

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Οικογεωγραφική μελέτη των κροτώνων στην Κύπρο και ο ρόλος τους
σαν μεταβιβαστές στη μετάδοση τριών ζωνόσων »**

ΙΩΑΝΝΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΖΩΟΝΟΣΩΝ ΚΑΙ
ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

(WHO COLLABORATING CENTER)



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2009

«Στους γονείς μου Γεώργιο και Γεωργία
για την ανατροφή και την παιδεία που
μου πρόσφεραν, με πολλές στερήσεις.»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης, (WHO C.C), σε συνεργασία με το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Βακτηριολογίας και Παρασιτολογίας των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Κύπρου υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Τσελέντη Ιωάννη. Ένα μέρος της μελέτης χρηματοδοτήθηκε από το ΙΠΕ, στα πλαίσια ερευνητικού προγράμματος.

Θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της διατριβής.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Τσελέντη Ιωάννη, για την ερευνητική και επιστημονική καθοδήγησή του, τη συνεχή παρακολούθηση και επίβλεψη της προσπάθειάς μου, τις πολύτιμες συμβουλές του και το ενδιαφέρον του, την αμέριστη υποστήριξη, και την πολύπλευρη βοήθεια του. Είμαι βαθύτατα ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τη δυνατότητα και τα μέσα που μου παρείχε για να εκπονήσω την παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Λέκτορα της Ιατρικής Σχολής κ. Ψαρουλάκη Άννα, για την ανεκτίμητη βοήθεια της και την καθοριστική συμβολή της στο σχεδιασμό, την οργάνωση, και επίβλεψη της μελέτης, καθώς και για την αδιάλειπτη, και ουσιαστική υποστήριξη και βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθ. κ. Γκίκα Αχιλλέα και την Επικ. Καθ. κ. Αντωνίου Μαρία οι οποίοι μαζί με τον Καθ. κ. Τσελέντη Ιωάννη απετέλεσαν την 3μελή επιτροπή της παρούσας διατριβής, καθώς και την Επικ. Καθ. κ. Σκούλικα Ευσταθία, τον Καθ. κ. Κογεβίνα Εμμανουήλ και την Καθ. κ. Χατζοπούλου Μπουρτζή Ελευθερία για την τιμή που μου έκαναν να δεχθούν να συστήσουν την 7μελή μου επιτροπή.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Λουκαΐδη Φειδία, πρώην Διευθυντή των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, ο οποίος πίστεψε στις ικανότητές μου και που με την παρότρυνσή και τη στήριξη του ανέλαβα την εκτέλεση της παρούσας εργασίας.

Η ιδιαίτερα δύσκολη εργασία της συλλογής των δειγμάτων από τα άγρια ζώα, δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την ενεργό συμμετοχή και την πολύτιμη εμπειρία του προσωπικού του Ταμείου Θήρας της Κύπρου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους Λειτουργούς του Ταμείου κ. Κασίνη Νικόλαο και κ. Αναγιωτό Πέτρο καθώς και τους θηροφύλακες Λυσάνδρου Ανδρέα, Νικολάου Κωστάκη και Κυριάκου Ιωάννη. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να αποδώσω στον κ. Κασίνη και για την παραχώρηση φωτογραφιών των άγριων θηλαστικών και μεταναστευτικών πτηνών.

Για την ιδιαίτερα επίπονη εργασία της ταξινόμησης των υποδόχων και των μεταβιβαστών, ευχαριστώ τον εντομολόγο κ. Παπαδόπουλο Βύρωνα, συνεργάτη του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής

Ευχαριστώ επίσης την ιατρό Κοκκίνη Σοφία, η οποία πραγματοποίησε την δειγματοληψία από τον ανθρώπινο πληθυσμό

Θερμότατα ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς του Εργαστηρίου Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, Χοχλάκη Δημοσθένη, Βρανάκη Σήφη, Σανδαλάκη Βασίλη για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης ιδιαίτερα στην ανάπτυξη και εφαρμογή των μοριακών τεχνικών. Ευχαριστώ επίσης την τεχνολόγο Κοκκινάκη Χρυσάνθη για την πολύτιμη βοήθεια στον ορολογικό έλεγχο των δειγμάτων.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Χοχλάκη Δημοσθένη ο οποίος εκτός από τη συμβολή του στο εργαστηριακό μέρος με βοήθησε αρκετά τόσο στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων όσο και στη συγγραφή των κειμένων και με τον οποίο πέραν της στενής συνεργασίας αναπτύχθηκε και μια δυνατή φιλία

Θερά ευχαριστώ το στατιστικό-επιδημιολόγο, καθηγητή στο πανεπιστήμιο Irbid της Ιορδανίας, Δρ. Labib Sharif, για τη σημαντική βοήθεια του στην εξαγωγή του στατιστικού δείγματος.

Σημαντική ήταν επίσης, η βοήθεια του προσωπικού των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Κύπρου στη συλλογή των δειγμάτων από τα κτηνοτροφικά ζώα, προσωπικό για το οποίο αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω. Το φίλο και συνάδελφο Παπαευσταθίου Ανδρέα και τους τεχνικούς Μαυρονικόλα Νικόλα, Προκοπίου Χριστάκη, Χαραλάμπους Χαράλαμπο, Γιαννή Δημήτρη, Μεθοδίου Ανδρέα και Καραπίττα Μιχάλη.

Ιδιαίτερη μνεία και ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στο στενό συνεργάτη, άριστο βοηθό και φίλο πάνω απ' όλα, Δημητρίου Θεόδωρο για τη συνεργασία και, την πολύπλευρη βοήθεια και συμβολή του τόσο στις δειγματοληψίες όσο και στον εργαστηριακό τομέα, καθώς επίσης και για την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε.

Ευχαριστίες επίσης, θέλω να αποδώσω και στην αγαπητή συνεργάτιδα κ. Ορφανού Έλενα για την ανιδιοτελώς σημαντική συμβολή της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και των κειμένων καθώς και την επιμέλεια της χαρτογράφησης.

Τέλος πρέπει να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής αυτής της μελέτης.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Όνοματεπώνυμο	ΙΩΑΝΝΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ
Όνομα πατέρα	ΓΕΩΡΓΙΟΣ
Όνομα μητέρας	ΓΕΩΡΓΙΑ
Τόπος γεννήσεως	Λευκωσία ΚΥΠΡΟΣ
Ημερομηνία γεννήσεως	13.11.1970
Οικογενειακή κατάσταση	Άγαμος
Στρατιωτικές υποχρεώσεις	Εκπληρωμένες
Διεύθυνση κατοικίας	Οδός Γρηγόρη Αυξεντίου Αρ. 28 Αγίοι Τριμιθιάς Λευκωσία ΚΥΠΡΟΣ
Τηλέφωνο	+35722833981 +35799582525

ΣΠΟΥΔΕΣ

1990-1995 Πτυχίο Κτηνιατρικής Σχολής (Τμήμα Κτηνιατρικής της Σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης), Βαθμός ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ Πολύ καλή γνώση Αγγλικής

Η/Υ Καλή γνώση MS Windows και MS Office (excel, word).

ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ/ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

7/2002-Σήμερα	Υπεύθυνος Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Βακτηριολογίας και Παρασιτολογίας (ΕΠΑΒΠ) Επίσης συντονιστής του Προγράμματος καταπολέμησης της βρουκέλλωσης.
10/2000-7/2002	Κτηνιατρικός Λειτουργός στο Επαρχιακό Κτηνιατρικό Γραφείο Λευκωσίας απασχολούμενος σε κλινικά περιστατικά, στην κρεοσκοπία και υγιεινή του κρέατος και στην ευημερία των ζώων
1997-1999	Συμμετοχή στο Σχέδιο Κτηνιατροφαρμακευτικής περίθαλψης των Ζώων.
10/1996-10/2000	Ιδιώτης κτηνίατρος ασχολούμενος κυρίως με παραγωγικά ζώα.
1/1996-10/1996	Εννιάμηνη Άσκηση στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες Κύπρου για απόκτηση άδειας εξασκήσεως επαγγέλματος.

ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ (ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΕΙΣ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ / ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ)

29-30/5/2008	Συμμετοχή σε διήμερο Workshop το οποίο διοργανώθηκε από το Κοινοτικό Εργαστήριο Αναφοράς για τα παράσιτα. Ρώμη.
--------------	---

