV στα πλαίσια της Ενιαίας Υγείας

Η ιδέα της Ενιαίας Υγείας αναγνωρίζει ότι η υγεία των ανθρώπων, των ζώων και του περιβάλλοντος είναι όλα συνδεδεμένα και ότι μόνο μια συνεργατική διεπιστημονική προσέγγιση μπορεί να επιτύχει τα βέλτιστα αποτελέσματα για την υγεία (Lerner and Berg, 2015). Ο WNV μεταδίδεται σε ανθρώπους και ζώα κυρίως μέσω της ενίσχυσης του ενζωτικού κύκλου των κουνουπιών - πουλιών που εξαρτάται από κλιματολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η εποχή και η διακυμάνση της στάθμης του νερού (Paz and Semenza, 2013). Ως εκ τούτου, η ενεργός επιτήρηση του WNV σε πληθυσμούς κουνουπιών και πτηνών σε συνδυασμό με την ανάλυση κλιματολογικών και περιβαλλοντικών δεδομένων

προσφέρει την ευκαιρία να ανιχνευθεί ο ιός πριν από την εμφάνιση νόσου σε ιπποειδή ή ανθρώπους και να προβλεφθεί ο χρόνος και οι τοποθεσίες μελλοντικών επιδημιών WNV. Η έγκαιρη ανίχνευση του WNV μπορεί να διευκολύνει τη στοχοθετημένη χρήση εντομοκτόνων στην μολυσμένη περιοχή για να μειώσει το φορτίο του WNV σε πληθυσμούς ανθρώπων και ζώων. Η αναγκαιότητα τέτοιων συστημάτων επιτήρησης εξαρτάται από τον επιπολασμό του WNV και μπορεί να εφαρμοστεί σε ολόκληρη τη χώρα ή να περιοριστεί σε συγκεκριμένη περιοχή με υψηλή ενδημικότητα του WNV (Lustig et al., 2018b).

## **2. Επιτήρηση και παρακολούθηση του WNV στην Ελλάδα**

Μετά την επιδημία του 2010, δημιουργήθηκε ένα στρατηγικό πλαίσιο για ένα ολοκληρωμένο πρόγραμμα εντομολογικής επιτήρησης με στόχο τον έλεγχο των κουνουπιών φορέων, την ανάλυση της σύνθεσης των ειδών κουνουπιών σε περιοχές που πλήττονται από τον WNV καθώς και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κυκλοφορίας του ιού, της γεωγραφικής εξάπλωσης και του κύκλου μετάδοσης του WNV στα κουνούπια (Gomes et al., 2013; Valiakos et al., 2014; Patsoula et al., 2016). Τα τελευταία χρόνια, ξεκίνησαν μελέτες οροεπιπολασμού στους ανθρώπους (Ladbury et al., 2013; Vrioni et al., 2014), στα κοτόπουλα (Chaintoutis et al., 2016a), και στα ιπποειδή (Bouzas et al., 2016) για να εξετάσουν την κινητική του επιπολασμού του WNV σε ζώα και ανθρώπους με την πάροδο του χρόνου. Η ανθρώπινη επιτήρηση περιλαμβάνει εκστρατείες ευαισθητοποίησης των γιατρών, την διερεύνηση των ύποπτων κρουσμάτων μέσα στην περίοδο μετάδοσης και την ενεργή εργαστηριακή επιτήρηση με καθημερινή ανταλλαγή πληροφοριών σχετικά με τις διαγνωσμένες περιπτώσεις μεταξύ του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) και των εργαστηρίων για τον WNV. Όλα τα πιθανά και επιβεβαιωμένα περιστατικά διερευνώνται εντός 24 ωρών από τη διάγνωση από τον ΕΟΔΥ και υπάρχει καθημερινή παρακολούθηση όλων των νοσοκομειακών περιπτώσεων μέχρι το εξιτήριο. Οι εθνικοί και τοπικοί φορείς, συμπεριλαμβανομένων των αρχών για την ασφάλεια του αίματος, λαμβάνουν καθημερινά ενημερώσεις σχετικά με διαγνωσμένα περιστατικά και εβδομαδιαίες εκθέσεις επιτήρησης μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου, οι οποίες διατίθενται επίσης δημόσια στον ιστότοπο του ΕΟΔΥ. Ενημερωτικό υλικό για τη λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου, τα μέτρα προστασίας από τα κουνούπια και τις παρουσιάσεις που έχει δημιουργήσει ο Ε.Ο.Δ.Υ. είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα του (<https://eody.gov.gr>). Οι πληγείσες περιοχές ορίζονται ως περιοχές τρίτου

διοικητικού επιπέδου με τουλάχιστον μία ανθρώπινη περίπτωση. Σύμφωνα με τις οδηγίες ΕΚ 2004/33 (EUR-Lex - 32004L0033 - EN - EUR-Lex) και 2014/110 (EUR-Lex - 32014L0110 - EN - EUR-Lex) και το Ευρωπαϊκό σχέδιο ετοιμότητας για τον WNV και την ασφάλεια του αίματος (Villanueva, 2011), μέτρα ασφαλείας του αίματος έχουν εφαρμοστεί σε πληγείσες περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της εξέτασης αίματος δότη για WNV RNA. Από το 2010, το Συντονιστικό Κέντρο Αιμοεπαγρύπνησης και Επιτήρησης Μεταγγίσεων διεξήγαγε ενεργή επιτήρηση της λοίμωξης από WNV στον πληθυσμό των αιμοδοτών στις πληγείσες περιοχές κατά την περίοδο μετάδοσης από τα μέσα Ιουνίου έως τα μέσα Νοεμβρίου. Όλες οι επιβεβαιωμένες περιπτώσεις λοίμωξης WNV σε αιμοδότες κοινοποιούνται στο Κέντρο Αιμοεπαγρύπνησης. Υπάρχουν συγκεκριμένες διαδικασίες αιμοεπαγρύπνησης: όταν μια περίπτωση λοίμωξης από WNV αναφέρει πρόσφατη μετάγγιση αίματος, γίνεται εντοπισμός και έλεγχος των εμπλεκόμενων δοτών. Επιπλέον, οι αιμοδότες καλούνται να κοινοποιήσουν τυχόν ύποπτα συμπτώματα εντός 15 ημερών μετά τη αιμοδοσία και εάν παρουσιάσουν, πραγματοποιείται εξέταση του αίματος (Gossner et al., 2017). Η συστηματική επιτήρηση για τα σημαντικότερα νοσήματα των ιπποειδών, συμπεριλαμβανομένου του WNF, είχε προηγουμένως εφαρμοστεί στην Ελλάδα (2001-2004), η οποία πραγματοποιήθηκε από τις τοπικές κτηνιατρικές αρχές, υπό τον συντονισμό της κεντρικής κτηνιατρικής υπηρεσίας (Mangana-Vougiouka et al., 2013). Από το 2010, ένα πρόγραμμα επιτήρησης του WNF έχει τεθεί σε εφαρμογή υπό τον συντονισμό του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων σε συνεργασία με τις τοπικές κτηνιατρικές αρχές και τα αρμόδια κρατικά εργαστήρια στα Κτηνιατρικά Κέντρα Αθηνών και Θεσσαλονίκης (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων). Το πρόγραμμα περιλαμβάνει ενεργή ορολογική επιτήρηση των αλόγων-φρουρών, ενεργή κλινική επιτήρηση ιπποειδών γύρω από επιβεβαιωμένα κρούσματα σε ανθρώπους και ζώα, παθητική επιτήρηση του WNF σε ιπποειδή όλο το χρόνο, παθητική επιτήρηση άγριων πτηνών με δειγματοληψία νεκρών ή άρρωστων άγριων πτηνών, και ενεργή επιτήρηση άγριων πτηνών μέσω της σύλληψης και της δειγματοληψίας σε επιλεγμένες περιοχές. Επιπλέον, οι Σχολές Κτηνιατρικής πραγματοποιούν έρευνες για τον WNV σε κατοικίδια και άγρια πτηνά σε διάφορες περιοχές. Από το 2010, ο Ε.Ο.Δ.Υ. μαζί με την Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμια, τοπικές αρχές και εξωτερικούς συνεργάτες διεξήγαγαν ενεργή επιτήρηση φορέων από τον Ιούνιο έως τον Οκτώβριο, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης WNV στα κουνούπια (Patsoula et al., 2016). Το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων και ο



Ε.Ο.Δ.Υ. μοιράζονται τα αποτελέσματα της επιτήρησης ζώων και φορέων με περιφερειακές και τοπικές αρχές δημόσιας υγείας, τοπικές κτηνιατρικές υπηρεσίες, δήμους και τοπικές μονάδες υγείας για περαιτέρω ενημέρωση, πρόληψη και δραστηριότητες επιτήρησης. Υπάρχει μια πολυτομεακή επιτροπή για την πρόληψη και τη διαχείριση τροπικών νοσημάτων (συμπεριλαμβανομένου του WNF) του Υπουργείου Υγείας, και δύο πολυτομεακές ομάδες εργασίας, για νοσήματα που μεταδίδονται από φορέα και για τον προσδιορισμό περιοχών που πλήττονται από αυτά. Έτσι διασφαλίζεται η επικοινωνία μεταξύ κτηνιατρικών και ανθρώπινων υγειονομικών αρχών, εντομολόγων, αρχών ασφάλειας του αίματος, ειδικών μολυσματικών νοσημάτων και άλλων εθνικών παραγόντων (Gossner et al., 2017). Τέλος η Ελλάδα συμμετέχει στο Vector Control Analysis (VeCA), ένα ερευνητικό έργο ελέγχου φορέων που χρηματοδοτείται από το ECDC και στοχεύει να αυξήσει τις γνώσεις μας σχετικά με την οικολογία και τον έλεγχο των φορέων του WNV στην Ευρώπη. Το έργο χρησιμοποιεί δεδομένα πεδίου που συλλέγονται από τρία οικολογικά διαφορετικά περιβάλλοντα μελέτης, αστικός / ημιαστικός, αγροτικός / γεωργικός και φυσικός υγρότοπος σε τέσσερις ευρωπαϊκές χώρες, την Ιταλία, τη Γαλλία, τη Σερβία και την Ελλάδα, που πρόσφατα εμφάνισαν WN (Chaskopoulou et al., 2016).

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ**

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η ορολογική διερεύνηση για ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού του Δυτικού Νείλου σε δεσποζόμενους σκύλους στην Περιφέρεια Αττικής.

Ο σκύλος κατά κανόνα είναι ασυμπτωματικός στη μόλυνση από τον ιό και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμεύσει ως αποτελεσματικό ζώο «φρουρός», δηλαδή η ανίχνευση αντισωμάτων στο ζώο αυτό σε μεγάλο αριθμό σκύλων, προειδοποιεί ότι κατά πάσα πιθανότητα επέρχεται επιδημική έξαρση της νόσου στον άνθρωπο. Η διπλωματική αυτή εργασία έχει σαν στόχο να εκτιμηθεί ο ρόλος των σκύλων ως ζώων «φρουρών» στην μελέτη της επιδημιολογίας του ιού του Δυτικού Νείλου στην Περιφέρεια Αττικής.

### **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **Ζώα και υλικό**

Χρησιμοποιήθηκαν οροί αίματος από 182 δεσποζόμενους σκύλους, αμφοτέρων των φύλων, οι οποίοι προσκομίστηκαν για προληπτικό αιματολογικό έλεγχο μέσα στο πρώτο εξάμηνο του 2019. Οι οροί προέρχονταν από ζώα με κλινική εικόνα εντός των φυσιολογικών ορίων. Όλοι οι σκύλοι προέρχονταν από την Περιφέρεια Αττικής, εξετάστηκαν από ειδικό κτηνίατρο σε ειδικευμένο ιατρείο μικρών ζώων στην Αθήνα. ενώ οι οροί διατηρούνταν σε κατάψυξη μέχρι να εξεταστούν.

Σε κάθε περιστατικό συλλέγονταν 5 mL αίματος και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε 2 φιαλίδια (το ένα περιείχε EDTA για την διενέργεια της γενικής αίματος και το άλλο περιείχε ειδική γέλη για την φυγοκέντρηση και τον διαχωρισμό του ορού του αίματος).

## **Ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού του Δυτικού Νείλου**

Η ορολογική εξέταση των ορών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο Kit το οποίο ανιχνεύει αντισώματα κατά της πρωτεΐνης E του φακέλου του ιού του Δυτικού Νείλου σε ορούς αλόγων και πτηνών, με τη μέθοδο της ανταγωνιστικής ELISA (ID Screen West Nile Competition Multi-species, IDVet, FRANCE). Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, το παραπάνω kit μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των ίδιων αντισωμάτων σε ορό σκύλου και γάτας (Lan et al., 2011).

Το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται στο kit δίνει διασταυρούμενη αντίδραση με άλλους ιούς της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας και την ιογενή κροτωνογενή εγκεφαλίτιδα.

### **2.1. Εκτέλεση της δοκιμής**

Όλα τα αντιδραστήρια αφέθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) πριν την εκτέλεση της δοκιμής και καθορίστηκαν οι θέσεις των μαρτύρων και των δειγμάτων για εξέταση. Σε κάθε βοθρίο της πλάκας ELISA - που ήταν καλυμένο με κεκαθαρμένο εκχύλισμα του ιού του Δυτικού Νείλου - τοποθετούνταν διαδοχικά ίση ποσότητα (50  $\mu\text{l}$ ) ρυθμιστικού διαλύματος (Dilution Buffer), θετικός και αρνητικός μάρτυρας (στα βοθρία C1, B1 και E1 και D1, αντίστοιχα) και τα υπό εξέταση δείγματα. Ακολουθούσε ανακίνηση της πλάκας σε αναδευτήρα για 2 λεπτά και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά. Στη συνέχεια η πλάκα εκπλύνονταν διαδοχικά 3 φορές με διάλυμα έκπλυσης [αραιώνοντας το συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης, wash solution concentrate, με απιονισμένο νερό (10ml σε 190ml νερό)]. Για το σκοπό αυτό κάθε βοθρίο της πλάκας πληρούνταν με 300 $\mu\text{l}$  αραιωμένο διάλυμα έκπλυσης κάθε φορά.