5-9/5/2008	Πενθήμερη εκπαίδευση σε θέματα Παθολογικής Ανατομικής, Ιστοπαθολογίας και Ανοσοϊστοχημείας Από το Δρ. Ν. Παπαϊωάννου Αν. Καθηγητή του Α.Π.Θ.
11/02/2008-12/02/2008	Κυπριακή Ακαδημία Δημόσιας Διοίκησης, συμμετοχή σε διήμερο σεμινάριο με θέμα «Κοινή Αγροτική Πολιτική: Κτηνιατρικά Θέματα»
9-10/2/2008	Παγκύπριος Κτηνιατρικός Σύλλογος, συμμετοχή σε Επιστημονική Δημερίδα, Λεμεσός.
18/1/2008	Εκπαιδευτικό σεμινάριο για τα προγράμματα <i>Cambylobacter</i> spp. και <i>Salmonella</i> spp. Κτηνιατρικές Υπηρεσίες.
3-4/3/2007	Παγκύπριος Κτηνιατρικός Σύλλογος, συμμετοχή σε Επιστημονική Δημερίδα, Λεμεσός.
7/12/2006-8/12/2006	Κτηνιατρικές Υπηρεσίες- Εργαστήριο Ιολογίας, Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών, Θεωρητική και Πρακτική Εκπαίδευση στις διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση του ιού της Λύσσας.
23/11/2006	Διεξαγωγή Εσωτερικών Επιθεωρήσεων Ποιότητας MKR ManSystems ltd (Διάρκεια: 8 ώρες)
12/10/06-13/10/06	Μικροβιολογικό Εργαστήριο Γενικού Νοσοκομείου Λεμεσού Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα «Ρικέτσιες- Παράσιτα»
Σεπτέμβριος 2006	Υλοποίηση συστήματος διαχείρισης της ποιότητας MKR ManSystems ltd (Διάρκεια: 8 ώρες)
22/5/2006	Εισαγωγικό σεμινάριο στο ISO/IEC 17025:2005 MKR Mansystems ltd (Διάρκεια: 8 ώρες)
17/5/2006	Ιατρικός Σύλλογος Λευκωσίας-Κερύνειας, συμμετοχή σε Επιστημονική συνάντηση με θέμα «Διαγνωστική προσπέλαση Ρικετσιασικών νοσημάτων».
16/5/2006	Ιατρικός Σύλλογος Λεμεσού, συμμετοχή σε Επιστημονική συνάντηση με θέμα «Διαγνωστική προσπέλαση Ρικετσιασικών νοσημάτων».
27/4/2006-29/4/2006	Συμμετοχή με παρουσίαση «Ενζωτικό Ενδορινικό Αδενοκαρκίνωμα του προβάτου» στο 11 ^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Γενικής Ομοσπονδίας Αράβων Κτηνιάτρων και στο 6 ^ο Επιστημονικό Συνέδριο του Ιορδανικού Κτηνιατρικού Συλλόγου στο Αμμάν της Ιορδανίας.
9/11/2005	Ιατρικός Σύλλογος Λεμεσού, συμμετοχή σε Επιστημονική συνάντηση με θέματα «Η Λεϊσμανίαση ή Κάλα-αζάρ» και «Τοξοπλάσμωση και η έγκυος γυναίκα».
3/10/2005-15/10/2005	Κτηνιατρική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, δεκαπενθήμερη εκπαίδευση σε θέματα Μακροσκοπικής Διαγνωστικής Παθολογικής Ανατομικής.
26/8/2005	Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, συμμετοχή ως εκπαιδευτής σε σεμινάριο και πρακτική άσκηση με θέμα «Κατασκευή και χρησιμοποίηση δολωμάτων στη θεραπεία των σκύλων από εχινόκοκκο».

22/3/2005	Συμμετοχή σε σεμινάριο με θέμα «Έλεγχος της σαλμονέλας στις ωοπαραγωγές όρνιθες» που διοργανώθηκε από το UNOPS, Λευκωσία.
19/3/2005-20/3/2005	Παγκύπριος Κτηνιατρικός Σύλλογος, συμμετοχή σε Επιστημονική Δημερίδα, Λεμεσός.
24/2/2005-26/2/2005	Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία, συμμετοχή στο 4 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων, Θεσσαλονίκη.
23/2/2005-24/2/2005	Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία, Δημερίδα Παθολογικής Ανατομικής & Κτηνιατροδικαστικής Παραγωγικών Ζώων, Θεσσαλονίκη.
20/10/2004-22/10/2004	RIKILT institute, Wageningen, the Netherlands, τριήμερο εργαστήριο με θέμα την μικροσκοπική ανίχνευση απαγορευμένων ζωικών πρωτεϊνών στις ζωοτροφές.
28/6/2004	Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, σεμινάριο « Ενδοκοινοτικό Εμπόριο – Κανονισμοί Υγιεινής 1,2,3,4 –υποχρεώσεις Κτηνιατρικών Εργαστηρίων » .
1/12/2004-2/12/2004	Κυπριακή Ακαδημία Δημόσιας Διοίκησης «ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΩΝ ΜΑΘΗΣΗΣ».
28/4/04-1/5/2004	Συμμετοχή στο 30 ^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο στην Αθήνα.
26/4/2004-28/4/2004	Εργαστήριο Controllo Alimenti, Τορίνο, Ιταλία, τριήμερη εκπαίδευση στη Μικροσκοπική Ανίχνευση Ζωικών Πρωτεϊνών.
13/3/2004-17/3/2004	Public Authority for Agriculture Affairs & Fish Resources State of Kuwait και WHO/MZCC, πενθήμερη εκπαίδευση με θέμα «Intersectoral Brucellosis Surveillance and Diagnosis in Animal Population under Vaccination»
1/12/2003-3/12/2003	Κυπριακή Ακαδημία Δημόσιας Διοίκησης «ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΑΝΑΓΚΩΝ ΜΑΘΗΣΗΣ»
15/9/2003-17/9/2003	Συμμετοχή στο Παγκόσμιο Συνέδριο για τη Βρουκέλλωση στην Παμπλόνα της Ισπανίας.
2/2003-30/5/2003	Εκπαίδευση στους Ηλεκτρονικούς Υπολογιστές, επίπεδο VTC 200
11/5/2003-18/5/2003	Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, εκπαίδευση σε μοριακές τεχνικές και κυτταροκαλιέργειες για Toxoplasma, Leishmania, Ρικέτσιες και μπαρτονέλλες.
22/4/2003	Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, σεμινάριο « Επικίνδυνες Ζωικές Ασθένειες – Παρούσα κατάσταση στην Κύπρο και μέτρα Αντιμετώπισης »
21/11/2002-24/11/2002	Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία, « 9ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο » Θεσσαλονίκη.
4/9/2002-7/9/2002	TAIEX, σεμινάριο «Veterinary Pharmacovigilance » Κολωνία, Γερμανία.

- 3/7/2002-5/7/2002 Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, επιμόρφωση στο αντικείμενο «Μικροσκοπική εξέταση ζωοτροφών για ανίχνευση ζωικών πρωτεϊνών.»
- 19/3/2002-21/3/2002 Κυπριακή Ακαδημία Δημόσιας Διοίκησης, τρίημερο εργαστήριο «Η ΜΑΘΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ» για Μέλη Πυρήνων Μάθησης.
- 26/1/2002-27/1/2002 Παγκύπριος Κτηνιατρικός Σύλλογος, «ΠΑΓΚΥΠΡΙΟ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ»
- 11/12/2001-14/12/2001 RSPCA, σεμινάριο «ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΗΜΕΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ»
- 18/10/2001-19/10/2001 Ιατρικές Υπηρεσίες και Υπηρεσίες Δημόσιας Υγείας, σεμινάριο «HACCP Implementation-HACCP Auditing»
- 18/6/2001-22/6/2001 Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, WHO/MZCC, εκπαιδευτικό σεμινάριο «Hazard Analysis Critical Control Point Systems: Concepts, Applications and Audit »
- 8/5/2001-24/5/2001 Κυπριακή Ακαδημία Δημόσιας Διοίκησης, πρόγραμμα «Βασικής Κατάρτισης σε Θέματα Ευρωπαϊκής Ένωσης»
- 28/10/1996-1/11/1996 Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρία, « 7ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο » Θεσσαλονίκη.

ΕΞΟΥΣΙΟΔΟΤΗΣΕΙΣ:

- 10/1/2001 Εξουσιοδότηση «Επίσημου Κτηνιάτρου» για άσκηση εξουσιών και καθηκόντων που απορρέουν από τη σχετική Νομοθεσία για την Υγιεινή του Κρέατος (Νόμοι 94/1979 και 65/1981 και κανονισμοί 95/1984 και 57/1992).
- 22/5/2001 Εξουσιοδότηση για άσκηση εξουσιών και καθηκόντων που προνοούν οι περί Υγιεινής του Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων (Παραγωγή και Παρασκευή) και Ελέγχου βουστασίων, Ποιμνιοστασίων και Γαλακτοκομείων Κανονισμοί του 1995 (Κ.Δ.Π. 86/95).
- 22/5/2001 Εξουσιοδότηση για ενέργεια επιθεωρήσεων για σκοπούς εφαρμογής και ελέγχου της τήρησης των διατάξεων του Περί Προστασίας και Ευημερίας των Ζώων Νόμου του 1994 και Των δυνάμει αυτού εκδιδόμενων Κανονισμών και Διαταγμάτων. Νόμος 46(1) /1994.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

9-13/05/06 32^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα:

Ιωάννου Ι., Χοχλάκης Δ., Παπαδόπουλος Β., Κασσίνης Ν., Ψαρουλάκη Α., Τσελέντης Γ. Arthropode-borne παθογόνα σε άγρια ζώα και αρθρόποδα στην Κύπρο.

18-20/05/08 5th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Μασσαλία, Γαλλία:

- 1) Anna Psaroulaki, Dimosthenis Chochlakis, Ioannis Ioannou, Artymnata Florentia, Achilleas Gikas, Tselentis Yannis. Identity of Anaplasma DNA sequence from sheep and goats with that obtained from a patient, in Cyprus.

- 2) Ioannis Ioannou, Dimosthenis Chochlakis, Vassilios Sandalakis, Byron Papadopoulos, Achilleas Gikas, Yannis Tselentis, Anna Psaroulaki. Tick-borne pathogens (*Rickettsia* sp., *Coxiella burnetii*, *Anaplasma* sp.) in ticks collected from domestic and wild animals, in Cyprus.
- 3) Ioannis Ioannou, Dimosthenis Chochlakis, Nikolaos Kasinis, Petros Anayiotos, Andreas Lyssandrou, Byron Papadopoulos, Yannis Tselentis, Anna Psaroulaki. Carriage of *Rickettsia* sp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* sp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus.

ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

- 1: Psaroulaki A, Chochlakis D, Ioannou I, Florentia A, Gikas A, Tselentis Y. Acute anaplasmosis in humans in Cyprus. *Clin Microbiol Infect.* 2009 May 18. [Epub ahead of print].
- 2: Psaroulaki A, Chochlakis D, Sandalakis V, Vranakis I, Ioannou I, Tselentis Y. Phylogenetic analysis of *Anaplasma ovis* strains isolated from sheep and goats using *groEL* and *mps4* genes. *Vet Microbiol.* 2009 Sep 18;138(3-4):394-400. Epub 2009 Apr 19. [PubMed - in process]
- 3: Ioannou I, Chochlakis D, Kasinis N, Anayiotos P, Lyssandrou A, Papadopoulos B, Tselentis Y, Psaroulaki A. Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Mar 11. [Epub ahead of print].
- 4: Chochlakis D, Ioannou I, Kokkini I, Tselentis Y, Psaroulaki A. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in a high-risk human population. *J Infect.* 2009 Jan;58(1):87-8.
- 5: Chochlakis D, Koliou M, Ioannou I, Tselentis Y, Psaroulaki A. Kawasaki disease and *Anaplasma* sp. infection of an infant in Cyprus. *Int J Infect Dis.* 2009 Mar;13(2):e71-3.
- 6: Chochlakis D, Ioannou I, Sharif L, Kokkini S, Hristophi N, Dimitriou T, Tselentis Y, Psaroulaki A. Prevalence of *Anaplasma* sp. in Goats and Sheep in Cyprus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009 Oct;9(5):457-63.
- 7: Psaroulaki A, Koliou M, Chochlakis D, Ioannou I, Mazeri S, Tselentis Y. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a child. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Jul;27(7):664-6.
- 8: Koliou M, Psaroulaki A, Georgiou C, Ioannou I, Tselentis Y, Gikas A. Murine typhus in Cyprus: 21 paediatric cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 Jul;26(7):491-3.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. ΟΙ ΚΡΟΤΩΝΕΣ	9
2. ΑΝΑΠΛΑΣΜΑΤΑ	13
2.1. Ταξινόμηση.....	13
2.2. Ιστορική αναδρομή	14
2.3. Βακτηριολογία.....	15
2.4. Αναπλαστώσεις - Επιδημιολογία / Μετάδοση	16
2.5. Κλινική εικόνα.....	19
2.6. Εργαστηριακά ευρήματα	19
2.7. Case definition	19
2.8. Εργαστηριακή διάγνωση.....	20
2.8.1. Δείγμα αίματος (με αντιπηκτικό)	20
2.8.2. Δείγμα ορού.....	21
2.9. Θεραπεία.....	21
2.10. Ερλιχώσεις/Αναπλνώσεις στα ζώα.....	21
3. ΡΙΚΕΤΣΙΕΣ	25
3.1. Ιστορική Αναδρομή	25
3.2. Ταξινόμηση.....	26
3.3. Βακτηριολογία.....	28
3.4. Διάκριση Ρικετσιώσεων ανάλογα με τον Μεταβιβαστή:.....	29
3.4.1. Ρικέτσιες με μεταβιβαστή τους ψύλλους.....	29
3.4.2. Ρικέτσιες με μεταβιβαστή τις ψείρες.....	30
3.4.3. Ρικέτσιες με μεταβιβαστή ακάρεα.....	31
3.4.4. Ρικέτσιες μεταδιδόμενες με τους κρότωνες.....	31
3.5. Οικολογία-Επιδημιολογία.....	35
3.6. Ρικετσιώσεις - Κλινική εικόνα.....	40
3.7. Εργαστηριακή διάγνωση.....	42
4. ΠΥΡΕΤΟΣ Q (<i>Coxiella burnetii</i>)	44
4.1. Ιστορική Αναδρομή - Ταξινόμηση	45
4.2. Βακτηριολογία.....	46
4.3. Οικολογία-Επιδημιολογία.....	49
4.3.1. Ο ρόλος των κροτώνων στη διατήρηση της <i>C. burnetii</i>	49
4.3.2. <i>C. burnetii</i> (Coxiellosis) και σπονδυλωτά-ξενιστές	50
4.3.3. <i>C. burnetii</i> (πυρετός Q) - Μετάδοση στον άνθρωπο	52
4.3.4. Η άμεση έκθεση σε ζώα	53
4.3.5. Η έμμεση έκθεση σε ζώα.....	54
4.3.6. Μετάδοση από άτομο σε άτομο.....	54
4.3.7. Βιοτρομοκρατία.....	54
4.3.8. Γεωγραφική κατανομή	55
4.3.9. Οροεπιδημιολογικές μελέτες σε γενικό υγιή πληθυσμό.....	56
4.4. Κλινική εικόνα.....	57
4.5. Εργαστηριακή διάγνωση.....	60
4.6. Θεραπεία.....	64
4.7. Πρόληψη.....	66
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	68
1. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	69
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	72
2.1. Γεωγραφικός χώρος - Κύπρος	72
2.2. Ανθρώπινος πληθυσμός.....	74

2.3. Ζώα τα οποία μελετήθηκαν	74
2.3.1. Αίγες	74
2.3.2. Πρόβατα	74
2.3.3. Αγελάδες	75
2.3.4. Σκύλοι	76
2.3.5. Αγρινά	77
2.3.6. Αλεπού	78
2.3.7. Λαγός	78
2.3.8. Επιδημητικά – Μεταναστευτικά πτηνά	79
2.4. Μεθοδολογία	81
2.4.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση-καταρτισμός πρωτοκόλλων	81
2.4.2. Δημιουργία βάσης δεδομένων και εγκατάσταση GIS	81
2.4.3. Δειγματοληψίες	82
2.4.4. Εργαστηριακός έλεγχος δειγμάτων	86
2.5. Ορολογική διερεύνηση σε ανθρώπινο πληθυσμό	89
2.6. Στατιστική ανάλυση και Γεωγραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων	89
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
1. ΠΑΡΑΣΙΤΙΣΜΟΣ	91
1.1. Παρασιτισμός των παραγωγικών ζώων	93
1.1.1. Παρασιτισμός των βοοειδών	93
1.1.2. Παρασιτισμός των αιγών και των προβάτων	95
1.1.3. Παρασιτισμός στους σκύλους	97
1.2. Παρασιτισμός από κρότωνα σε άγρια θηλαστικά και πτηνά	99
1.2.1. Παρασιτισμός στα αγρινά	99
1.2.2. Παρασιτισμός των αλεπούδων	100
1.2.3. Παρασιτισμός των λαγών	102
1.2.4. Παρασιτισμός των πτηνών	103
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	104
2.1. Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων έναντι του <i>A. phagocytophilum</i>	105
2.2. Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων έναντι της <i>R. conorii</i>	108
2.3. Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων έναντι της <i>C. burnetii</i>	112
2.4. Ορολογικός έλεγχος των σκύλων	116
2.5. Ορολογικός έλεγχος στους κτηνοτρόφους	118
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR	121
3.1. Γονοτυπική ανίχνευση των παθογόνων σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές	121
3.1.1. Δείγματα παραγωγικών ζώων	121
3.1.2. Δείγματα σκύλων	123
3.1.3. Δείγματα άγριων θηλαστικών και πτηνών	123
3.2. Γονοτυπική ανίχνευση στους κρότωνα	128
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	134
1. Παρασιτισμός	135
2. Παθογόνα	142
2.1. <i>Anaplasma spp.</i>	142
2.2. <i>Rickettsiae</i>	148
2.3. <i>Coxiella burnetii</i>	151
3. Συμπερασματικά	157
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	159
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	177

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι κρότωνες είναι μια πολυπληθής οικογένεια αρθροπόδων, που περιλαμβάνει πολλά είδη με παγκόσμια κατανομή. Παρασιτούν πολλά είδη σπονδυλωτών (παραγωγικά και άγρια ζώα) και κάποια είδη τον άνθρωπο. Λειτουργούν σαν μεταβιβαστές και/ή φορείς πολλών παθογόνων μικροοργανισμών (ιοί, βακτήρια, πρωτόζωα), συμβάλλοντας στη διατήρηση, την εξάπλωσή και τη διασπορά τους στη φύση. Ο ρόλος τους στη μετάδοση νόσων (άμεσα ή έμμεσα) σε διάφορα είδη σπονδυλωτών είναι σημαντικός και αποτελούν πρόβλημα υγείας για τον άνθρωπο και τα ζώα. Καταλαμβάνουν την πρώτη θέση ανάμεσα στα αρθρόποδα όσον αφορά τον αριθμό των παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να μεταβιβάσουν. Εμπλέκονται στον κύκλο μετάδοσης βακτηριακών νόσων (ρικετσιώσεις, νόσος Lyme, κρωτονογενής υπόστροφος πυρετός, τουλαραιμία, πυρετός Q, ερλιχώσεις, λοιμώξεις από *Bartonella* κλπ). Μεταφέρουν πρωτόζωα όπως η *Babesia spp* (πιροπλάσμωση). Είναι ενδιάμεσοι ξενιστές και/ή μεταβιβαστές περίπου 70 ειδών αρμοϊών, εκ των οποίων τουλάχιστον 20 προσβάλλουν τον άνθρωπο (αιμορραγικοί πυρετοί, ρωσική εγκεφαλίτιδα κ.λπ.).