Ακολούθως παρασκευάστηκε σύζευγμα (Conjugate) αραιώνοντας τον συμπυκνωμένο (Concentrated Conjugate) σε αναλογία 1 προς 10 με ρυθμιστικό διάλυμα. Σε όλα τα βοθρία προστέθηκε 100  $\mu\text{l}$  συζεύγματος και οι πλάκες επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολουθούσε ξέπλυμα της πλάκας και πλήρωση των βοθρίων με 100  $\mu\text{l}$  υποστρώματος (substrate) και επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

Η διαδικασία τελείωνε τοποθετώντας 100  $\mu\text{l}$  διαλύματος παύσης (stop solution) σε κάθε βοθρίο. Τέλος, σε ειδικό μηχάνημα (microplate reader) μετρούνταν η οπτική πυκνότητα (O.D) στα 450 nm (Εικ. 1).

## 2.2. Προϋποθέσεις ελέγχου ορθής διαδικασίας / εκτίμησης αποτελέσματος.

Η κατασκευάστρια εταιρεία αναφέρει τις εξής προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για να μπορούν να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα.

- 1) Η μέση οπτική πυκνότητα του Αρνητικού Μάρτυρα να είναι μεγαλύτερη από 0,700.
- 2) Η μέση οπτική πυκνότητα του Θετικού Μάρτυρα να είναι λιγότερη από το 30% της οπτικής πυκνότητας του Αρνητικού Μάρτυρα.



**Εικ. 1:** Sanofi PR2100 PR Microplate Reader

## 2.3. Ηθικά ζητήματα

Στην παρούσα μελέτη δεν υπήρχε θέμα ηθικής και δεοντολογίας, δεδομένου ότι τα δείγματα ορού αίματος που χρησιμοποιήθηκαν πάρθηκαν κατά την προσκόμιση των σκύλων στο κτηνιατρείο στα πλαίσια εξετάσεων ρουτίνας για διαγνωστικούς λόγους.

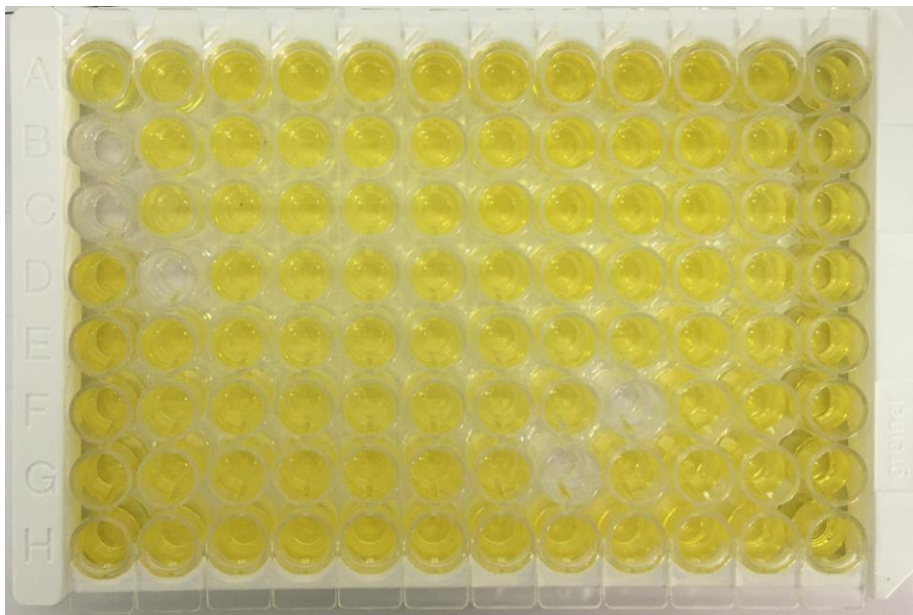
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο χρωματισμός των βοθρίων της πλάκας ELISA εξαρτάται από την παρουσία ή όχι αντισωμάτων στο υπό εξέταση δείγμα: Σε απουσία αντισωμάτων το βοθρίο έχει κίτρινο χρώμα, ενώ όταν υπάρχουν αντισώματα δεν εμφανίζεται χρωματισμός.

Για να υπολογιστεί το αποτέλεσμα διαιρέθηκε η οπτική πυκνότητα του δείγματος με τη μέση οπτική πυκνότητα του Αρνητικού Μάρτυρα και πολλαπλασιάστηκε το αποτέλεσμα με 100. Τα αποτελέσματα που είναι μικρότερα ή ίσα του 40% είναι θετικά. Τα αποτελέσματα ανάμεσα στο 40% και το 50% θεωρούνται αμφίβολα και τα αποτελέσματα που είναι μεγαλύτερα του 50% είναι αρνητικά.

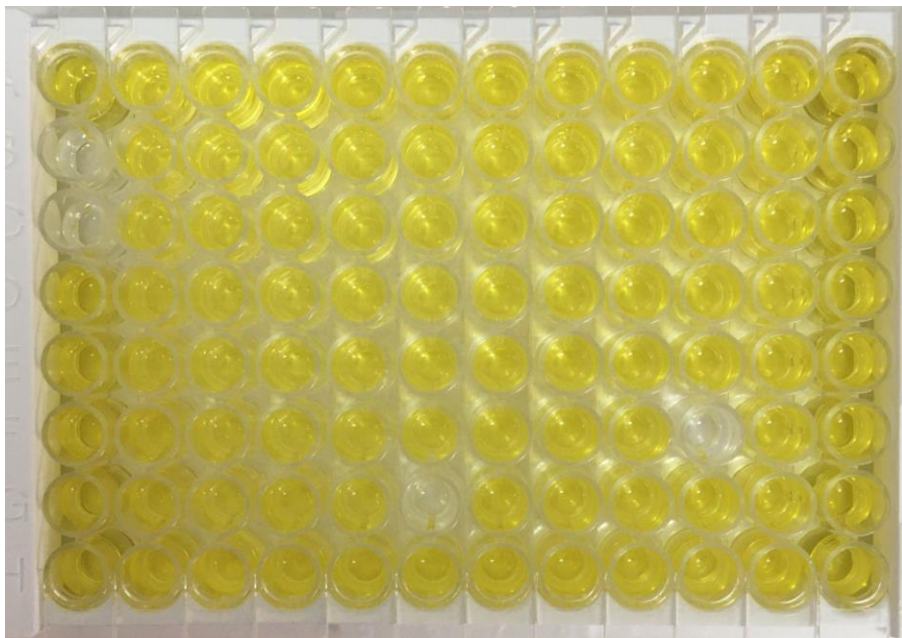
Όπως φαίνεται και από τα νούμερα των απορροφήσεων βρέθηκαν 3 θετικά στην πρώτη πλάκα ELISA (Εικόνα 2) και 2 θετικά στην δεύτερη (Εικόνα 3). Στη πρώτη, τα θετικά βρίσκονται στις θέσεις D2, F9 και G8 με απορροφήσεις 0,077 και 0,057 και 0,057 αντίστοιχα. Στη δεύτερη, τα θετικά βρίσκονται στις θέσεις F10 και G6 με απορροφήσεις 0,094 και 0,054 αντίστοιχα. Οι θετικοί οροί διαχωρίστηκαν από τους υπόλοιπους αρνητικούς ορούς και φυλάχτηκαν για περαιτέρω διερεύνηση. Επομένως, σε σύνολο 182 δειγμάτων, βρέθηκαν 5 θετικά δείγματα.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,185	1,161	1,147	1,075	1,097	1,173	1,172	1,119	1,143	1,314	1,092	0,971
B	0,079	0,982	1,032	0,876	0,981	0,999	1,041	1,111	1,096	1,175	1,018	0,947
C	0,077	0,991	0,842	0,913	0,816	0,896	1,08	1,041	1,021	1,114	0,857	0,904
D	1,105	0,077	0,851	0,792	0,819	0,805	0,908	0,972	0,95	1,078	0,842	0,948
E	1,142	0,977	0,858	0,764	0,812	0,786	0,818	0,827	0,861	1,046	0,862	0,976
F	1,065	0,848	0,883	0,784	0,748	0,764	0,77	0,808	0,057	0,889	1,018	1,051
G	1,081	0,963	0,934	0,893	0,906	0,892	0,871	0,057	0,919	0,991	0,978	1,082
H	1,217	0,986	1,082	1,004	1,064	0,966	0,992	0,989	0,913	1,025	0,937	1,152



**Εικόνα 2:** Θετικά δείγματα στις θέσεις D2, F9 και G8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,983	0,992	0,987	1,039	1,082	0,981	1,015	0,979	1,047	1,092	1,119	1,168
B	0,066	0,96	0,896	0,859	0,923	0,872	0,968	0,973	0,918	1,003	1,035	1,088
C	0,082	0,902	0,898	0,846	0,854	0,826	0,917	0,971	0,992	1,026	1,061	1,152
D	1,051	0,914	0,822	0,726	0,853	0,78	0,853	0,882	0,917	0,94	0,953	1,093
E	1,007	0,954	0,774	0,766	0,837	0,853	0,914	0,907	0,923	0,971	1,02	1,115
F	1,002	0,956	0,784	0,785	0,844	0,887	0,878	0,943	0,885	0,054	1,014	1,138
G	0,984	0,961	0,801	0,923	0,848	0,094	0,967	0,963	0,977	1,06	1,044	1,142
H	0,98	1,029	0,948	0,993	1,017	0,976	1,061	1,075	1,053	0,971	1,168	1,114



**Εικόνα 3:** Θετικά δείγματα στις θέσεις F10 και G6

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ορολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο kit το οποίο ανιχνεύει αντισώματα κατά της πρωτεΐνης E του φακέλου του ιού του Δυτικού Νείλου σε ορούς αλόγων και πτηνών, με τη μέθοδο της ανταγωνιστικής ELISA (ID Screen West Nile Competition Multi-species, IDVet, FRANCE). Το kit παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού του Δυτικού Νείλου (Beck et al., 2017). Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, το παραπάνω kit μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των ίδιων αντισωμάτων σε ορό σκύλου και γάτας (Lan et al., 2011). Με βάση τις πληροφορίες που δίνει ο κατασκευαστής, το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται στο συγκεκριμένο kit παρουσιάζει διασταυρούμενες αντιδράσεις με τους ιούς της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, της εγκεφαλίτιδας του St. Louis και τον ιό της Κροτωνογενούς εγκεφαλίτιδας καθώς και του ιού του Δάγγειου πυρετού. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί με τη διενέργεια αυτής της δοκιμής, να υπάρχουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω του παραπάνω γεγονότος. Η ανίχνευση θετικών δειγμάτων θα έπρεπε να επιβεβαιωθεί περαιτέρω με τη χρήση PRNT με το στέλεχος NY99-4132 του ιού του Δυτικού Νείλου ακολουθώντας τυποποιημένα πρωτόκολλα (Lan et al., 2011). Η διαδικασία της οροεξουδετέρωσης, (plaque-reduction neutralization test-PRNT) ανιχνεύει εξουδετερωτικά αντισώματα και συμβάλει στον προσδιορισμό του φλαβοϊού που είναι υπεύθυνος για τη λοίμωξη αλλά και στον αποκλεισμό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Δεν πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας με τη μέθοδο PRNT, επειδή δεν ήταν διαθέσιμη στο εργαστήριο μας. Όμως, επειδή οι παραπάνω ιοί - τουλάχιστον από τα δεδομένα των επιστημονικών δημοσιεύσεων - δεν φαίνεται επί του παρόντος τουλάχιστον να κυκλοφορούν στην Περιφέρεια της Αττικής (σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με τον ιό του Δυτικού Νείλου) θεωρούμε με κάποια σχετική ασφάλεια ότι η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος ELISA έδωσε θετικά δείγματα μόνο για τη μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου.

Σε σύνολο 182 δειγμάτων της δοκιμής μας, βρέθηκαν 5 θετικά δείγματα. Παρατηρήθηκε δηλαδή χαμηλό ποσοστό οροεπιπολασμού (3%). Το χαμηλό ποσοστό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι όλα τα ζώα ήταν δεσποζόμενα - με παραμονή εντός της οικίας το μεγαλύτερο διάστημα της ημέρας - και επομένως με πολύ μικρή πιθανότητα δήγματος από μολυσμένο κουνούπι. Επίσης η φροντίδα του ιδιοκτήτη και η χρήση εντομοαπωθητικών κολλάρων θα μπορούσε να δικαιολογήσει τον χαμηλό οροεπιπολασμό. Εναλλακτικά, το χαμηλό ποσοστό



μόλυνσης των κουνουπιών στην ευρύτερη περιοχή της Αττικής μπορεί να ερμηνεύσει το αποτέλεσμα. Σε σχετική μελέτη για ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου στα κουνούπια στην Ελλάδα τα έτη 2014-2016 στη Περιφέρεια Αττικής και Νήσων βρέθηκε ότι το ποσοστό των μολυσμένων κουνουπιών ήταν μόλις 4,2% (Patsoula et al., 2020).

Με βάση τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι, παρά το μικρό ποσοστό μόλυνσης των σκύλων, το ζώο αυτό μπορεί να παίζει το ρόλο «φρουρού» για την Αττική (εφόσον καταγράφονται ανάλογα ή μικρότερα ποσοστά μόλυνσης στον άνθρωπο στην ίδια περιοχή).

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε αντίστοιχη μελέτη οροεπιπολασμού σε σκύλους του ιού του Δυτικού Νείλου στην Σαγκάη της Κίνας, όπου το συνολικό ποσοστό των θετικών δειγμάτων ήταν 4,6%. Ανάλογα με το περιβάλλον διαβίωσης των ζώων το ποσοστό ήταν 0,6% σε σκύλους που διέμεναν σε αστικό περιβάλλον, 5,2% σε σκύλους που διέμεναν σε αγροτικό περιβάλλον και 12,8% σε αδέσποτους σκύλους (Lan et al., 2011). Στη μελέτη αυτή τα ELISA θετικά δείγματα, εξετάστηκαν με τη διαδικασία της οροεξουδετέρωσης PRNT και τα αποτελέσματα ήταν σχεδόν σε πλήρη συμφωνία. Οι σκύλοι που διαβιούν σε αγροτικό περιβάλλον και σε μεγαλύτερο βαθμό οι αδέσποτοι σκύλοι, είναι περισσότερο εκτεθειμένοι σε τσιμπήματα κουνουπιών. Επίσης χαμηλό ποσοστό αντισωμάτων (5%) κατά του WNV, παρατηρήθηκε στον ορό των κατοικίδιων σκύλων που εξετάστηκαν, μετά την επιδημία του 1999 στη Νέα Υόρκη. Επιπλέον, μια ορολογική έρευνα σε ανθρώπους που διεξήχθη στο Queens της Νέας Υόρκης, κατά την ίδια περίοδο αποκάλυψε ότι το 3% (σταθμισμένο) των ανθρώπων που εξετάστηκαν ήταν οροθετικοί έναντι του WNV. Όταν συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα, ο οροεπιπολασμός σε σκύλους, από την ίδια περιοχή στο Queens όπου ολοκληρώθηκε ορολογική έρευνα σε ανθρώπους, ήταν 11%. Αυτός ήταν περισσότερο από 4 φορές μεγαλύτερος από αυτόν στον άνθρωπο, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι κατοικίδιοι σκύλοι μπορεί να είναι χρήσιμοι δείκτες φρουρού για τον WNV (Kile et al., 2005).

Αντίθετα, υψηλό ποσοστό αντισωμάτων κατά του WNV, παρατηρήθηκε σε ορολογική έρευνα σε σκύλους που έγινε στις ΗΠΑ μετά τον τυφώνα Κατρίνα. Ο οροεπιπολασμός σε σκύλους στη περιοχή του Κόλπου ήταν 55.9% (218/390). Οι παρατεταμένες βροχές και οι πλημμύρες που συνόδευσαν τον τυφώνα Κατρίνα, και οι υψηλές θερμοκρασίες, διαμόρφωσαν ιδανικές συνθήκες όχι μόνο για τη δημιουργία νέων εστιών πολλαπλασιασμού των κουνουπιών, αλλά και για τον πολλαπλασιασμό του ίδιου του ιού μέσα στα κουνούπια. Πολλά από τα θύματα του τυφώνα Κατρίνα ήταν οι σκύλοι. Τα ζώα αυτά έμειναν χωρίς στέγη και χωρίς τη φροντίδα του

ιδιοκτήτη, εκτεθειμένα στα τσιμπήματα των κουνουπιών. Ομοίως στη Τουρκία σε περιοχή που σταματούν μεταναστευτικά πουλιά, ο οροεπιπολασμός στους σκύλους ήταν επίσης υψηλός (37.7%, 43/114) (Davoust et al., 2014). Ο ιός εισάγεται σε μία περιοχή με μολυσμένα άγρια μεταναστευτικά πτηνά. Το υψηλό ποσοστό οροεπιπολασμού στους σκύλους στη περιοχή αυτή της Τουρκίας πιθανόν οφείλεται στη παρουσία αυξημένου πληθυσμού των πουλιών «δεξαμενών».

Παρατηρείται δηλαδή, ότι η μόλυνση των σκύλων από τον ιό του Δυτικού Νείλου, είναι ανάλογη του πληθυσμού των φορέων και του ικού φορτιού που υπάρχουν στην περιοχή.

Άλλα ζώα που μπορούν χρησιμοποιηθούν ως φρουροί, είναι τα ιπποειδή και τα πτηνά. Προγράμματα επιτήρησης του ιού του WNV στα ιπποειδή και στα πτηνά εφαρμόζονται ήδη σε πολλές χώρες. Σύμφωνα με το γαλλικό δίκτυο για την επιτήρηση των νοσημάτων των ιπποειδών RESPE (<http://www.respe.net/>), τα νευρικά συμπτώματα σε άλογα μπορούν να προσανατολίσουν προς την έγκαιρη ανίχνευση εστιών WNV στη Γαλλία. Η οικοδόμηση ενός ολοκληρωμένου συστήματος επιτήρησης θα ήταν χρήσιμη τόσο για την προστασία των ζώων όσο και του ανθρώπου. Όμως ο εμβολιασμός των αλόγων είναι μειονέκτημα στη περίπτωση αυτή (Faverjon et al., 2017). Σε μελέτη οροεπιπολασμού του WNV σε στρατιωτικά άλογα και σκύλους εργασίας στο Μαρόκο έδειξε θετικότητα 60% και 62%, αντίστοιχα (Durand et al., 2016). Η αυξημένη οροθετικότητα πιθανόν να οφείλεται στη γειτνίαση της χώρας με υποσαχάριες ενδημικές περιοχές καθώς και στις συνθήκες διαβίωσης των ζώων. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι κάτω από παρόμοιες συνθήκες έκθεσης σε τσιμπήματα κουνουπιών, η οροθετικότητα σε σκύλους και άλογα φαίνεται να είναι παρόμοια. Λαμβάνοντας υπόψη τη μικρότερη διάρκεια ζωής των σκύλων σε σχέση με το άλογο, ενδεχομένως ο σκύλος να είναι καταλληλότερη επιλογή για ορολογική παρακολούθηση της κυκλοφορίας WNV, ειδικά σε περιοχές όπου ο εμβολιασμός των ιπποειδών αποκλείει την παθητική επιτήρηση στα άλογα. Τα κοτόπουλα και τα άγρια πτηνά έχουν χρησιμοποιηθεί ως «φρουροί» σε προγράμματα επιτήρησης στις Ηνωμένες Πολιτείες λόγω του ρόλου των πτηνών ως ξενιστή δεξαμενή του ιού. Οι λοιμώξεις από τον ιό του WN στα πουλιά ξενιστές θα πρέπει να εμφανίζονται συχνότερα (και ως εκ τούτου, νωρίτερα) από τα συμβάντα της νόσου σε ανθρώπους και άλογα. Η ελεγχόμενη χρήση των φρουρών προσφέρεται επίσης για την ποσοτική αξιολόγηση των ποσοστών μόλυνσης, τα οποία χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή παρεμβάσεων στη δημόσια υγεία και την υγεία των ζώων. Τα συστήματα επιτήρησης του ιού που βασίζονται σε πτηνά

«φρουρούς» χρησιμοποιούν πτηνά σε αιχμαλωσία ή άγρια πουλιά. Τα νεκρά κοράκια και τα στενά συγγενικά είδη, υπήρξαν χαρακτηριστικό της επιδημίας του ιού στη Βόρεια Αμερική το 1999 και το 2000 και έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως «φρουροί» για την ανίχνευση της τοπικής δραστηριότητας του ιού του WN. Η επιτυχία ενός προγράμματος επιτήρησης της νοσηρότητας/θνησιμότητας των πτηνών για τον ιό WN, εξαρτάται από τη συμμετοχή του κοινού. Τα νεκρά πτηνά ενδέχεται να υποδηλώνουν πρώιμη κυκλοφορία του ιού του WN εβδομάδες πριν από την εμφάνιση περιστατικών της νόσου στον άνθρωπο.

Πτηνά σε αιχμαλωσία (κοτόπουλα), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό. Τα κλουβιά επιτρέπουν την είσοδο και την έξοδο των κουνουπιών, ενώ παρέχουν προστασία από φυσικούς θηρευτές. Η τοποθέτηση κλουβιών με τα κοτόπουλα γίνεται κοντά σε περιοχές αναπαραγωγής κουνουπιών (Komar, 2001b). Κατά τη διάρκεια του 2011-13, το χρονικό διάστημα μεταξύ της πρώτης ανίχνευσης ορομετατροπών σε πουλιά και της εργαστηριακής διάγνωσης των πρώτων περιπτώσεων WNND σε ανθρώπους στην ίδια περιοχή παρέμεινε σχετικά σταθερή (~ 1,5 μήνας) (Chaintoutis et al., 2016b).

Οι σκύλοι φαίνεται να είναι καλύτερη επιλογή «φρουρού» από τα πτηνά, για τη δραστηριότητα του WNV, επειδή τα πτηνά παρουσιάζουν μεγάλη κινητικότητα καλύπτοντας μεγάλες περιοχές, έτσι ώστε ο τόπος θανάτου τους πιθανόν να μη σχετίζεται με τη τοποθεσία της μόλυνσης. Επιπλέον, τα άγρια πουλιά είναι κατά κανόνα ασυμπτωματικοί φορείς του ιού. Η επιτήρηση με σκύλους «φρουρούς» θα ήταν μια χρήσιμη προσθήκη σε αυτήν τη στρατηγική, όχι μόνο για τον εντοπισμό νέων περιοχών γεωγραφικής επέκτασης, αλλά και για την πρόβλεψη κορύφωσης περιστατικών λοίμωξης στον άνθρωπο. Οι ιδανικοί σκύλοι για επιτήρηση θα είναι εκείνοι που περνούν περισσότερο χρόνο σε εξωτερικούς χώρους και δεν τους χορηγείται εντομοαπωθητική αγωγή. Ο σκύλος κατά κανόνα είναι ασυμπτωματικός στη μόλυνση από τον ιό. Ένα ιδανικό είδος φρουρού για επιτήρηση του WNV, θα ήταν ευαίσθητο στη λοίμωξη, θα επιβίωνε από τη μόλυνση, θα ανέπτυσσε εύκολα ανιχνεύσιμα αντισώματα, δεν θα ενείχε κίνδυνο μόλυνσης στους χειριστές και δεν θα ανέπτυσσε αρκετά υψηλό επίπεδο ιαιμίας για να μολύνει κουνούπια φορείς. Οι σκύλοι πληρούν όλες τις ανωτέρω προϋποθέσεις.

Η περίοδος κινδύνου για λοίμωξη από τον WNV στους ανθρώπους ξεκινά στα μέσα Απριλίου και τελειώνει τον Σεπτέμβριο / Οκτώβριο, με τον υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίζεται μεταξύ του Ιουλίου και του Σεπτεμβρίου. Δεδομένης της πιθανότητας ανίχνευσης αντισωμάτων στον ορό των σκύλων έως και έξι εβδομάδες πριν από την εμφάνιση του πρώτου περιστατικού σε

άνθρωπο, θα ήταν χρήσιμο, η δειγματοληψία, να ξεκινά από τις αρχές Μαρτίου (Resnick et al., 2008a; Bowser and Anderson, 2018). Οι σκύλοι έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητοι στη μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου (Resnick et al., 2008b). Έτσι, ενώ θα μπορούσαν να θεωρηθούν φρουροί για λοίμωξη από τον WNV, δεν θεωρούνται δεξαμενή, λόγω βραχυπρόθεσμων και χαμηλών επιπέδων αιμίας (Lan et al., 2011). Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι σκύλοι στην Ιταλία, την Τουρκία, τη Νότια Αφρική και τις ΗΠΑ ήταν οροθετικοί για τον ιό του Δυτικού Νείλου (Lan et al., 2011). Εκτός από τα ορολογικά δεδομένα, οι μολύνσεις από τον ιό σε σκύλους επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με απομόνωση του ιού, ιστοπαθολογικές εξετάσεις και πειραματική λοίμωξη (Buckweitz et al., 2003; Austgen et al., 2004; Read et al., 2005; Cannon et al., 2006). Επιπλέον, η χρησιμοποίηση σκύλων είναι προτιμότερη λόγω της ευκολίας δειγματοληψίας. Ωστόσο, οι σκύλοι που ζουν σε αγροτικό περιβάλλον και οι αδέσποτοι δημιουργούν μια γέφυρα μεταξύ ανθρώπων και άγριων ζώων λειτουργώντας ως πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο. Έτσι, οι σκύλοι μπορεί να λειτουργούν ως φρουροί σε ορισμένες καταστάσεις, αλλά επίσης και ως πηγές μόλυνσης. Σε άλλα περιβάλλοντα, οι σκύλοι μπορεί να ζουν πολύ κοντά στους ιδιοκτήτες τους, συχνά κοιμούνται στο ίδιο δωμάτιο και ταξιδεύουν μαζί, και ως εκ τούτου έχουν κοινή έκθεση σε παράγοντες κινδύνου, έτσι ώστε η υγεία του σκύλου μπορεί να αντικατοπτρίζει εκείνη του ιδιοκτήτη τους. Οι περισσότερες έρευνες για επιτήρηση νοσημάτων μέσω σκύλων «φρουρών» σχετίζονται με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, μετά από αναφορές νεφρικής ανεπάρκειας σε σκύλους, ανακλήθηκαν τροφές για κατοικίδια που περιείχαν γλουτένη σίτου μολυσμένη με μελαμίνη. Το γεγονός αυτό οδήγησε στον εντοπισμό μολυσμένων τροφίμων που προοριζόνταν για ανθρώπινη κατανάλωση (Bowser and Anderson, 2018). Αντίστοιχες μελέτες αναφέρονται στη νόσο του Lyme και τη πανώλη (Resnick et al., 2008a).