Νόσοι που μεταδίδονται από κρότωνες σε παραγωγικά ζώα, συνιστούν ένα σημαντικό παράγοντα που περιορίζει την παραγωγή των ζώων. Μολυσμένοι κρότωνες που παρασιτούν ενδημικά ή μεταναστευτικά πτηνά, έχουν ιδιαίτερη σημασία, αφού μεταφέρουν παθογόνα σε μεγάλες αποστάσεις, προκαλώντας έτσι επιδημίες. Ειδικά για ζωνόσους που μεταβιβάζονται μέσω αρθροπόδων έχει παρατηρηθεί ότι οι κλιματολογικές και περιβαλλοντικές αλλαγές, επηρεάζουν τους κύκλους ζωής, τη βιωσιμότητά και τη δυναμική των πληθυσμών των μεταβιβαστών, με πιθανή συνέπεια τη διατάραξη ή τροποποίηση των επιδημιολογικών κύκλων και της οικογεωγραφίας των ζωνόσων. Τα παραπάνω επηρεάζουν τη διασπορά τους, με πιθανή την πρόκληση επιδημιών.

Τα τελευταία χρόνια εκδηλώνεται ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον από διεθνείς και ευρωπαϊκούς οργανισμούς για τη μελέτη, την πρόληψη και την επιτήρηση νέων ή αναδυόμενων ζωνόσων («emerging infectious diseases»), που στον κύκλο μετάδοσης τους εμπλέκονται αρθρόποδα ως μεταβιβαστές. Μόνο μετά το 1982 έχουν ανιχνευθεί στους κρότωνες 15 παθογόνα βακτήρια αίτια νέων αναδυόμενων νόσων (8 ρικέτσιες 3 ερλίχιες, και 4 είδη μπορέλλιας).

Περιβαλλοντικές αλλαγές (θερμοκρασία, κλίμα), αλλαγές του φυσικού ή ανθρωπογενούς περιβάλλοντος, όπως η απρογραμματίστη επέκταση, διόγκωση και τροποποίηση του αστικού και περιαστικού περιβάλλοντος, η αλλαγή χρήσης της γης, καθώς και νέες αγροτικές

δραστηριότητες και πρακτικές στις μεθόδους καλλιέργειας, φαίνεται ότι έχουν συνέπειες στην οικολογία και τη δυναμική των σπονδυλωτών–ξενιστών και των μεταβιβαστών (βιωσιμότητα, κύκλοι ζωής, δυναμική των πληθυσμών) και κατ' επέκταση των παθογόνων που μεταφέρουν με κίνδυνο την πρόκληση απρόβλεπτων επιδημιών. Τίθεται το τεράστιο πρόβλημα της αδυναμίας και ανεπάρκειας των υφιστάμενων συστημάτων ελέγχου προκειμένου να προβλεφθούν επιδημίες.

Στην Κύπρο υπάρχουν οι προϋποθέσεις για την εγκατάσταση και διασπορά παθογόνων που μεταδίδονται μέσω κροτώνων, αφού οι μεταβιβαστές απαντώνται σε όλες τις επαρχίες της χώρας και επίσης τα υπόδοχα ενδημούν στην Κύπρο, βρίσκονται σε όλες τις περιοχές και είναι καλά προσαρμοσμένα σε κάθε περιβάλλον. Επιπλέον, υφίστανται αυτόχθονες ενδημικές και ενζωτικές εστίες, υπάρχει εισαγωγή παθογόνων μικροοργανισμών είτε με μολυσμένα άγρια ζώα φορείς παθογόνων (πχ μεταναστευτικά πτηνά), είτε με κατοικίδια /παραγωγικά που εισάγονται παράνομα από την κατεχόμενη Κύπρο. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας και της οικογεωγραφίας παθογόνων βακτηρίων μεταδιδόμενων μέσω των κροτώνων: των ρικετσιών που μεταδίδονται με τους κρότωνα (tick-borne rickettsiae), των ερλιχιών-αναπλασμάτων και της *C. burnetti* στην Κύπρο. Τα μολυσμένα θηλαστικά-ξενιστές και οι μεταβιβαστές λειτούργησαν σαν δείκτης για να εντοπιστεί και να αναδειχτεί το κάθε παθογόνο.

Στην Κύπρο δεν υπήρχαν δεδομένα για μια ομάδα αναδυόμενων ζωνόσων των αναπλασμών-ερλιχιώσεων, και παντελής έλλειψη στοιχείων όσον αφορά στην παρουσία των αναπλασμάτων καθώς και των αρθροπόδων-μεταβιβαστών και θηλαστικών –ξενιστών που εμπλέκονται στον κύκλο ζωής τους. Αντίθετα, προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν στην Κύπρο από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας Ζωνόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης είχαν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι ρικετσιώσεις, ιδιαίτερα ο ο Μεσογειακός Κηλιδώδης Πυρετός (ΜΚΠ) και ο ενδημικός τύφος αποτελούν πρόβλημα υγείας για το νησί. Σε οροεπιδημιολογική μελέτη που έγινε το 1997 από το Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας Ζωνόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου σε αντιπροσωπευτικό δείγμα ανθρώπινου πληθυσμού κατανεμημένο σ' όλη την ελεύθερη Κύπρο, ένα υψηλό ποσοστό του υγιούς πληθυσμού εμφάνισε αντισώματα έναντι της *R.sopori*. Την ίδια περίοδο, μέσα στα πλαίσια της εκπόνησης διδακτορικής διατριβής με θέμα « Επιδημιολογική έρευνα του Πυρετού Q στο

ζωικό και ανθρώπινο πληθυσμό της Κύπρου με τη χρήση του συστήματος μηχανογραφημένης χαρτογράφησης» επιβεβαιώθηκαν παλαιότερες αναφορές που υποδείκνυαν την ενδημικότητα της *C. burnetii* στο νησί (Διατριβή Δρ. Φ. Λουκαΐδη).

Η προσέγγιση που προτείνεται στην παρούσα μελέτη είναι η αναζήτηση, ανίχνευση ή απομόνωση των αιτιολογικών παθογόνων παραγόντων που κυκλοφορούν σε μια περιοχή στους φυσικούς τους φορείς δηλαδή τα αρθρόποδα-μεταβιβαστές και τα σπονδυλωτά-υπόδοχα. Ένας πρώτος έλεγχος (screening) των μεταβιβαστών έχει το σημαντικό πλεονέκτημα ότι είναι ένας γρήγορος και αποτελεσματικός τρόπος για να αποκτηθεί μια σαφής εικόνα για τη διασπορά του παθογόνου παράγοντα σε μια δεδομένη γεωγραφική περιοχή. Με την παραπάνω προσέγγιση, είναι δυνατός ο εντοπισμός περιοχών υψηλού κινδύνου και ενδημικών περιοχών στις οποίες θα γίνεται συστηματική επιτήρηση, στον άνθρωπο και στα ζώα, και θα σχεδιάζονται μέτρα περιορισμού της διασποράς και της μετάδοσης μιας ζωνόσου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κρότωνες είναι αιματοφάγα αρθρόποδα με παγκόσμια κατανομή. Παρασιτούν πολλά είδη σπονδυλωτών και κάποια είδη τον άνθρωπο. Θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς μεταβιβαστές και/ή φορείς ενός ευρέος φάσματος παθογόνων μικροοργανισμών, παρασιτώντας παραγωγικά ζώα, και ενδημικά ή μεταναστευτικά πτηνά, μεταφέροντας παθογόνα σε μεγάλες αποστάσεις, προκαλώντας έτσι επιδημίες.

Στην παρούσα εργασία έγινε καταγραφή των ειδών των κροτώνων που ενδημούν στην Κύπρο και προσδιορίστηκε η γεωγραφική και εποχιακή κατανομή τους και ο βαθμός διασποράς τους στα ζώα. Διερευνήθηκε ο ρόλος των κροτώνων στη μετάδοση και τη διασπορά 3 ομάδων παθογόνων βακτηρίων: *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsiae*, *Coxiella burnetii*. Τα παραπάνω βακτήρια αναζητήθηκαν τόσο στους κρότωνες, όσο και σε σπονδυλωτά-ξενιστές: σε παραγωγικά ζώα, σε άγρια ζώα και μεταναστευτικά πτηνά. Η παρούσα εργασία περιελάμβανε οικογεωγραφική και εργαστηριακή μελέτη, μελέτη της αλυσίδας μετάδοσης των παθογόνων, Εντοπίστηκαν καθορίστηκαν και χαρτογραφήθηκαν περιοχές υψηλού κινδύνου («high risk regions») για τα παθογόνα, στις οποίες έγινε μελέτη της αλυσίδας μετάδοσης, και μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση.

Από παραγωγικά ζώα και κατοικίδια, ζώα συντροφιάς, συλλέχθηκαν 1761 κρότωνες που ταξινομήθηκαν σε 7 είδη (*Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma marginatum rufipes*, *Ixodes gibossus*). Από άγρια ζώα συλλέχθηκαν 1315 κρότωνες που ταξινομήθηκαν σε 10 είδη (*Haemaphysalis sulcata*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus pusillus*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Ixodes gibossus*, *Ixodes ventalloi*). Ελήφθησαν δείγματα αίματος από αντιπροσωπευτικό δείγμα απ' όλη την Κύπρο από παραγωγικά ζώα (346 αίγες, 333 πρόβατα, 338 βοοειδή), και προσδιορίστηκε με τη χρήση του έμμεσου ανοσοφθορισμού η οροθετικότητα για τα υπό μελέτη παθογόνα, ενώ με τη μέθοδο της PCR έγινε προσπάθεια για την γονοτυπική ανίχνευση τους. Επιπλέον ελέγχθηκαν δείγματα αίματος από 139 σκύλους. Ελέγχθηκε επίσης και προσδιορίστηκε η οροθετικότητα σε δείγμα ανθρώπινου υγιούς πληθυσμού. Αριθμός 910 δειγμάτων αίματος από άγρια ζώα ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR για την ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων.