Τα αποτελέσματα της ορολογικής μας διερεύνησης για ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού του Δυτικού Νείλου σε δεσποζόμενους σκύλους στην Περιφέρεια Αττικής έδειξαν χαμηλό ποσοστό οροεπιπολασμού (3%). Το αντίστοιχο διάστημα, δηλαδή από την αρχή της περιόδου 2019, μέχρι τις 04/07/2019 (12.00μ.μ.), σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (Ε.Ο.Δ.Υ.) δεν είχαν καταγραφεί κρούσματα λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους στην Ελλάδα (Εβδομαδιαίες εκθέσεις). Τα πρώτα κρούσματα αναφέρθηκαν την 29 εβδομάδα (15 έως 21 Ιουλίου) (West Nile virus infections in humans in the EU/EEA Member States and EU neighbouring countries, 2019 transmission season, 2019). Το πρώτο κρούσμα σε

άνθρωπο στην Περιφερειακή Ενότητα Ανατολικής Αττικής αναφέρθηκε στις 22 Ιουλίου 2019 (συνολικά 23 κρούσματα σε ανθρώπους και 3 σε ιπποειδή). Στη Περιφερειακή Ενότητα Κεντρικού Τομέα Αθηνών το πρώτο και μοναδικό κρούσμα σε άνθρωπο αναφέρθηκε στις 7 Οκτωβρίου 2019. Ομοίως στη Περιφερειακή Ενότητα Βόρειου Τομέα Αθηνών το πρώτο και μοναδικό κρούσμα σε άνθρωπο αναφέρθηκε στις 4 Νοέμβριου 2019 (Transmission of West Nile virus, July to December 2019 – Table of cases, 2019 transmission season, 2019).

Κατά την εφαρμογή του προγράμματος επιτήρησης του ιού του Πυρετού του Δυτικού Νείλου (WNF), στα ιπποειδή και στα άγρια πτηνά, από 01/01/2019 έως 31/12/2019, σύμφωνα με το Animal Disease Information System (ADIS) όπου καταγράφονται νόσοι που υπόκεινται σε κοινοποίηση σε επίπεδο Ένωσης, αναφέρθηκαν στην Ελλάδα 21 επιβεβαιωμένα κρούσματα σε ιπποειδή (Περιφερειακές Ενότητες: Ξάνθης, Σερρών, Θεσσαλονίκης, Ημαθίας, Λάρισας, Καρδίτσας, Τρικάλων, Ανατολικής Αττικής, Αργολίδας και Αρκαδίας), και 1 επιβεβαιωμένο κρούσμα σε άγρια πτηνά (Π.Ε. Ξάνθης) (West Nile virus outbreaks among humans and animals in the European Union, 2019 transmission season, 2019).

Αυτή η έρευνα, ωστόσο, υπόκειται σε διάφορους περιορισμούς. Δεν ήταν διαθέσιμα στοιχεία των σκύλων όπως φυλή, ηλικία, διεύθυνση κατοικίας των ιδιοκτητών, διαβίωση εντός ή εκτός της οικίας, χρήση εντομοαπωθητικών φαρμάκων. Τα στοιχεία αυτά θα παρείχαν ενδεχομένως πληροφορίες για προδιάθεση σε ορισμένες φυλές, ηλικίες καθώς και για την γεωγραφική κατανομή των μολυσμένων ζώων. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτείται μεγάλης έκτασης λεπτομερής επιδημιολογική μελέτη.

Η διεξαγωγή ορολογικής διερεύνησης σε σκύλους, σε μια περιοχή όπου ο ιός του WN μπορεί να απαιτεί επιτήρηση, θα παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με ζητήματα σκοπιμότητας, καθώς και για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκθεσης στην περιοχή. Αυτά τα δεδομένα, καθώς και εκείνα για τη θνησιμότητα των πτηνών και το ποσοστό μόλυνσης των κουνουπιών, θα κατευθύνουν επίσης τον ορισμό τοποθεσιών επιτήρησης ζώων «φρουρών», οι οποίες ιδανικά θα βρίσκονται σε εστίες μετάδοσης του WNV. Άλλα δεδομένα που πρέπει να ληφθούν υπόψη, είναι οι τοποθεσίες αναπαραγωγής κουνουπιών φορέων και η εγγύτητα πληθυσμών ανθρώπων και ζώων. Οι περιοχές επιτήρησης των σκύλων, θα μπορούσε να περιορίζονται σε εκείνες όπου τα άγρια πτηνά μπορούν να συλληφθούν εύκολα.

Προηγούμενες πανδημίες υπογραμμίζουν την αυξανόμενη απειλή των αρμποϊών που προκαλούν ζωοανθρωπονόσους, ειδικά εκείνων που είναι σε θέση να εισέλθουν σε

ανθρώπινους, αστικούς κύκλους μετάδοσης που μεταδίδονται από το *Aedes aegypti* και άλλα *Aedes (Stegomyia) spp.* κουνούπια (Weaver, 2018). Η νόσος του Δυτικού Νείλου πιθανότατα θα συνεχίσει να αποτελεί πρόβλημα δημόσιας υγείας, επειδή ο ιός έχει την πιο διαδεδομένη γεωγραφική κατανομή και το μεγαλύτερο εύρος φορέων και ξενιστών από όλους τους φλαβοϊούς που μεταδίδονται από τα κουνούπια (Weissenböck et al., 2010). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας καθώς και ειδικοί στην Ευρώπη ζητούν μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση σχετικά με τη μόλυνση από WNV, καθώς ο αριθμός των περιστατικών αυξάνεται λόγω δημογραφικών, περιβαλλοντικών και κοινωνικών παραγόντων (Vonesch et al., 2019). Η ανίχνευση του WNV σε ζώα κατά κανόνα προηγείται εκείνης στον άνθρωπο. Επομένως, ένα σύστημα επιτήρησης για την ανίχνευση της κυκλοφορίας του ιού στο σκύλο, θα βοηθήσει στην έγκαιρη προειδοποίηση των κτηνιατρικών και υγειονομικών αρχών. Η πιθανότητα μόλυνσης είναι πολύ μεγαλύτερη σε αγροτικές και ημιαστικές περιοχές από ότι στις πόλεις. Δεν πρέπει όμως να παραγνωρίζεται ότι ο μεγαλύτερος πληθυσμός των πόλεων – παρότι ο κίνδυνος είναι μικρότερος εκεί – είναι δυνατό να οδηγήσει σε υπολογίσιμο αριθμό ατόμων που μπορεί να μολυνθούν.

Η ανίχνευση χαμηλού ποσοστού κυκλοφορίας του WNV σε σκύλους στην Περιφέρεια Αττικής δεν σημαίνει απαραίτητα ότι θα ακολουθήσει έξαρση του νοσήματος στον άνθρωπο. Το σύστημα επιτήρησης επιτρέπει μακροπρόθεσμες παρατηρήσεις χαμηλού κόστους. Η συγκριτική ανάλυση των δεδομένων που θα λαμβάνονται κατά τη διάρκεια διαδοχικών ετών μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις τάσεις αύξησης ή μείωσης της κυκλοφορίας του ιού, την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων καταπολέμησης των κουνουπιών και εκτιμήσεις για την πιθανή μελλοντική εμφάνιση ανθρώπινων κρουσμάτων στην περιοχή.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αυτή είναι η πρώτη έρευνα που πραγματοποιείται σχετικά με τον οροεπιπολασμό του WNV σε σκύλους στην Ελλάδα. Η μελέτη επιβεβαίωσε την ύπαρξη αντισωμάτων κατά του WNV σε ορούς σκύλων στην Περιφέρεια Αττικής και την γύρω περιοχή πριν ακόμα εμφανιστούν τα πρώτα κρούσματα σε ανθρώπους στην περιοχή αυτή. Τα ευρήματά της ενισχύουν την άποψη για τη χρησιμότητα των σκύλων ως «φρουρών» για την επιτήρηση του WNV στη Περιφέρεια Αττικής. Παρέχουν αποδείξεις ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ένα σύστημα επιτήρησης σχετικά με τη μετάδοση του WNV σε θηλαστικά στην περιοχή, καθώς και για τον κίνδυνο μετάδοσης της νόσου στον άνθρωπο. Οι σκύλοι έχουν συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με άλλα ζώα που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα στα συστήματα επιτήρησης. Ζώντας δίπλα στον άνθρωπο, εντός της κατοικίας, μοιραζόμενοι κοινό περιβάλλον και συνήθειες, θα μπορούσαν να είναι ιδανικός φρουρός για την επιτήρηση του ιού του Δυτικού Νείλου. Είναι εύκολα προσβάσιμοι ορολογικοί δείκτες και η διεξαγωγή αυτής της επιτήρησης είναι σχετικά απλή στην εκτέλεση. Η χρήση σκυλιών φρουρών μπορεί επίσης να δώσει λύση σε δημοσιονομικούς περιορισμούς στις επιλογές των προγραμμάτων επιτήρησης. Ιδιαίτερη σημασία θα είχαν οι σκύλοι φρουροί σε αστικές και ημιαστικές περιοχές.

Η ενεργητική ορολογική επιτήρηση μπορεί να περιλαμβάνει δειγματοληψίες αίματος σκύλων-φρουρών, στρατηγικά τοποθετημένων σε προκαθορισμένες περιοχές και κατά ορισμένα χρονικά διαστήματα. Θετικό εργαστηριακό αποτέλεσμα από σκύλο-φρουρό που σε αμέσως προηγούμενη αιμοληψία ήταν αρνητικό (ορομετατροπή), υποδηλώνει πρόσφατη κυκλοφορία του ιού στην περιοχή και μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση της νόσου στη περιοχή πριν εμφανιστούν κλινικά κρούσματα σε ανθρώπους. Σε περίπτωση ορομετατροπής ή ανίχνευσης πρόσφατων αντισωμάτων σε ένα ή περισσότερους σκύλους-φρουρούς, αυτοί θα πρέπει να αντικατασταθούν κατά την επόμενη δειγματοληψία (εφόσον προβλέπεται για τη συγκεκριμένη περιοχή) από ίσο αριθμό νέων σκύλων-φρουρών που ζουν εντός της ίδιας περιοχής. Στους σκύλους-φρουρούς από τους οποίους θα ληφθούν δείγματα, θα πρέπει να μην έχει γίνει χρήση εντομοκτόνων ή εντομοαπωθητικών ή, αν έχει γίνει τέτοια χρήση, η δράση των σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν να έχει παρέλθει (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή). Να προτιμώνται σκύλοι-φρουροί που δεν παραμένουν συνεχώς εντός της οικίας, αλλά κυκλοφορούν και στην ύπαιθρο (αυξημένες πιθανότητες έκθεσης στα κουνούπια φορείς άρα και στον ιό). Τα σημεία που θα επιλεγούν για δειγματοληψία, σε κάθε περιοχή, να έχουν όσο

το δυνατόν μεγαλύτερη διασπορά εντός αυτής (ομοιόμορφη γεωγραφική κατανομή). Η καταγραφή σκύλων πρόσφατα μολυνθέντων από τον ιό του Δυτικού Νείλου υποδηλώνει την κυκλοφορία του ιού στην περιοχή αυτή.

Η δειγματοληψία σε σκύλους για τον προσδιορισμό της συχνότητας μόλυνσης από WNV πιθανόν παρέχει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της ιικής δραστηριότητας. Πιστεύουμε ότι η εφαρμογή αυτού του συστήματος επιτήρησης θα μπορούσε να συμπληρώσει άλλες δραστηριότητες επιτήρησης του WNV και ίσως να είναι απλούστερη και λιγότερο δαπανηρή σε περιοχές όπου οι πόροι είναι περιορισμένοι για τη διεξαγωγή επιτήρησης κουνουπιών και πτηνών. Τα Περιφερειακά Τμήματα Υγείας ή άλλοι φορείς που είναι υπεύθυνοι για την τοπική επιτήρηση του WNV μπορούν να θεωρήσουν αυτό το εργαλείο ως πιθανή προσθήκη στις τρέχουσες προσπάθειές τους για επιτήρηση.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της επιτήρησης, καθώς και κάθε άλλο διαθέσιμο σχετικό στοιχείο, οι αρμόδιες αρχές για την επιτήρηση του ιού του WN, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, μπορούν να εκτιμήσουν τη γεωγραφική έκταση της επιδημίας, ενώ έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόσουν ανάλογα, τα υφιστάμενα μέτρα ελέγχου, επιτήρησης και πρόληψης της νόσου, για τη διασφάλιση της Δημόσιας Υγείας και της Υγείας των Ζώων.

Δύναται να πραγματοποιηθεί περαιτέρω εξέταση των θετικών ορών της δοκιμής μας, με real time PCR για απομόνωση γενετικού υλικού του ιού και την ταξινόμηση αυτού σε εξελικτική ομάδα καθώς και την πιθανή σύνδεση του με λοιμώξεις σε ανθρώπους. Είναι δυνατόν επίσης να διερευνηθεί η συσχέτιση του οροεπιπολασμού των ζώων που διαβιούν στην περιοχή της Περιφέρειας Αττικής με την οροεπιπολαστικότητα του WNV σε ανθρώπους στην ίδια περιοχή. Ο οροεπιπολασμός σε κατοικίδια ζώα σε σχέση με εκείνο στον άνθρωπο μπορεί να συσχετιστεί με διαφορετικές μεταβλητές έκθεσης, συμπεριλαμβανομένων των προτιμήσεων σίτισης των μολυσμένων κουνουπιών και της ευαισθησίας και κατανομής του φορέα ξενιστή. Ωστόσο, αυτή σκοπεύει να είναι μια πιλοτική μελέτη στον τομέα, κατάλληλη για πιο λεπτομερή έρευνα στο μέλλον.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

- A P, K D, A A, M D, T P (2011) Persistence of West Nile virus immunoglobulin M antibodies, Greece. *J Med Virol* 83(10): 1857–1860.
- Agrawal AG, Petersen LR (2003) Human immunoglobulin as a treatment for West Nile virus infection. *J Infect Dis* 188(1): 1–4.
- Aliota MT, Jones SA, Ii APD, Ciota AT, Hubalek Z, Kramer LD (2012) Characterization of Rabensburg Virus, a Flavivirus Closely Related to West Nile Virus of the Japanese Encephalitis Antigenic Group. *PLOS ONE* 7(6): e39387.
- Allan BF, Langerhans RB, Ryberg WA, Landesman WJ, Griffin NW, Katz RS, Oberle BJ, Schutzenhofer MR, Smyth KN, St Maurice A de, Clark L, Crooks KR, et al. (2009) Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. *Oecologia* 158(4): 699–708.
- Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Tirrell S, Wakem EM, French RA, Garmendia AE, Van Kruiningen HJ (1999) Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. *Science* 286(5448): 2331–2333.
- Anderson JF, Rahal JJ (2002) Efficacy of Interferon  $\alpha$ -2b and Ribavirin against West Nile Virus In Vitro. *Emerg Infect Dis* 8(1): 107–108.
- Andreadis TG (2012) The contribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes to transmission and persistence of West Nile virus in North America. *J Am Mosq Control Assoc* 28(4 Suppl): 137–151.
- Annual Epidemiological Report 2013 [2011 data] (2013) European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/annual-epidemiological-report-2013-2011-data>. Accessed July 21, 2020.
- Austgen LE, Bowen RA, Bunning ML, Davis BS, Mitchell CJ, Chang G-JJ (2004) Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerg Infect Dis* 10(1): 82–88.
- Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, Monchetti A, Tavio M, Gobbo RD, Capobianchi MR, Menzo S, Nicoletti L, Magurano F, Varaldo PE (2011) Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Eurosurveillance* 16(43): 20002.
- Baharuddin A, Hassan AA, Sheng GC, Nasir SB, Othman S, Yusof R, Othman R, Rahman NA (2014) Current approaches in antiviral drug discovery against the Flaviviridae family. *Curr Pharm Des* 20(21): 3428–3444.
- Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N (2005) Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 11(2): 225–231.
- Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N (2006) Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging Infect Dis* 12(4): 618–623.

- Balakrishnan A, Butte DK, Jadhav SM (2013) Complete Genome Sequence of West Nile Virus Isolated from Alappuzha District, Kerala, India. *Genome Announc* 1(3).
- Balenghien T, Fouque F, Sabatier P, Bicout DJ (2006) Horse-, Bird-, and Human-Seeking Behavior and Seasonal Abundance of Mosquitoes in a West Nile Virus Focus of Southern France. *J Med Entomol* 43(5): 936–946.
- Balenghien T, Vazeille M, Grandadam M, Schaffner F, Zeller H, Reiter P, Sabatier P, Fouque F, Bicout DJ (2008) Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8(5): 589–595.
- Banet-Noach Ca, Simanov L, Malkinson M (2003) Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathology* 32(5): 489–494.
- Baqar S, Hayes CG, Murphy JR, Watts DM (1993) Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 48(6): 757–762.
- Barzon L, Pacenti M, Cusinato R, Cattai M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Bressan S, Squarzon L, Cattelan A, Pellizzer G, Scotton P, et al. (2011) Human cases of West Nile Virus Infection in north-eastern Italy, 15 June to 15 November 2010. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 16.
- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, Cusinato R, Palù G (2013a) Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis* 208(7): 1086–1092.
- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Sinigaglia A, Ulbert S, Cusinato R, Palù G (2014) Isolation of West Nile Virus from Urine Samples of Patients with Acute Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 52(9): 3411–3413.
- Barzon L, Pacenti M, Palù G (2013b) West Nile virus and kidney disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11(5): 479–487.
- Barzon L, Pacenti M, Palù G (2013c) West Nile virus and kidney disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11(5): 479–487.
- Barzon L, Pacenti M, Ulbert S, Palù G (2015) Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13(3): 327–342.
- Barzon L, Papa A, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Squarzon L, Masi G, Martello T, Testa T, Cusinato R, Palù G (2013d) Genome Sequencing of West Nile Virus from Human Cases in Greece, 2012. *Viruses* 5(9): 2311–2319.
- Beasley DWC (2011) Vaccines and immunotherapeutics for the prevention and treatment of infections with West Nile virus. *Immunotherapy* 3(2): 269–285.
- Beasley DWC, Barrett ADT, Tesh RB (2013) Resurgence of West Nile neurologic disease in the United States in 2012: what happened? What needs to be done? *Antiviral Res* 99(1): 1–5.

- Beasley DWC, Davis CT, Whiteman M, Granwehr B, Kinney RM, Barrett ADT (2004) Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America. *Arch Virol Suppl* (18): 35–41.
- Beasley DWC, Li L, Suderman MT, Barrett ADT (2001) West Nile Virus Strains Differ in Mouse Neurovirulence and Binding to Mouse or Human Brain Membrane Receptor Preparations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 951(1): 332–335.
- Beck C, Lowenski S, Durand B, Bahuon C, Zientara S, Lecollinet S (2017) Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 11(9): e0005936.
- Ben-Nathan D, Gershoni-Yahalom O, Samina I, Khinich Y, Nur I, Laub O, Gottreich A, Simanov M, Porgador A, Rager-Zisman B, Orr N (2009) Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection. *BMC Infect Dis* 9: 18.
- Bernkopf H, Levine S, Nerson R (1953) Isolation of West Nile virus in Israel. *J Infect Dis* 93(3): 207–218.
- Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, Malkinson M, Weiss L, Duvdevani P, Banet C, Weisman Y, Annis E, Gandaku D, Yahalom V, Hindyieh M, et al. (2001a) West Nile fever in Israel 1999-2000: from geese to humans. *Ann N Y Acad Sci* 951: 127–142.
- Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, Malkinson M, Weiss L, Duvdevani P, Banet C, Weisman Y, Annis E, Gandaku D, Yahalom V, Hindyieh M, et al. (2001b) West Nile fever in Israel 1999-2000: from geese to humans. *Ann N Y Acad Sci* 951: 127–142.
- Bode AV, Sejvar JJ, Pape WJ, Campbell GL, Marfin AA (2006) West Nile virus disease: a descriptive study of 228 patients hospitalized in a 4-county region of Colorado in 2003. *Clin Infect Dis* 42(9): 1234–1240.
- Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA (2007) West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol* 88(Pt 3): 875–884.
- Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(12): 975–990.
- Bouzalas IG, Diakakis N, Chaintoutis SC, Brellou GD, Papanastassopoulou M, Danis K, Vlemmas I, Seuberlich T, Dovas CI (2016) Emergence of Equine West Nile Encephalitis in Central Macedonia, Greece, 2010. *Transbound Emerg Dis* 63(6): e219–e227.
- Bowser NH, Anderson NE (2018) Dogs (*Canis familiaris*) as Sentinels for Human Infectious Disease and Application to Canadian Populations: A Systematic Review. *Vet Sci* 5(4).
- Brassard DL, Grace MJ, Bordens RW (2002) Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol* 71(4): 565–581.
- Buckweitz S, Kleiboeker S, Marioni-Henry K, Ramos-Vara J, Rottinghaus A, Schwabenton B, Johnson G (2003) Serological, Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, and Immunohistochemical Detection of West Nile Virus in a Clinically Affected Dog. *Journal of veterinary diagnostic*

investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 15: 324–9.

Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, Matud JL, Prince HE, Lanciotti RS, Wright DJ, Linnen JM, Caglioti S (2008) Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J Infect Dis* 198(7): 984–993.

Busch MP, Wright DJ, Custer B, Tobler LH, Stramer SL, Kleinman SH, Prince HE, Bianco C, Foster G, Petersen LR, Nemo G, Glynn SA (2006) West Nile virus infections projected from blood donor screening data, United States, 2003. *Emerging Infect Dis* 12(3): 395–402.

Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, Lelli R (2010a) Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin. *Open Virol J* 4: 29–37.

Calistri P, Giovannini A, Savini G, Monaco F, Bonfanti L, Ceolin C, Terregino C, Tamba M, Cordioli P, Lelli R (2010b) West Nile virus transmission in 2008 in north-eastern Italy. *Zoonoses Public Health* 57(3): 211–219.

Calvaruso V, Craxì A (2012) 2011 European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines. *Liver International* 32(s1): 2–8.

Cannon AiB, Luff JA, Brault AC, MacLachlan NJ, Case JB, Green ENG, Sykes JE (2006) Acute Encephalitis, Polyarthritits, and Myocarditis Associated with West Nile Virus Infection in a Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20(5): 1219–1223.

Carney RM, Ahearn SC, McConchie A, Glaser C, Jean C, Barker C, Park B, Padgett K, Parker E, Aquino E, Kramer V (2011) Early Warning System for West Nile Virus Risk Areas, California, USA. *Emerg Infect Dis* 17(8): 1445–1454.

Carson PJ, Borchardt SM, Custer B, Prince HE, Dunn-Williams J, Winkelman V, Tobler L, Biggerstaff BJ, Lanciotti R, Petersen LR, Busch MP (2012) Neuroinvasive Disease and West Nile Virus Infection, North Dakota, USA, 1999–2008. *Emerg Infect Dis* 18(4): 684–686.

Casadellà M, Paredes R (2017) Deep sequencing for HIV-1 clinical management. *Virus Research* 239: 69–81.

Castro-Jorge LA de, Siconelli MJL, Ribeiro BDS, Moraes FM de, Moraes JB de, Agostinho MR, Klein TM, Floriano VG, Fonseca BAL da (2019) West Nile virus infections are here! Are we prepared to face another flavivirus epidemic? *Rev Soc Bras Med Trop* 52: e20190089.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002a) Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding--Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51(39): 877–878.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002b) Laboratory-acquired West Nile virus infections--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51(50): 1133–1135.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2004) Possible dialysis-related west nile virus transmission--Georgia, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53(32): 738–739.

Chaintoutis SC, Gewehr S, Mourelatos S, Dovas CI (2016a) Serological monitoring of backyard chickens in Central Macedonia-Greece can detect low transmission of West Nile virus in the absence of human neuroinvasive disease cases. *Acta Trop* 163: 26–31.

Chaintoutis SC, Gewehr S, Mourelatos S, Dovas CI (2016b) Serological monitoring of backyard chickens in Central Macedonia-Greece can detect low transmission of West Nile virus in the absence of human neuroinvasive disease cases. *Acta Trop* 163: 26–31.

Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M (2015) The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int* 2015: 376230.

Chaskopoulou A, Dovas CI, Chaintoutis SC, Bouzalas I, Ara G, Papanastassopoulou M (2011) Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Eurosurveillance* 16(31): 19933.

Chaskopoulou A, Dovas CI, Chaintoutis SC, Kashefi J, Koehler P, Papanastassopoulou M (2013) Detection and early warning of West Nile Virus circulation in Central Macedonia, Greece, using sentinel chickens and mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13(10): 723–732.

Chaskopoulou A, L'Ambert G, Petric D, Bellini R, Zgomba M, Groen TA, Marrama L, Bicout DJ (2016) Ecology of West Nile virus across four European countries: review of weather profiles, vector population dynamics and vector control response. *Parasit Vectors* 9(1): 482.

Chevalier V, Tran A, Durand B (2014) Predictive Modeling of West Nile Virus Transmission Risk in the Mediterranean Basin: How Far from Landing? *Int J Environ Res Public Health* 11(1): 67–90.

Chowers MY, Lang R, Nassar F, Ben-David D, Giladi M, Rubinshtein E, Itzhaki A, Mishal J, Siegman-Igra Y, Kitzes R, Pick N, Landau Z, et al. (2001) Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis* 7(4): 675–678.

Cito F, Narcisi V, Danzetta ML, Iannetti S, Sabatino DD, Bruno R, Carvelli A, Atzeni M, Sauro F, Calistri P (2013) Analysis of surveillance systems in place in European Mediterranean countries for West Nile virus (WNV) and Rift Valley fever (RVF). *Transbound Emerg Dis* 60 Suppl 2: 40–44.

Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E (2012) West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clin Microbiol Rev* 25(4): 635–648.

Cornel AJ, Jupp PG, Blackburn NK (1993) Environmental temperature on the vector competence of *Culex univittatus* (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 30(2): 449–456.

Costa AN, Capobianchi MR, Ippolito G, Palù G, Barzon L, Piccolo G, Andretta B, Filippetti M, Fehily D, Lombardini L, Grossi P (2011) West Nile virus: the Italian national transplant network reaction to an alert in the north-eastern region, Italy 2011. *Eurosurveillance* 16(41): 19991.

Currenti L, Tasca P, Díaz M del P, Contigiani M, Spinsanti L (2020) Serological survey for Saint Louis encephalitis virus and West Nile virus in domestic mammals in Córdoba, Argentina: are our pets potential sentinels? *Arch Virol* 165(9): 2079–2082.