A) Ehrlichiae – *Anaplasma phagocytophilum*Σπονδυλωτά-ξενιστές

Οι αναπλάσμοι ενδημούν στην Κύπρο, τόσο στα ζώα όσο και στα εκτοπαράσιτα τους. Σε παραγωγικά ζώα ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι του *Anaplasma phagocytophilum* και στις 5 επαρχίες της Κύπρου και στα 3 είδη ζώων :18% στις αίγες, 30% στα πρόβατα, 57% στα βοοειδή. Στα παραγωγικά ζώα, με τη χρήση της PCR ανιχνεύτηκε *Anaplasma* sp DNA σε αίγες (56%) και πρόβατα (51%). Δεν ανιχνεύτηκε *Anaplasma* sp. στα σκυλιά. Στα άγρια ζώα, *Anaplasma* sp DNA ανιχνεύτηκε στα αγρινά (9%), σε λαγούς (48%) και αλεπούδες (70%). *Anaplasma* sp DNA, επίσης ανιχνεύτηκε στα πτηνά (37%).

Μεταβιβαστές

Με τη χρήση της PCR ανιχνεύτηκε *Anaplasma* sp. σε κρότωνα του είδους *H. sulcata* που συλλέχθηκαν από αγρινά, σε κρότωνα του είδους *R. turanicus* που παρασιτούσαν λαγούς αλλά και αλεπούδες, σε κρότωνα του είδους *R. sanguineus* και *I. ventralloii* που είχαν συλλεγεί από λαγούς. *Anaplasma* sp DNA ,ανιχνεύτηκε επίσης στον πιο κοινό κρότωνα των σκυλιών, τον *R. sanguineus*.

B) RickettsiaeΣπονδυλωτά-ξενιστές

Καταγράφηκε υψηλός οροεπιπολασμός έναντι της *Rickettsia conorii* στα παραγωγικά ζώα : 82% στις αίγες, 75% στα πρόβατα, 46% στα βοοειδή. Δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA στα δείγματα αίματος που ελέγχθηκαν σε κανένα από τα 3 είδη ζώων. Μεγάλο ποσοστό των σκυλιών ήταν ορολογικά θετικά (75.5%), δεν ανιχνεύτηκε όμως ρικετσιακό DNA. Στο ¼ των αγρινών ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA. Ρικετσιακό DNA ανιχνεύθηκε επίσης στους λαγούς μόνο στην επαρχία Πάφου, καθώς επίσης και σε διάφορα είδη πτηνών (2%)

Μεταβιβαστές

Ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA σε κρότωνα που παρασιτούσαν τα πρόβατα (*H. anatolicum excavatum*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *R. turanicus*) και τις αίγες (*R. bursa*, *R. turanicus*). Πιο συγκεκριμένα: σε κρότωνα του είδους *R. turanicus* που παρασιτούσε σε αίγες, τυποποιήθηκε η *Rickettsia aeschlimannii* καθώς και ένα variant της *Rickettsia africae*. Η *Rickettsia massilliae* τυποποιήθηκε από κρότωνα *R. bursa* που συλλέχθηκαν από αίγες Η *Rickettsia rhipicephali* ανιχνεύτηκε και τυποποιήθηκε σε κρότωνα του είδους *R. bursa*, καθώς επίσης και στους κρότωνα *R. turanicus* και *H. anatolicum excavatum* που παρασιτούσαν πρόβατα.

Στα εκτοπαράσιτα των βοοειδών δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA, ενώ ρικετσιακό DNA ανιχνεύθηκε σε κρότωναes του είδους *R. sanguineus* (ανιχνεύθηκε *Rickettsia massilliae*) και *R. turanicus* (ανιχνεύθηκε variant της *Rickettsia africae* και *Rickettsia massilliae*), που συλλέχθηκαν από σκυλιά. Ρικετσιακό DNA ανιχνεύθηκε στα εκτοπαράσιτα που συλλέχθηκαν από αγρινά (*H. sulcata*, *H. punctata*, *R. bursa*, *R. turanicus*). Πιο συγκεκριμένα: σε κρότωνα του είδους *H. punctata* ταυτοποιήθηκε *Rickettsia felis*, ενώ σε κρότωνα του είδους *R. turanicus* βρέθηκε variant της *Rickettsia africae*.

Ρικετσιακό DNA βρέθηκε σε κρότωναes που συλλέχθηκαν από λαγούς (*R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. pusillus*) όσο και σε αλεπούδες (*R. turanicus*), καθώς επίσης και σε κρότωναes του είδους *I. ventalloi* που παρασιτούσαν πέρδικες. Η *Rickettsia rhipicephali* ανιχνεύτηκε και τυποποιήθηκε σε κρότωναes του είδους *R. turanicus* που συλλέχθηκαν από λαγούς και η *Rickettsia massilliae* ανιχνεύτηκε σε κρότωναes *R. turanicus* που συλλέχθηκαν τόσο από λαγούς όσο και από αλεπούδες.

Γ) *Coxiella burnetii*

Σπονδυλωτά-ξενιστές

Η *C. burnetii* υπάρχει και ευδοκιμεί στην Κύπρο με μεγάλη διασπορά τόσο στα ζώα όσο και στα εκτοπαράσιτα τους. Υψηλά ποσοστά οροθετικότητας βρέθηκαν και στα 3 είδη παραγωγικών ζώων. Ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι του παθογόνου και στις 5 επαρχίες της Κύπρου και στα 3 είδη ζώων : 84% στις αίγες, 81% στα πρόβατα, 40% στα βοοειδή. Χαμηλά ποσοστά οροθετικότητας αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii* παρατηρήθηκε στα σκυλιά (3.5%). Με τη μέθοδο PCR δεν ανιχνεύθηκε η *C. burnetii* στις αίγες, στα πρόβατα, στα βοοειδή και στους σκύλους, ενώ αντίθετα ανιχνεύθηκε στο ¼ των αγρινών, σε λαγούς (48%), σε αλεπούδες (30%) και σε διάφορα είδη πουλιών (31%).

Μεταβιβαστές

Η *C. burnetii*, ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο PCR σε κρότωναes του είδους *R. turanicus* και *R. bursa*, που παρασιτούσαν τις αίγες, σε κρότωναes του είδους *R. turanicus*, *R. bursa*, *H. anatolicum excavatum* και *H. marginatum marginatum* που παρασιτούσαν στα πρόβατα, σε κρότωναes του είδους *H. anatolicum excavatum* και *R. turanicus* που συλλέχθηκαν από βοοειδή και σε κρότωναes του είδους *R. sanguineus* και *R. turanicus* που συλλέχθηκαν από σκυλιά.

Ανιχνεύτηκε επίσης, σε κρότωναes *H. anatolicum excavatum*, *H. punctata*, *H. sulcata*, *R. turanicus* και *R. bursa*, που παρασιτούσαν τα αγρινά, σε κρότωναes *R. turanicus*, που

αφαιρέθηκαν από αλεπού, και σε κρότωναes των ειδών *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *I. ventalloi* που αφαιρέθηκαν από λαγούς. Τέλος η *C. burnetii* ανιχνεύτηκε και σε κρότωναes του είδους, *I. ventalloi* που αφαιρέθηκαν από πέρδικες, το μοναδικό είδος πτηνού που βρέθηκε να παρασιτείται από κρότωναes.

Δ) Ανθρώπινος πληθυσμός

Από τα 187 ανθρώπινα δείγματα αίματος που ελέγχθηκαν, τα 127 (68%) βρέθηκαν θετικά για IgG αντισώματα έναντι της *C. burnetii* με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Αμμοχώστου (89%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Λευκωσίας (53%).

Η ορολογική διερεύνηση έναντι της *R. conorii* ανέδειξε από τα 187 δείγματα που εξετάστηκαν, 62 θετικά, δηλαδή οροθετικότητα της τάξης του 33%, με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Λάρνακας (51%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Πάφου (17%).

Τέλος, από τα 187 δείγματα που ελέγχθηκαν, τα 58 (31%) βρέθηκαν θετικά για IgG αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Πάφου (58%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Λάρνακας (24%).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι, ο βαθμός έκθεσης της ομάδας του ανθρώπινου πληθυσμού που ελέγχθηκε (κτηνοτρόφοι κλπ) ήταν αρκετά ψηλός και ότι τα ποσοστά θετικότητας είναι σημαντικά ψηλά, που αναδεικνύουν την συσχέτιση του κινδύνου μόλυνσης σε πληθυσμούς ψηλού κινδύνου.

Από τα παραπάνω αναδεικνύεται η ανάγκη καταρτισμού προγράμματος αντιμετώπισης και πρόληψης της κάθε ζωνόσου για την προστασία τόσο των ζώων όσο και του ανθρώπινου πληθυσμού.

1. ΟΙ ΚΡΟΤΩΝΕΣ

Ταξινόμηση

Φύλο : Arthropoda

Κλάση: Arachnida

Τάξη: Ixodida

Υπεροικογένεια: Ixodoidea

Οικογένειες: Ixodidae

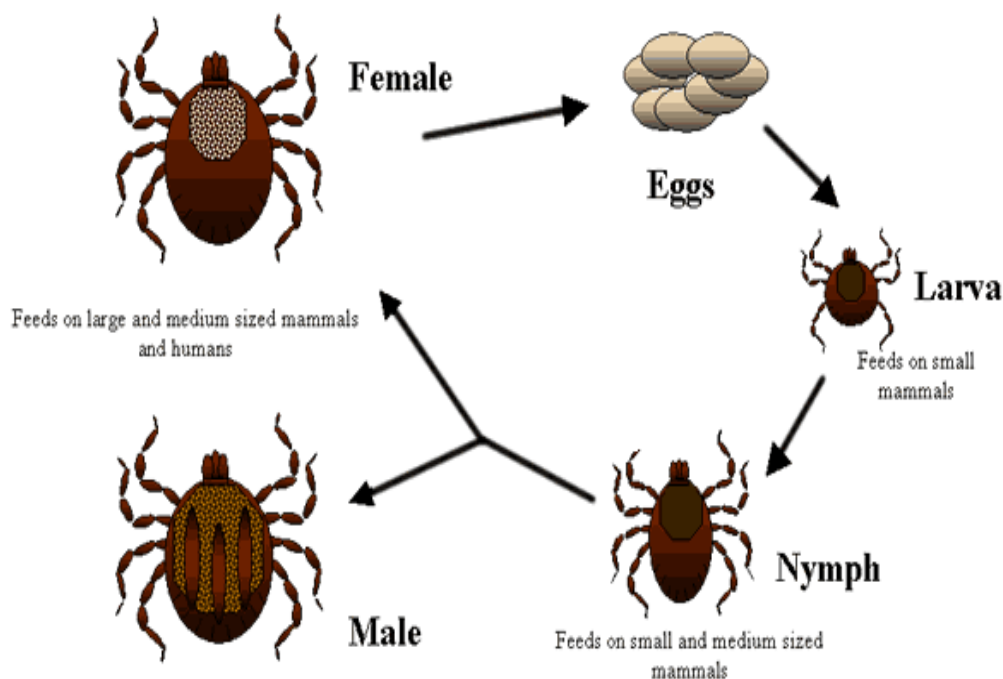
Argasidae

Nuttallidae



Οι κρότωνες είναι αιματοφάγα, αρθρόποδα εκτοπαράσιτα, σε θηλαστικά, πτηνά, ερπετά και αμφίβια. Διακρίνονται στους μαλακούς (*Argasidae*) και τους σκληρούς (*Ixodidae*) κρότωνες (Πίνακας I). Οι μαλακοί κρότωνες (*Argasidae*) χρησιμοποιούν ως ενδιαιτήματα φωλιές ζώων, κοτέτσια, περιστερώνες, στάβλους χοίρων, καλύβες σε υποβαθμισμένες περιοχές, σπήλαια, κ.λπ. Ο βιολογικός τους κύκλος αποτελείται από ένα μοναδικό στάδιο προνύμφης (larva), 2 έως 7 στάδια νύμφης και το ενήλικο αρσενικό και θηλυκό. Η προνύμφη και οι νύμφες τρέφονται με αίμα μια φορά για να μεταμορφωθούν στο επόμενο στάδιο. Τα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά, αντίθετα, τρέφονται πολλές φορές κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας ζωής τους (μέχρι και 16 χρόνια), έχουν δε την ικανότητα να επιβιώνουν χωρίς τροφή για μήνες ή χρόνια. Το ζευγάρι των μαλακών κροτώνων γίνεται αποκλειστικά μακριά από τους ξενιστές τους. Οι θηλυκοί μαλακοί κρότωνες, αφού τραφούν με αίμα, αυξάνουν το βάρος τους 5-6 φορές και γεννούν μερικές εκατοντάδες αυγά. Κάποια είδη μαλακών κροτώνων, έχουν την ικανότητα ωοτοκίας χωρίς να έχει προηγηθεί λήψη γεύματος (autoeny). Οι σκληροί κρότωνες (*Ixodidae*) έχουν ένα μόνο στάδιο νύμφης. Στο βιολογικό τους κύκλο (Εικόνα I), ανάλογα με το είδος, εμπλέκονται ένας, δύο ή τρεις διαφορετικοί ξενιστές σε διάστημα 1 έως 3 χρόνια. Τα περισσότερα είδη σκληρών κροτώνων απαντώνται σε βιότοπους όπου υπάρχει μεγάλη ποικιλία άγριων, κατοικίδιων ή παραγωγικών ζώων που προσφέρουν ευνοϊκές συνθήκες στην ομαλή εξέλιξη του κύκλου. Σε αντίθεση με τους μαλακούς κρότωνες, οι σκληροί προσκολλώνται στον ξενιστή παθητικά όταν έλθουν σ' επαφή με αυτόν, ελκόμενοι από τις εκπομπές θερμότητας και διοξειδίου του άνθρακα που εκλύεται από το σώμα του ξενιστή και παραμένουν προσκολλημένοι σ' αυτόν ημέρες και ενίοτε εβδομάδες, απομυζώντας αρχικά κυτταρικό υγρό και στη συνέχεια αίμα. Το ζευγάρι των σκληρών κροτώνων

(Εικόνα II), λαμβάνει χώρα επί των ξενιστών με μερικές μόνον εξαιρέσεις όπου γίνεται προτού οι κρότωνα προσκολληθούν στου ξενιστές .



Εικόνα I : Ο κύκλος ζωής των σκληρών κροτώνων

Πολύ σημαντικό δεδομένο αποτελεί το γεγονός ότι, η δραστηριότητα των κροτώνων συνδέεται άμεσα με την αύξηση της θερμοκρασίας (θερμότερο κλίμα) η οποία επιφέρει και αύξηση των κρουσμάτων κροτωγενών νοσημάτων (Pagola και άλλοι, 2008).

Οι θηλυκοί, σκληροί κρότωνα ως επί το πλείστον αφού πάρουν ένα γεύμα αίματος, αυξάνουν το βάρος τους 100 περίπου φορές και αφού ζευγαρώσουν πέφτουν στο έδαφος και μετά από μία περίοδο πέψης όπου επωάζουν εντός του σώματος τους τα αυγά για 15 ή περισσότερες μέρες, γεννούν αρκετές χιλιάδες αυγά (μέχρι και 20.000) και πεθαίνουν (Εικόνα III). Σε αντίξοες συνθήκες, έχουν την ικανότητα να καθυστερούν την ωοτοκία, εισερχόμενα σε μία φάση μειωμένου μεταβολισμού (diapause state).

Οι κρότωνα είναι μεταβιβαστές ιών, βακτηριών, ρικετσιών, πρωτοζώων και ελμίνθων [Estrada Pena A. και Jongejan F., 1999]. Σε ορισμένες περιπτώσεις λειτουργούν και σαν υπόδοχα αφού ορισμένοι από αυτούς έχουν την ικανότητα να μεταβιβάζουν κάποια από τα παθογόνα είτε από το ένα εξελικτικό στάδιο στο άλλο (transtadial transmission) είτε από γενεά σε γενεά μέσω των ωοθηκών στην καινούργια γενιά (transovarial

transmission). Θεωρούνται ότι αποτελούν παγκοσμίως, το δεύτερο είδος μεταβιβαστών ασθενειών για τον άνθρωπο, μετά τα κουνούπια και ως τους πιο σημαντικούς μεταβιβαστές παθογόνων τα οποία προκαλούν ασθένειες σε κατοικίδια και άγρια ζώα [Parola P. και Raoult D, 2001]. Διαθέτουν μια σειρά από χαρακτηριστικά τα οποία τους προσδίδουν την ικανότητα των δεινών μεταβιβαστών ασθενειών. α) Προσαρμοστικότητα ως προς τις αλλαγές των ειδών των ξενιστών που συμβαίνουν στο περιβάλλον τους και αντιμετώπιση των αντίξοων γι' αυτούς κλιματολογικών αλλαγών και αντίσταση στην πείνα με την ικανότητα να πέφτουν σε κατάσταση νάρκης (η οποία, στους μαλακούς κρότωνες μπορεί να διαρκέσει για ένα χρόνο ή και περισσότερο). β) Η σταθερή προσκόλλησή τους επί των ξενιστών (κυρίως των Ixodidae) η οποία καθιστά δύσκολη την απομάκρυνσή τους και ο αργός ρυθμός λήψης των γευμάτων με αποτέλεσμα να παραμένουν αρκετό χρόνο μυζώντας αίμα και μεταδίδοντας παθογόνα. γ) Υψηλή ικανότητα διασποράς των ιδίων καθώς και των παθογόνων που μεταφέρουν, παρασιτώντας κινούμενους σε μεγάλες αποστάσεις ξενιστές, όπως μεγάλα θηλαστικά και ιδιαίτερα πτηνά τα οποία μεταφέρουν κρότωνες και παθογόνα διηπειρωτικά δ) Μεγάλη αναπαραγωγική δυναμική με την ικανότητα παραγωγής, ανάλογα με το είδος εκατοντάδων ή χιλιάδων αυγών ε) Ευρύ φάσμα ξενιστών το οποίο περιλαμβάνει μικρά και μεγάλα θηλαστικά, πτηνά, ερπετά και αμφίβια, διασπείροντας τις ασθένειες σε μεγάλη ποικιλία ειδών. ζ) Η παραγωγή και έκκριση σάλιου κατά τη διάρκεια του δαγκώματος και της μύζησης αίματος, το οποίο διαθέτει αναισθητικές, αντιπηκτικές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκασταλτικές ιδιότητες, διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη μετάδοση παθογόνων παραγόντων.

Οι κρότωνες μεταδίδουν: ρικέτσιες των κηλιδοβλατιδωδών πυρετών, τη νόσο Lyme, τον κροτωνογενή υπόστροφο πυρετό (Tick-borne relapsing fever), την τουλαραιμία, τον πυρετό Q, την προπλάσμωση (*Babesia spp.*) και την ερlichίωση (*Ehrlichia spp.*). Οι κρότωνες είναι επίσης ενδιάμεσοι ξενιστές για περίπου 70 είδη αρμοϊών, εκ των οποίων τουλάχιστον 20 προσβάλλουν τον άνθρωπο, όπως ο αιμορραγικός πυρετός του Omsk, η Ρωσική εγκεφαλίτιδα άνοιξης - θέρους, η νόσος του δάσους Kyasanur, ο πυρετός του Κολοράντο, ο αιμορραγικός πυρετός Κριμαίας - Κογκό, κ.λπ. [Wimberly MC. και άλλοι, 2008].