Currier M, McNeill M, Campbell D, Newton N, Marr J, Perry E, Berg SW, Barr D, Lubner GE, Kieszak S, Rogers H, Backer LC, et al. (2005) Human Exposure to Mosquito-Control Pesticides—Mississippi, North Carolina, and Virginia, 2002 and 2003. *Journal of the American Medical Association* 294: 419–421.

Danis K, Papa A, Papanikolaou E, Dougas G, Terzaki I, Baka A, Vrioni G, Kapsimali V, Tsakris A, Kansouzidou A, Tsioudras S, Vakalis N, et al. (2011a) Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Euro Surveill* 16(34).

Danis K, Papa A, Theocharopoulos G, Dougas G, Athanasiou M, Detsis M, Baka A, Lytras T, Mellou K, Bonovas S, Panagiotopoulos T (2011b) Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerging Infect Dis* 17(10): 1868–1872.

Davoust B, Leparç-Goffart I, Demoncheaux J-P, Tine R, Diarra M, Trombini G, Mediannikov O, Marié J-L (2014) Serologic surveillance for West Nile virus in dogs, Africa. *Emerging Infect Dis* 20(8): 1415–1417.

Day JF, Shaman J (2011) Mosquito-Borne Arboviral Surveillance and the Prediction of Disease Outbreaks. *Flavivirus Encephalitis*.

De Filette M, Ulbert S, Diamond M, Sanders NN (2012) Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res* 43: 16.

De Madrid AT, Porterfield JS (1974) The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J Gen Virol* 23(1): 91–96.

Debboun M, Strickman D (2013) Insect repellents and associated personal protection for a reduction in human disease. *Med Vet Entomol* 27(1): 1–9.

Del Giudice P, Schuffenecker I, Vandebos F, Counillon E, Zeller H (2004) Human West Nile Virus, France. *Emerg Infect Dis* 10(10): 1885–1886.

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

Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, Kooistra-Smid AMD, Raangs EC, Rosema S, Veloo ACM, Zhou K, Friedrich AW, et al. (2017) Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol* 243: 16–24.

Diamond MS (2005) Development of effective therapies against West Nile virus infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 3(6): 931–944.

Diamond MS (2009) Progress on the Development of Therapeutics against West Nile Virus. *Antiviral Res* 83(3): 214–227.

Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M (2003a) Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol* 16(3): 259–278.

Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M (2003b) Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol* 16(3): 259–278.

Dohm DJ, O'Guinn ML, Turell MJ (2002a) Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J Med Entomol* 39(1): 221–225.

Dohm DJ, Sardelis MR, Turell MJ (2002b) Experimental vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 39(4): 640–644.

Duprey Z, Rivers S, Lubber G, Becker A, Blackmore C, Barr D, Weerasekera G, Kieszak S, Flanders WD, Rubin C (2008) Community aerial mosquito control and naled exposure. *J Am Mosq Control Assoc* 24(1): 42–46.

Durand B, Dauphin G, Zeller H, Labie J, Schuffenecker I, Murri S, Moutou F, Zientara S (2005) Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet Rec* 157(22): 711–713.

Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachery N, Beck C, Lecollinet S (2016) Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology and Infection* 1: 1–8.

Durbin AP, Wright PF, Cox A, Kagucia W, Elwood D, Henderson S, Wanionek K, Speicher J, Whitehead SS, Pletnev AG (2013) The live attenuated chimeric vaccine rWN/DEN4Δ30 is well-tolerated and immunogenic in healthy flavivirus-naïve adult volunteers. *Vaccine* 31(48).

El Garch H, Minke JM, Rehder J, Richard S, Edlund Toulemonde C, Dinic S, Andreoni C, Audonnet JC, Nordgren R, Juillard V (2008) A West Nile virus (WNV) recombinant canarypox virus vaccine elicits WNV-specific neutralizing antibodies and cell-mediated immune responses in the horse. *Vet Immunol Immunopathol* 123(3–4): 230–239.

Engler O, Savini G, Papa A, Figuerola J, Groschup MH, Kampen H, Medlock J, Vaux A, Wilson AJ, Werner D, Jöst H, Goffredo M, et al. (2013) European Surveillance for West Nile Virus in Mosquito Populations. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(10): 4869–4895.

Epstein PR (2001) West Nile virus and the climate. *J Urban Health* 78(2): 367–371.

Eritja R, Palmer JRB, Roiz D, Sanpera-Calbet I, Bartumeus F (2017) Direct Evidence of Adult *Aedes albopictus* Dispersal by Car. *Sci Rep* 7(1): 14399.

EUR-Lex - 32004L0033 - EN - EUR-Lex <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/NIM/?uri=CELEX%3A32004L0033>. Accessed August 15, 2020.

EUR-Lex - 32014L0110 - EN - EUR-Lex <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32014L0110>. Accessed August 15, 2020.

Factsheet about West Nile virus infection European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/facts/factsheet-about-west-nile-fever>. Accessed July 22, 2020.

Farajollahi A, Crans WJ, Nickerson D, Bryant P, Wolf B, Glaser A, Andreadis TG (2005) Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *J Am Mosq Control Assoc* 21(4): 474–476.

Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM (2011) “BIRD BITING” MOSQUITOES AND HUMAN DISEASE: A REVIEW OF THE ROLE OF CULEX PIPIENS COMPLEX MOSQUITOES IN EPIDEMIOLOGY. *Infect Genet Evol* 11(7): 1577–1585.

Faverjon C, Vial F, Andersson MG, Lecollinet S, Leblond A (2017) Early detection of West Nile virus in France: quantitative assessment of syndromic surveillance system using nervous signs in horses. *Epidemiol Infect* 145(5): 1044–1057.

Ferguson DD, Gershman K, LeBailly A, Petersen LR (2005) Characteristics of the Rash Associated with West Nile Virus Fever. *Clin Infect Dis* 41(8): 1204–1207.

Frost MJ, Zhang J, Edmonds JH, Prow NA, Gu X, Davis R, Hornitzky C, Arzey KE, Finlaison D, Hick P, Read A, Hobson-Peters J, et al. (2012) Characterization of Virulent West Nile Virus Kunjin Strain, Australia, 2011. *Emerg Infect Dis* 18(5): 792–800.

Fyodorova MV, Savage HM, Lopatina JV, Bulgakova TA, Ivanitsky AV, Platonova OV, Platonov AE (2006) Evaluation of Potential West Nile Virus Vectors in Volgograd Region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): Species Composition, Bloodmeal Host Utilization, and Virus Infection Rates of Mosquitoes. *Parasitology* 132(3): 552–563.

Gamino V, Höfle U (2013) Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Veterinary Research* 44(1): 39.

Garg S, Jampol LM (2005) Systemic and intraocular manifestations of West Nile virus infection. *Surv Ophthalmol* 50(1): 3–13.

Gibney KB, Colborn J, Baty S, Bunko Patterson AM, Sylvester T, Briggs G, Stewart T, Levy C, Komatsu K, MacMillan K, Delorey MJ, Mutebi J-P, et al. (2012) Modifiable risk factors for West Nile virus infection during an outbreak--Arizona, 2010. *Am J Trop Med Hyg* 86(5): 895–901.

Glaser L, Wegner M, Davis J, Bunning M, Marfin A, Campbell G, Bernard B, Lenhart S, Sotir M (2003) West Nile virus infection among turkey breeder farm workers - Wisconsin, 2002 (Reprinted from *MMWR*, vol 52, pg 1017, 2003). *JAMA The Journal of the American Medical Association* 290: 2793–+.

Gomes B, Kioulos E, Papa A, Almeida APG, Vontas J, Pinto J (2013) Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. *Infection, Genetics and Evolution* 16: 218–225.

Goodyer L, Behrens RH (1998) Short report: The safety and toxicity of insect repellents. *Am J Trop Med Hyg* 59(2): 323–324.

Goodyer LI, Croft AM, Frances SP, Hill N, Moore SJ, Onyango SP, Debboun M (2010) Expert review of the evidence base for arthropod bite avoidance. *J Travel Med* 17(3): 182–192.



- Gossner CM, Marrama L, Carson M, Allerberger F, Calistri P, Dilaveris D, Lecollinet S, Morgan D, Nowotny N, Paty M-C, Pervanidou D, Rizzo C, et al. (2017) West Nile virus surveillance in Europe: moving towards an integrated animal-human-vector approach. *Euro Surveill* 22(18).
- Gray TJ, Burrow JN, Markey PG, Whelan PI, Jackson J, Smith DW, Currie BJ (2011a) West Nile Virus (Kunjin Subtype) Disease in the Northern Territory of Australia—A Case of Encephalitis and Review of All Reported Cases. *Am J Trop Med Hyg* 85(5): 952–956.
- Gray TJ, Burrow JN, Markey PG, Whelan PI, Jackson J, Smith DW, Currie BJ (2011b) West Nile Virus (Kunjin Subtype) Disease in the Northern Territory of Australia—A Case of Encephalitis and Review of All Reported Cases. *Am J Trop Med Hyg* 85(5): 952–956.
- Gray TJ, Webb CE (2014) A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Int J Gen Med* 7: 193–203.
- Gyure KA (2009) West Nile Virus Infections. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(10): 1053–1060.
- Hall RA, Broom AK, Smith DW, Mackenzie JS (2002) The Ecology and Epidemiology of Kunjin Virus. In: *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses* (Mackenzie JS, Barrett ADT, Deubel V, Eds.). Springer, Berlin, Heidelberg, p. 253–269.
- Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL (2005a) Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerging Infect Dis* 11(8): 1174–1179.
- Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL (2005b) Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerging Infect Dis* 11(8): 1174–1179.
- Higgs S, Schneider BS, Vanlandingham DL, Klingler KA, Gould EA (2005) Nonviremic transmission of West Nile virus. *PNAS* 102(25): 8871–8874.
- Höper D, Mettenleiter TC, Beer M (2016) Metagenomic approaches to identifying infectious agents. *Rev - Off Int Epizoot* 35(1): 83–93.
- Hubálek Z, Halouzka J (1999) West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5(5): 643–650.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juricová Z, Sebesta O (1998) First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol* 42(2): 119–120.
- Hurlbut HS, Rizk F, Taylor RM, Work TH (1956) A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 5(4): 579–620.
- Inojosa WO, Scotton PG, Fuser R, Giobbia M, Paolin A, Maresca MC, Brunello A, Nascimben E, Sorbara C, Rigoli R, Berti R, Gajo GB, et al. (2012) West Nile virus transmission through organ transplantation in north-eastern Italy: a case report and implications for pre-procurement screening. *Infection* 40(5): 557–562.

Jacobson ER, Ginn PE, Troutman JM, Farina L, Stark L, Klenk K, Burkhalter KL, Komar N (2005) West Nile virus infection in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *J Wildl Dis* 41(1): 96–106.

Jean CM, Honarmand S, Louie JK, Glaser CA (2007) Risk Factors for West Nile Virus Neuroinvasive Disease, California, 2005. *Emerg Infect Dis* 13(12): 1918–1920.

Jiménez-Clavero MA, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Llorente F, Blanco JM, Rodríguez-Ramos J, Pérez-Ramirez E, Höfle U (2008) West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerging Infect Dis* 14(9): 1489–1491.

Johnson N, Fernández de Marco M, Giovannini A, Ippoliti C, Danzetta ML, Svartz G, Erster O, Groschup MH, Ziegler U, Mirazimi A, Monteil V, Beck C, et al. (2018) Emerging Mosquito-Borne Threats and the Response from European and Eastern Mediterranean Countries. *Int J Environ Res Public Health* 15(12).

Joubert L, Oudar J, Hannoun C, Beytout D, Corniou B, Guillon JC, Panthier R (1970) [Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 118(2): 239–247.

Jourdain E, Toussaint Y, Leblond A, Bicout DJ, Sabatier P, Gauthier-Clerc M (2007) Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(1): 15–33.

Kaiser J (2012) Outbreak Pattern Stymies Vaccine Work. *Science* 337(6098): 1030–1030.

Kalil AC, Devetten MP, Singh S, Lesiak B, Poage DP, Bargenquast K, Fayad P, Freifeld AG (2005) Use of interferon-alpha in patients with West Nile encephalitis: report of 2 cases. *Clin Infect Dis* 40(5): 764–766.

Karaca K, Bowen R, Austgen LE, Teehee M, Siger L, Grosenbaugh D, Loosemore L, Audonnet J-C, Nordgren R, Minke JM (2005) Recombinant canarypox vectored West Nile virus (WNV) vaccine protects dogs and cats against a mosquito WNV challenge. *Vaccine* 23(29): 3808–3813.

Kardjadj M, Diallo A, Lancelot R (2019) *Transboundary Animal Diseases in Sahelian Africa and Connected Regions*. Springer Nature, .

Khairallah M, Ben Yahia S, Ladjimi A, Zeghidi H, Ben Romdhane F, Besbes L, Zaouali S, Messaoud R (2004) Chorioretinal involvement in patients with West Nile virus infection. *Ophthalmology* 111(11): 2065–2070.

Kile JC, Panella NA, Komar N, Chow CC, MacNeil A, Robbins B, Bunning ML (2005) Serologic survey of cats and dogs during an epidemic of West Nile virus infection in humans. *J Am Vet Med Assoc* 226(8): 1349–1353.

Kilpatrick A, LaDeau S, Marra P (2009) Ecology of West Nile Virus Transmission and its Impact on Birds in the Western Hemisphere. *The Auk* 124: 1121–1136.

- Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P (2006) West Nile Virus Epidemics in North America Are Driven by Shifts in Mosquito Feeding Behavior. *PLOS Biology* 4(4): e82.
- Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM, Kramer LD (2008) Temperature, Viral Genetics, and the Transmission of West Nile Virus by *Culex pipiens* Mosquitoes. *PLOS Pathogens* 4(6): e1000092.
- Kilpatrick AM, Pape WJ (2013) Predicting Human West Nile Virus Infections With Mosquito Surveillance Data. *Am J Epidemiol* 178(5): 829–835.
- Kimura T, Sasaki M, Okumura M, Kim E, Sawa H (2010) Flavivirus encephalitis: pathological aspects of mouse and other animal models. *Vet Pathol* 47(5): 806–818.
- Ko M, Mn G, C Y, R G (2013) Persistence of detectable immunoglobulin M antibodies up to 8 years after infection with West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg* 89(5): 996–1000.
- Komar N (2001a) West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann N Y Acad Sci* 951: 58–73.
- Komar N (2001b) West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann N Y Acad Sci* 951: 58–73.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M (2003) Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infect Dis* 9(3): 311–322.
- Komar N, Panella NA, Boyce E (2001) Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. *Emerg Infect Dis* 7(4): 736–738.
- Kramer AH (2013) Viral encephalitis in the ICU. *Crit Care Clin* 29(3): 621–649.
- Kramer LD, Li J, Shi P-Y (2007) West Nile virus. *Lancet Neurol* 6(2): 171–181.
- Kramer LD, Styer LM, Ebel GD (2008) A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol* 53: 61–81.
- Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, Biksi I, Ferenczi E, Bahuon C, Sardi S, Zientara S, Szenci O (2011) Equine Encephalomyelitis Outbreak Caused by a Genetic Lineage 2 West Nile Virus in Hungary. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25(3): 586–591.
- Ladbury GAF, Gavana M, Danis K, Papa A, Papamichail D, Mourelatos S, Gewehr S, Theocharopoulos G, Bonovas S, Benos A, Panagiotopoulos T (2013) Population Seroprevalence Study after a West Nile Virus Lineage 2 Epidemic, Greece, 2010. *PLOS ONE* 8(11): e80432.
- Lan D, Ji W, Yu D, Chu J, Wang C, Yang Z, Hua X (2011) Serological evidence of West Nile virus in dogs and cats in China. *Arch Virol* 156(5): 893–895.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, et al. (1999) Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286(5448): 2333–2337.

- Lanteri MC, Lee T-H, Wen L, Kaidarova Z, Bravo MD, Kiely NE, Kamel HT, Tobler LH, Norris PJ, Busch MP (2014) West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: implication for transfusion and transplantation safety. *Transfusion* 54(12): 3232–3241.
- Leblond A, Hendriks P, Sabatier P (2007) West Nile Virus Outbreak Detection Using Syndromic Monitoring in Horses. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)* 7: 403–10.
- Ledgerwood JE, Pierson TC, Hubka SA, Desai N, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Nelson S, Nason M, Gu W, Bundrant N, Koup RA, et al. (2011) A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. *J Infect Dis* 203(10): 1396–1404.
- Ledizet M, Kar K, Foellmer HG, Wang T, Bushmich SL, Anderson JF, Fikrig E, Koski RA (2005) A recombinant envelope protein vaccine against West Nile virus. *Vaccine* 23(30): 3915–3924.
- Leis AA, Stokic DS (2012) Neuromuscular Manifestations of West Nile Virus Infection. *Front Neurol* 3.
- Lerner H, Berg C (2015) The concept of health in One Health and some practical implications for research and education: what is One Health? *Infect Ecol Epidemiol* 5.
- Lewis M, Amsden JR (2007) Successful treatment of West Nile virus infection after approximately 3 weeks into the disease course. *Pharmacotherapy* 27(3): 455–458.
- Lichtensteiger CA, Heinz-Taheny K, Osborne TS, Novak RJ, Lewis BA, Firth ML (2003) West Nile Virus Encephalitis and Myocarditis in Wolf and Dog. *Emerg Infect Dis* 9(10): 1303–1306.
- Lim SM, Koraka P, Boheemen S van, Roose JM, Jaarsma D, Vijver DAMC van de, Osterhaus ADME, Martina BEE (2013) Characterization of the Mouse Neuroinvasiveness of Selected European Strains of West Nile Virus. *PLOS ONE* 8(9): e74575.
- Liu R, Shuai J, Wu J, Zhu H (2006) Modelling Spatial Spread of West Nile Virus and Impact of Directional Dispersal of Birds. *Mathematical biosciences and engineering : MBE* 3: 145–60.
- Luo H, Wang T (2018) Recent advances in understanding West Nile virus host immunity and viral pathogenesis. *F1000Res* 7: 338.
- Lustig Y, Hindiyeh M, Orshan L, Weiss L, Koren R, Katz-Likvornik S, Zadka H, Glatman-freedman A, Mendelson E, Shulman LM (2016a) Mosquito Surveillance for 15 Years Reveals High Genetic Diversity Among West Nile Viruses in Israel. *J Infect Dis* 213(7): 1107–1114.
- Lustig Y, Hindiyeh M, Orshan L, Weiss L, Koren R, Katz-Likvornik S, Zadka H, Glatman-freedman A, Mendelson E, Shulman LM (2016b) Mosquito Surveillance for 15 Years Reveals High Genetic Diversity Among West Nile Viruses in Israel. *J Infect Dis* 213(7): 1107–1114.
- Lustig Y, Mannasse B, Koren R, Katz-Likvornik S, Hindiyeh M, Mandelboim M, Dovrat S, Sofer D, Mendelson E (2016c) Superiority of West Nile Virus RNA Detection in Whole Blood for Diagnosis of Acute Infection. *J Clin Microbiol* 54(9): 2294–2297.

- Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E (2018a) Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity. *Front Microbiol* 9: 2421.
- Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E (2018b) Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity. *Front Microbiol* 9: 2421.
- Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, Aristova VA, Dzharkenov AF, Samokhvalov EI, Savage HM, Shchelkanov MY, Galkina IV, et al. (2004) West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol Suppl* (18): 85–96.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR (2004) Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10(12 Suppl): S98-109.
- Magurano F, Remoli ME, Baggieri M, Fortuna C, Marchi A, Fiorentini C, Bucci P, Benedetti E, Ciufolini MG, Rizzo C, Piga S, Salcuni P, et al. (2012) Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin Microbiol Infect* 18(12): E545-547.
- Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Deubel V (2002) Introduction of West Nile Virus in the Middle East by Migrating White Storks. *Emerg Infect Dis* 8(4): 392–397.
- Mancini G, Montarsi F, Calzolari M, Capelli G, Dottori M, Ravagnan S, Lelli D, Chiari M, Santilli A, Quaglia M, Quaglia M, Federici V, et al. (2017) Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Vet Ital* 53(2): 97–110.
- Mangana-Vougiouka O, Boutsini S, Ntousi D, Patakakis M, Orfanou E, Zafiropoulou K, Dilaveris D, Panagiotatos D, Nomikou K (2013) Epizootiological investigation of the most important infectious equine diseases in Greece. *Rev - Off Int Epizoot* 32(3): 775–787.
- Marcantonio M, Rizzoli A, Metz M, Rosà R, Marini G, Chadwick E, Neteler M (2015) Identifying the Environmental Conditions Favouring West Nile Virus Outbreaks in Europe. *PLoS One* 10(3).
- Marm Kilpatrick A, Daszak P, Jones MJ, Marra PP, Kramer LD (2006) Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proc Biol Sci* 273(1599): 2327–2333.
- May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett ADT (2011a) Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol* 85(6): 2964–2974.
- May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett ADT (2011b) Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol* 85(6): 2964–2974.
- McLean RG, Ubico SR, Bourne D, Komar N (2002) West Nile virus in livestock and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol* 267: 271–308.
- Medical Virology - 4th Edition <https://www.elsevier.com/books/medical-virology/white/978-0-08-092656-8>. Accessed July 21, 2020.
- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12(6): 435–447.

- Medlock JM, Vaux AGC (2015) Seasonal dynamics and habitat specificity of mosquitoes in an English wetland: implications for UK wetland management and restoration. *J Vector Ecol* 40(1): 90–106.
- Miller BR, Nasci RS, Godsey MS, Savage HM, Lutwama JJ, Lanciotti RS, Peters CJ (2000) First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 62(2): 240–246.
- MI B, Ra B, Cb C, Kg S, Bs D, N K, Ms G, D B, DI H, Da H, Bj B, Cj M (2002) Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 8(4): 380–386.
- Monaco F, Lelli R, Teodori L, Pinoni C, Gennaro A, Polci A, Calistri P, Savini G (2009) Re-Emergence of West Nile Virus in Italy. *Zoonoses and public health* 57: 476–86.
- Montgomery SP, Brown JA, Kuehnert M, Smith TL, Crall N, Lanciotti RS, Macedo de Oliveira A, Boo T, Marfin AA, 2003 West Nile Virus Transfusion-Associated Transmission Investigation Team (2006) Transfusion-associated transmission of West Nile virus, United States 2003 through 2005. *Transfusion* 46(12): 2038–2046.
- Morelli MC, Sambri V, Grazi GL, Gaibani P, Pierro A, Cescon M, Ercolani G, Cavrini F, Rossini G, Capobianchi MR, Di Caro A, Menzo S, et al. (2010) Absence of neuroinvasive disease in a liver transplant recipient who acquired West Nile virus (WNV) infection from the organ donor and who received WNV antibodies prophylactically. *Clin Infect Dis* 51(4): e34-37.
- Morin CW, Comrie AC (2013) Regional and seasonal response of a West Nile virus vector to climate change. *PNAS* 110(39): 15620–15625.
- Morrey JD, Smee DF, Sidwell RW, Tseng C (2002) Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus. *Antiviral Res* 55(1): 107–116.
- Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, Katz N, Liljebjelke KA, Biggerstaff BJ, Fine AD, Layton MC, Mullin SM, et al. (2001) Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* 358(9278): 261–264.
- Mukhopadhyay S (2003) Structure of West Nile Virus. *Science* 302(5643): 248–248.
- Mumcuoglu KY, Banet-Noach C, Malkinson M, Shalom U, Galun R (2005) Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5(1): 65–71.
- Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Alcaide M, Viana DS, Roiz D, Vázquez A, Figuerola J (2012) Feeding Patterns of Potential West Nile Virus Vectors in South-West Spain. *PLoS One* 7(6).
- Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG (2001a) West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci* 951: 117–126.
- Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H (2001b) West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 7(4): 692–696.
- Murray KO, Garcia MN, Yan C, Gorchakov R (2013) Persistence of Detectable Immunoglobulin M Antibodies Up to 8 Years After Infection with West Nile Virus. *Am J Trop Med Hyg* 89(5): 996–1000.

- Murray KO, Walker C, Gould E (2011) The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. *Epidemiol Infect* 139(6): 807–817.
- Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, Kellner MJ, Tan AL, Paul LM, Parham LA, Garcia KF, Barnes KG, et al. (2018) Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* 360(6387): 444–448.
- Na M, Hm Y (2009) Spatial spreading of West Nile Virus described by traveling waves. *J Theor Biol* 258(3): 403–417.
- Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O’Leary D, Murray K, Huang A, Rosenberg A, Greenberg A, Sherman M, Wong S, Layton M, et al. (2001) The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 344(24): 1807–1814.
- Ng T, Hathaway D, Jennings N, Champ D, Chiang YW, Chu HJ (2003) Equine vaccine for West Nile virus. *Dev Biol (Basel)* 114: 221–227.
- Orshan L, Bin H, Schnur H, Kaufman A, Valinsky A, Shulman L, Weiss L, Mendelson E, Pener H (2008) Mosquito Vectors of West Nile Fever in Israel. *J Med Entomol* 45(5): 939–947.
- OZKUL A, YILDIRIM Y, PINAR D, AKCALI A, YILMAZ V, COLAK D (2006) Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect* 134(4): 826–829.
- Paddock CD, Nicholson WL, Bhatnagar J, Goldsmith CS, Greer PW, Hayes EB, Risko JA, Henderson C, Blackmore CG, Lanciotti RS, Campbell GL, Zaki SR (2006) Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States. *Clin Infect Dis* 42(11): 1527–1535.
- Papa A, Anastasiadou A, Delianidou M (2015) West Nile virus IgM and IgG antibodies three years post-infection. *Hippokratia* 19(1): 34–36.
- Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vázquez A, Tenorio A, Nowotny N (2011a) Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerging Infect Dis* 17(5): 920–922.
- Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S (2011b) Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect* 17(8): 1176–1180.
- Patsoula E, Beleri S, Tegos N, Mkrttsian R, Vakali A, Pervanidou D (2020) Entomological Data and Detection of West Nile Virus in Mosquitoes in Greece (2014-2016), Before Disease Re-Emergence in 2017. *Vector Borne Zoonotic Dis* 20(1): 60–70.
- Patsoula E, Vakali A, Balatsos G, Pervanidou D, Beleri S, Tegos N, Baka A, Spanakos G, Georgakopoulou T, Tserkezou P, Van Bortel W, Zeller H, et al. (2016) West Nile Virus Circulation in Mosquitoes in Greece (2010-2013). *Biomed Res Int* 2016: 2450682.
- Paz S (2006) The West Nile Virus outbreak in Israel (2000) from a new perspective: the regional impact of climate change. *Int J Environ Health Res* 16(1): 1–13.