Εκτός της μετάδοσης ασθενειών, ορισμένοι κρότωνες, συνεπεία της έκκρισης νευροτοξίνης μπορούν να προκαλέσουν παράλυση των ξενιστών τους οποίους παρασιτούν (κροτωγενής παράλυση). Επίσης δυνατό να προκαλέσουν ερεθισμούς, την εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων, καθώς και όταν το παρασιτικό φορτίο είναι μεγάλο, σοβαρής μορφής αναιμία.

<u>FAMILY</u>	<u>MORE COMMON GENERA</u>	<u>NUMBER OF SPECIES</u>
<i>Argasidae</i> Soft ticks	<i>Antricola</i> <i>Argas</i> <i>Otobius</i> <i>Ornithodoros</i>	4 140 2 90
<i>Ixodidae</i> - Group 1: Prostriata Hard ticks	Purely the genus <i>Ixodes</i>	Approx 250
<i>Ixodidae</i> - Group 2: Metastrata Hard ticks	<i>Amblyomma</i> <i>Aponomma</i> <i>Anocentor</i> <i>Boophilus</i> <i>Dermacentor</i> <i>Haemaphysalis</i> <i>Hyalomma</i> <i>Rhipicephalus</i> <i>Margaropus</i>	100 26 1 5 31 150 21 63 3
<i>Nuttalliellidae</i> - morphological features of both the <i>Argasidae</i> and <i>Ixodidae</i>	<i>Nuttalliella namaqua</i>	Lone species found in South Africa and Tanzania.

Πίνακας I : Κατάταξη των κροτώνων (BADA-UK)



Εικόνες II και III: Ζευγάρισμα και ωοτοκία σκληρών κροτώνων (BADA-UK)

2. ΑΝΑΠΛΑΣΜΑΤΑ

Η οικογένεια Anaplasmataceae (πρώην Ehrlichiae) περιλαμβάνει υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια τα οποία προσβάλλουν τα κύτταρα του αίματος (λευκοκύτταρα –ερυθροκύτταρα) του ανθρώπου και των ζώων. Στον κύκλο μετάδοσής τους εμπλέκονται διάφορα είδη θηλαστικών που λειτουργούν σαν υπόδοχα και αρθρόποδα, κυρίως κρότωνες που λειτουργούν σαν μεταβιβαστές.

2.1. Ταξινόμηση

Το γένος *Ehrlichia* αρχικά κατατάχθηκε στην ομάδα Ehrlichiae, της οικογένειας Rickettsiaceae, της τάξης Rickettsiales. Το γένος περιελάμβανε 7 αναγνωρισμένα είδη: *E.canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi*, *E. phagocytophila*, *E. risticii*, *E. ewingii*, and *E. sennetsu* [Dumler JS. και Bakken JS., 1998].

Επιπλέον είχαν προταθεί παρακάτω είδη που προκαλούν ασθένειες στα ζώα: «*E. platys*», «*E. bovis*», «*E. ovina*» και «*E. ondiri*». Τα ονόματα των τελευταίων οργανισμών βρίσκονται σε εισαγωγικά γιατί δεν έχουν προταθεί επίσημα σύμφωνα με τους κανόνες του Διεθνούς Κώδικα για την ονοματολογία των Βακτηρίων. Πρόσφατα και με την εισαγωγή των σύγχρονων, μοριακών φυλογενετικών εργαλείων, κατέστη δυνατή μία επαναταξινόμηση αλλά και αλλαγή στην ονοματολογία καθώς και αναδιανομή της δομής της μεγάλης οικογένειας των Rickettsiaceae. Τα προηγούμενα αφορούσαν στη νέα τοποθέτηση των ειδών της *Ehrlichia*, της *Neorickettsia* και της *Wolbachia* στο γένος των Ehrlichieae, στη νέα τοποθέτηση της *E. sennetsu* και της *E. risticii* στο γένος *Neorickettsia* και της *Cowdria ruminantium* στο γένος *Ehrlichia*. Κατέστη επίσης δυνατή η ομαδοποίηση των *E. phagocytophila*, *E. equi* και του ανθρώπινου κοκιοκυτταρικού παράγοντα της ερλιχίωσης σαν ένα ενιαίο είδος, οριζόμενο τώρα ως *A. phagocytophilum*, καθώς και η νέα τοποθέτηση των *E. platys* και *E. bovis* επίσης στο γένος *Anaplasma* [Dumler JS. και άλλοι, 2001].

Από τα παραπάνω είδη, την παθολογία του ανθρώπου ενδιαφέρουν κυρίως οι: *E. sennetsu*, *E. chaffeensis* και η *E. phagocytophila*. Η *E. sennetsu* που προκαλεί την ιαπωνική λοιμώδη μονοπυρήνωση ή γαγγλιακό πυρετό ήταν η πρώτη παθογόνος νόσος που περιγράφηκε στον άνθρωπο (1954) [Inokuma H. και άλλοι, 2001], ενώ πολύ αργότερα, το 1986 περιγράφηκε η αμερικανική ερλιχίωση με την ανακάλυψη της *E. Chaffeensis*, η οποία έχει σαν κύτταρα στόχο, τα μονοκύτταρα και προκαλεί την ανθρώπινη μονοκυτταρική ερλιχίωση (HME). Ο μεταβιβαστής της *E. chaffeensis*, κρότωνας Lone star δεν υπάρχει στην Ευρώπη όπου δεν έχουν περιγραφεί κρούσματα μέχρι σήμερα [Dumler JS. 2005]. Αντίθετα στην Ευρώπη έχει

περιγραφεί η κοκκιοκυτταρική ερλιχίωση του ανθρώπου (HGE, σήμερα αναπλάσμωση) για την οποία οι αιτιολογικοί παράγοντες που έχουν περιγραφεί είναι βακτήρια της γενομικής ομάδας της *E. phagocytophilum* [Bakken JS. και Dumler JS. 2000] και μεταβιβαστής ο κρότωνας *Ixodes ricinus*.

2.2. Ιστορική αναδρομή

Οι αναπλασματώσεις (πρώην ερλιχιώσεις) είναι ζωνόσοι που συνήθως παίρνουν το όνομα τους ανάλογα με τα ζώα και τον τύπο των λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία προσβάλλουν.

Έτσι, αρχικά κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου-στόχου (κοκκιοκύτταρο, λεμφοκύτταρο, μονοκύτταρο, αιμοπετάλιο), και οι κατηγορίες νόσων έχουν ονομαστεί κοκκιοκυτταρική ή μονοκυτταρική ερλιχίωση. Παρ' όλα αυτά, αυτού του είδους η ταξινόμηση μπορεί να αποβεί παραπλανητική γιατί κάποια από τα είδη έχουν βρεθεί σε κύτταρα διαφορετικά από αυτά τα οποία συνήθως προσβάλλουν. Επιπρόσθετα, περισσότερα από ένα είδη μπορεί να ευθύνονται για την ευρεία κατηγορία «μονοκυτταρική» ή «κοκκιοκυτταρική» ερλιχίωση.

Αρχικά, η ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση (HGA) προσδιορίστηκε το 1990 σε έναν ασθενή του Wisconsin που πέθανε από εμπύρετο νόσημα 2 εβδομάδες μετά από δάγκωμα από κρότωνα. Κατά τη διάρκεια του τελικού σταδίου της λοίμωξης, αθροίσματα μικρών βακτηρίων ανιχνεύθηκαν μέσα σε ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος, τα οποία βακτήρια κατηγοριοποιήθηκαν σαν gram θετικοί κόκκοι. Αργότερα, προσεκτικότερη παρατήρηση της κηλίδας του αίματος ανέδειξε προσβολή των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Ο ορολογικός και ανοσο-ιστοχημικός έλεγχος ήταν θετικοί για *E. chaffeensis* [Chen SM. και άλλοι, 1994]. Η *E. chaffeensis* μεταδίδεται μεταξύ άλλων στον άνθρωπο και τα σκυλιά από τον κρότωνα Lone Star και προκαλεί την ανθρώπινη μονοκυτταρική ερλιχίωση (HME) [Zhang JZ. και άλλοι, 2007]. Τελικά η ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση για πρώτη φορά περιγράφηκε στις ΗΠΑ το 1994 [Bakken JS. και άλλοι, 1994].

Στις ΗΠΑ, από το 1986, τουλάχιστον 1.979 ανθρώπινες περιπτώσεις HME και 2.189 περιπτώσεις HGA έχουν αναφερθεί στο CDC [Dumler JS. και άλλοι, 2007]. Αυτοί οι αριθμοί τοποθετούν το HGA και το HME τρίτο και τέταρτο ανάμεσα στις πιο κοινές κροτωνογενείς (tick-borne) λοιμώξεις στις ΗΠΑ πίσω από τη νόσο του Lyme και τον πυρετό των βραχωδών ορέων (rocky mountain fever) [Demma LJ. και άλλοι, 2005].

Αξιίζει να αναφερθεί ότι ο κύκλος ζωής του *A. phagocytophilum* εμφανίζεται να είναι παρόμοιος με αυτόν του *Borrelia burgdorferi* που προκαλεί τη νόσο του Lyme. Έτσι γεωγραφικές περιοχές στις οποίες έχει αναφερθεί η παρουσία του *A. phagocytophilum* επικαλύπτουν περιοχές όπου η νόσος του Lyme ενδημεί. Σε ασθενείς στην Ευρώπη έχουν αναφερθεί ποσοστά από 7.5% ως 24% συν-λοίμωξης από *A. phagocytophilum* και *B. burgdorferi* [Loebermann M. και άλλοι, 2006]. Θα πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι τα φάρμακα της κατηγορίας των τετρακυκλίνων δεν είναι ενεργά ενάντια στην *Borrelia microti*, κατά συνέπεια απαιτείται προσεκτική κλινική και εργαστηριακή ανάλυση των αποτελεσμάτων και των εκδηλώσεων ώστε να εξασφαλιστεί η χορήγηση της ενδεδειγμένης θεραπείας.