- Paz S, Semenza JC (2013) Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia--a review. *Int J Environ Res Public Health* 10(8): 3543–3562.
- Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, Stobierski MG, Signs K, Newman B, Kapoor H, Goodman JL, Chamberland ME, et al. (2003) Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med* 349(13): 1236–1245.
- Pergam SA, DeLong CE, Echevarria L, Scully G, Goade DE (2006) MYOCARDITIS IN WEST NILE VIRUS INFECTION. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75(6): 1232–1233.
- Petersen LR, Brault AC, Nasci RS (2013) West Nile virus: review of the literature. *JAMA* 310(3): 308–315.
- Petersen LR, Marfin AA (2002) West Nile virus: a primer for the clinician. *Ann Intern Med* 137(3): 173–179.
- Pisani G, Cristiano K, Pupella S, Liembruno GM (2016) West Nile Virus in Europe and Safety of Blood Transfusion. *TMH* 43(3): 158–167.
- Platonov AE, Karan' LS, Shopenskaia TA, Fedorova MV, Koliashnikova NM, Rusakova NM, Shishkina LV, Arshba TE, Zhuravlev VI, Govorukhina MV, Valentseva AA, Shipulin GA (2011) [Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* (2): 29–37.
- Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, Yazyshina S, Platonova OV, Obukhov IL, Zhukov AN, Vengerov YY, Pokrovskii VI Outbreak of West Nile Virus Infection, Volgograd Region, Russia, 1999 - Volume 7, Number 1—February 2001 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC.
- Porphyre T, Bicout D, Sabatier P (2005) Modelling the abundance of mosquito vectors versus flooding dynamics. *Ecological Modelling* 183: 173–181.
- Pradier S, Leblond A, Durand B (2008) Land Cover, Landscape Structure, and West Nile Virus Circulation in Southern France. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)* 8: 253–63.
- Pradier S, Lecollinet S, Leblond A (2012a) West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe. *Rev - Off Int Epizoot* 31(3): 829–844.
- Pradier S, Lecollinet S, Leblond A (2012b) West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe. *Rev - Off Int Epizoot* 31(3): 829–844.
- Prince HE, Tobler LH, Lapé-Nixon M, Foster GA, Stramer SL, Busch MP (2005) Development and Persistence of West Nile Virus-Specific Immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG in Viremic Blood Donors. *J Clin Microbiol* 43(9): 4316–4320.
- Rabel PO, Planitzer CB, Farcet MR, Orlinger KK, Ilk R, Barrett PN, Kreil TR (2011) Increasing West Nile virus antibody titres in central European plasma donors from 2006 to 2010. *Euro Surveill* 16(10).



Ramamurthy M, Sankar S, Kannangai R, Nandagopal B, Sridharan G (2017) Application of viromics: a new approach to the understanding of viral infections in humans. *VirusDis* 28(4): 349–359.

Randolph SE, Gern L, Nuttall PA (1996) Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today (Regul Ed)* 12(12): 472–479.

Rappole JH, Hubálek Z (2003) Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol* 94 Suppl: 47S–58S.

Read RW, Rodriguez DB, Summers BA (2005) West Nile Virus Encephalitis in a Dog. *Vet Pathol* 42(2): 219–222.

Reisen WK, Fang Y, Lothrop HD, Martinez VM, Wilson J, O'Connor P, Carney R, Cahoon-Young B, Shafii M, Brault AC (2006) Overwintering of West Nile Virus in Southern California. *J Med Entomol* 43(2): 344–355.

Resnick MP, Grunenwald P, Blackmar D, Hailey C, Bueno R, Murray KO (2008a) Juvenile dogs as potential sentinels for West Nile virus surveillance. *Zoonoses Public Health* 55(8–10): 443–447.

Resnick MP, Grunenwald P, Blackmar D, Hailey C, Bueno R, Murray KO (2008b) Juvenile dogs as potential sentinels for West Nile virus surveillance. *Zoonoses Public Health* 55(8–10): 443–447.

Rios M, Daniel S, Chancey C, Hewlett IK, Stramer SL (2007) West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. *Clin Infect Dis* 45(2): 181–186.

Rizzo C, Vescio F, Declich S, Finarelli AC, Macini P, Mattivi A, Rossini G, Piovesan C, Barzon L, Palù G, Gobbi F, Macchi L, et al. (2009) West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro Surveill* 14(40).

Rogers DJ (2006) Models for vectors and vector-borne diseases. *Adv Parasitol* 62: 1–35.

Rogers DJ, Randolph SE (2006) Climate change and vector-borne diseases. *Adv Parasitol* 62: 345–381.

Roiz D, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J (2015) Landscape Effects on the Presence, Abundance and Diversity of Mosquitoes in Mediterranean Wetlands. *PLoS ONE* 10(6): e0128112.

Roos KL (2004) West Nile encephalitis and myelitis. *Curr Opin Neurol* 17(3): 343–346.

Samuel MA, Diamond MS (2005) Alpha/Beta Interferon Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Restricting Cellular Tropism and Enhancing Neuronal Survival. *J Virol* 79(21): 13350–13361.

Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R (2008) Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Eurosurveillance* 13(48): 19048.

Sayao A-L, Suchowersky O, Al-Khathaami A, Klassen B, Katz NR, Sevick R, Tilley P, Fox J, Patry D (2004) Calgary Experience with West Nile Virus Neurological Syndrome During the Late Summer of 2003. *Can j neurol sci* 31(2): 194–203.

Schaffner F, Medlock JM, Van Bortel W (2013) Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clin Microbiol Infect* 19(8): 685–692.

- Schuffenecker I, Peyrefitte CN, Harrak M el, Murri S, Leblond A, Zeller HG (2005) West Nile Virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis* 11(2): 306–309.
- Sejvar JJ (2003) West Nile Virus: An Historical Overview. *Ochsner J* 5(3): 6–10.
- Sejvar JJ (2014) Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection. *Viruses* 6(2): 606–623.
- Sing A (2014) *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health Aspects*. Springer, .
- Smith RD, Konoplev S, DeCourten-Myers G, Brown T (2004) West Nile virus encephalitis with myositis and orchitis. *Human Pathology* 35(2): 254–258.
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH (1940) A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda<sup>1</sup>. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* s1-20(4): 471–492.
- Spielman A (2001) Structure and seasonality of nearctic *Culex pipiens* populations. *Ann N Y Acad Sci* 951: 220–234.
- Steele KE, Linn MJ, Schoepp RJ, Komar N, Geisbert TW, Manduca RM, Calle PP, Raphael BL, Clippinger TL, Larsen T, Smith J, Lanciotti RS, et al. (2000) Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet Pathol* 37(3): 208–224.
- Steiner I, Kennedy PGE (2013) West Nile virus introduction into the new world. *Neurology* 81(16): 1441–1442.
- Taylor RM, Hurlbut HS, Dressler HR, Spangler EW, Thrasher D (1953) Isolation of West Nile virus from *Culex* mosquitoes. *J Egypt Med Assoc* 36(3): 199–208.
- Téllez-Zenteno JF, Hunter G, Hernández-Ronquillo L, Haghiri E (2013) Neuroinvasive West Nile virus disease in Canada. The Saskatchewan experience. *Can J Neurol Sci* 40(4): 580–584.
- Tilley PAG, Fox JD, Jayaraman GC, Preiksaitis JK (2006) Nucleic acid testing for west nile virus RNA in plasma enhances rapid diagnosis of acute infection in symptomatic patients. *J Infect Dis* 193(10): 1361–1364.
- Transmission of West Nile virus, July to December 2019 – Table of cases, 2019 transmission season (2019) European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/transmission-west-nile-virus-july-december-2019-table-cases-2019-transmission>. Accessed May 3, 2021.
- Trevejo RT, Eidson M (2008) Zoonosis update: West Nile virus. *J Am Vet Med Assoc* 232(9): 1302–1309.
- Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI (1998) West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352(9130): 767–771.

- Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, Sejvar JJ, Marra CM, Roos KL, Hartman BJ, Kaplan SL, Scheld WM, Whitley RJ (2008) The Management of Encephalitis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 47(3): 303–327.
- Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, Oguinn ML, Andreadis TG, Blow JA (2005) An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J Med Entomol* 42(1): 57–62.
- Turell MJ, O’Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW (2001) Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 38(2): 130–134.
- Ulbert S (2011) West Nile virus: the complex biology of an emerging pathogen. *Intervirology* 54(4): 171–184.
- Valiakos G, Papaspyropoulos K, Giannakopoulos A, Birtsas P, Tsiodras S, Hutchings MR, Spyrou V, Pervanidou D, Athanasiou LV, Papadopoulos N, Tsokana C, Baka A, et al. (2014) Use of Wild Bird Surveillance, Human Case Data and GIS Spatial Analysis for Predicting Spatial Distributions of West Nile Virus in Greece. *PLoS ONE* 9(5): e96935.
- Valiakos G, Touloudi A, Iacovakis C, Athanasiou L, Birtsas P, Spyrou V, Billinis C (2011) Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Eurosurveillance* 16(18): 19862.
- Venter M, Steyl J, Human S, Weyer J, Zaayman D, Blumberg L, Leman P, Paweska J, Swanepoel R (2010) Transmission of West Nile Virus during Horse Autopsy. *Emerging infectious diseases* 16: 573–5.
- Villanueva S (2011) Introduction to a European Preparedness Plan on West Nile Virus.
- Vo E, Le M, Mf C, Ms G, Rj K, Sc G (2007) Land cover variation and West Nile virus prevalence: patterns, processes, and implications for disease control. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(2): 173–180.
- Vogels CBF, Möhlmann TWR, Melsen D, Favia G, Wennergren U, Koenraadt CJM (2016) Latitudinal Diversity of *Culex pipiens* Biotypes and Hybrids in Farm, Peri-Urban, and Wetland Habitats in Europe. *PLoS ONE* 11(11): e0166959.
- Vonesch N, Binazzi A, Bonafede M, Melis P, Ruggieri A, Iavicoli S, Tomao P (2019) Emerging zoonotic viral infections of occupational health importance. *Pathog Dis* 77(2).
- Vrioni G, Mavrouli M, Kapsimali V, Stavropoulou A, Detsis M, Danis K, Tsakris A (2014) Laboratory and clinical characteristics of human West Nile virus infections during 2011 outbreak in southern Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14(1): 52–58.
- Waghmare A, Campbell AP, Xie H, Seo S, Kuypers J, Leisenring W, Jerome KR, Englund JA, Boeckh M (2013) Respiratory syncytial virus lower respiratory disease in hematopoietic cell transplant recipients: viral RNA detection in blood, antiviral treatment, and clinical outcomes. *Clin Infect Dis* 57(12): 1731–1741.
- Walid MS, Mahmoud FA (2009) Successful Treatment with Intravenous Immunoglobulin of Acute Flaccid Paralysis Caused by West Nile Virus. *Perm J* 13(3): 43–46.

Weaver SC (2018) Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: A challenge for the global virology community. *Antiviral Res* 156: 80–84.

Weaver SC, Reisen WK (2010a) Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85(2): 328–345.

Weaver SC, Reisen WK (2010b) Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85(2): 328–345.

Weinberger M, Pitlik SD, Gandacu D, Lang R, Nassar F, Ben David D, Rubinstein E, Izthaki A, Mishal J, Kitzes R, Siegman-Igra Y, Giladi M, et al. (2001) West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis* 7(4): 686–691.

Weissenböck H, Hubálek Z, Bakonyi T, Nowotny N (2010) Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet Microbiol* 140(3–4): 271–280.

West Nile Virus | AAEP <https://aaep.org/guidelines/vaccination-guidelines/core-vaccination-guidelines/west-nile-virus>. Accessed August 5, 2020.

West Nile virus infections in humans in the EU/EEA Member States and EU neighbouring countries, 2019 transmission season (2019) European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-infections-humans-eueea-member-states-and-eu-neighbouring>. Accessed May 2, 2021.

West Nile virus outbreaks among humans and animals in the European Union, 2019 transmission season (2019) European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-outbreaks-among-humans-and-animals-european-union-2019>. Accessed May 3, 2021.

Wilder-Smith A, Gubler DJ, Weaver SC, Monath TP, Heymann DL, Scott TW (2017) Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis* 17(3): e101–e106.

Williams SH, Cordey S, Bhuva N, Laubscher F, Hartley M-A, Boillat-Blanco N, Mbarack Z, Samaka J, Mlaganile T, Jain K, Acremont V d', Kaiser L, et al. (2018) Investigation of the Plasma Virome from Cases of Unexplained Febrile Illness in Tanzania from 2013 to 2014: a Comparative Analysis between Unbiased and VirCapSeq-VERT High-Throughput Sequencing Approaches. *mSphere* 3(4).

Wilson MR, Zimmermann LL, Crawford ED, Sample HA, Soni PR, Baker AN, Khan LM, DeRisi JL (2017) Acute West Nile Virus Meningoencephalitis Diagnosed Via Metagenomic Deep Sequencing of Cerebrospinal Fluid in a Renal Transplant Patient. *Am J Transplant* 17(3): 803–808.

Zana B, Kemenesi G, Herczeg R, Dallos B, Oldal M, Marton S, Krtinić B, Gellert A, Banyai K, Jakab F (2016) Genomic characterization of West Nile virus strains derived from mosquito samples obtained during 2013 Serbian outbreak. *Journal of vector borne diseases* 53: 379–383.

Zeller HG, Schuffenecker I (2004) West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(3): 147–156.

Zou S, Foster GA, Dodd RY, Petersen LR, Stramer SL (2010) West Nile fever characteristics among viremic persons identified through blood donor screening. *J Infect Dis* 202(9): 1354–1361.

Εβδομαδιαίες εκθέσεις Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. <https://eody.gov.gr/epidimiologika-statistika-dedomena/evdomadiaies-ektheseis/>. Accessed February 7, 2021.