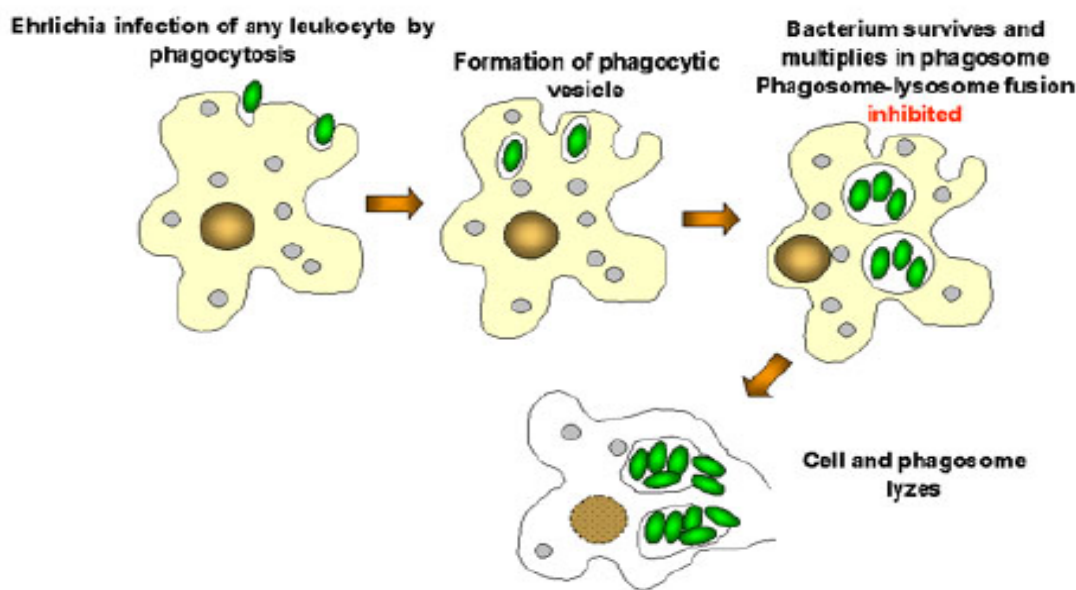
Στην Ευρώπη το *A. phagocytophilum* είχε αναγνωριστεί στα ζώα από τη δεκαετία του 1930 [Stuen S., 2007]. Έχει ανιχνευτεί με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) σε κρότωνες του γένους *Ixodes* σε Γαλλία, Σλοβενία, Σουηδία, Ολλανδία, Ιταλία, Βουλγαρία, Ρωσία και Γερμανία [Blanco JR. και Oteo JA., 2002]. Πρώτη περίπτωση αναπλάσματος στον άνθρωπο αναφέρθηκε στη Σλοβενία το 1995 [Petrovec M. και άλλοι, 1997] και από τότε πάνω από 60 περιπτώσεις έχουν επιβεβαιωθεί εργαστηριακά (Ολλανδία, Σουηδία, Σλοβενία, Ισπανία, Αυστρία, Πολωνία, Γαλλία) [Blanco JR. και Oteo JA., 2002] Ιταλία [de la Fuente J. και άλλοι, 2005]. Περιστατικά λοίμωξης από τον HGA έχουν αναφερθεί και σε χώρες όπως η Κίνα [Wen B. και άλλοι, 2003], η σιβηρική Ρωσία και η Κορέα [Dumler JS. και άλλοι, 2005]. Τελευταίες μελέτες περικλείουν και τα αποδημητικά – μεταναστευτικά πουλιά στους πιθανούς φορείς μετάδοσης της νόσου [Daniels TJ. και άλλοι, 2002]. Σε Ελλάδα και Κύπρο μόλις πρόσφατα έχουν αναφερθεί περιστατικά της συγκεκριμένης νόσου [Chochlakis D. και άλλοι, 2008].

2.3. Βακτηριολογία

Τα αναπλάσματα, είναι μικρά, υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια με χαρακτηριστικά gram αρνητικών βακτηρίων που όμως δεν βάφονται με τη χρώση gram. Τα βακτήρια μέσα στο κύτταρο-στόχο (λευκοκύτταρο) έχουν τη μορφή λεπτών, μικρών στρογγυλών κόκκων διαμέτρου 1-3 μm. Αφού εισβάλλουν στα λευκά αιμοσφαίρια, τα βακτήρια διαιρούνται και σχηματίζουν αποικίες γνωστές σαν «μούρα» («moula»). Ο σχηματισμός του «μούρου» είναι ένα τυπικό χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας των βακτηρίων. Τη μόλυνση ακολουθεί αναστολή της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος (αναστολή

φαγοκυττάρωσης) [Ge Y. και Rikihisa Y., 2006], πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και προσβολή άλλων οργάνων (Εικόνα IV).

Όπως όλα τα υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια, δεν καλλιεργούνται σε συνήθη υποστρώματα και για την απομόνωση τους απαιτείται κυτταροκαλλιέργεια στην οποία χρησιμοποιείται η προμυελοκυτταρική σειρά HL-60.



Εικόνα IV: Εισβολή στο κύτταρο και αναπαραγωγή των *Ehrlichia* sp.

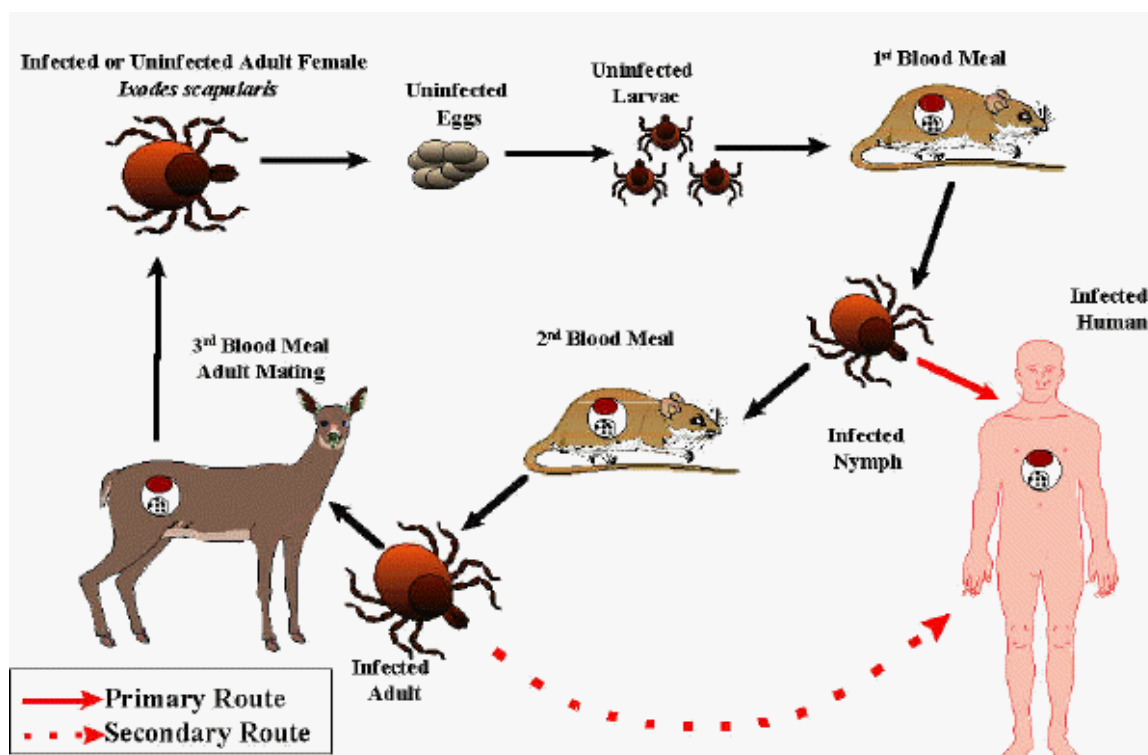
2.4. Αναπλαστώσεις - Επιδημιολογία / Μετάδοση

Συνηθέστερη εμφάνιση της νόσου είναι κατά την περίοδο Απριλίου-Οκτωβρίου (κορύφωση τον Ιούνιο), η οποία είναι κι η περίοδος κατά την οποία ωριμάζουν οι νύμφες. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει και η αυξημένη ανθρώπινη υπαίθρια δραστηριότητα κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών, η οποία αυξάνει τον κίνδυνο έκθεσης σε κρότωνα. Οι περισσότεροι ασθενείς που προσβάλλονται από τον HGE έχουν μολυνθεί μετά από έκθεση σε περιοχές όπου οι κρότωνα είναι ενδημικοί, και περίπου 60% των ασθενών αναφέρουν προηγούμενο δάγκωμα από κρότωνα, γεγονός που αποτελεί και τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για τις αναπλαστώσεις. Παρατηρείται συχνότερα στους άνδρες με συνηθέστερες ηλικίες προσβολής από 11-73 έτη.

Ανάλυση των οροεπιδημιολογικών μελετών για το *A. phagocytophilum* αποκαλύπτει ένα μέσο όρο λοίμωξης της τάξεως του 5.6% στην Ευρώπη και 3% στη Βόρεια Αμερική, ενώ τα ποσοστά ήταν ουσιαστικά υψηλότερα για τους πληθυσμούς υψηλού κινδύνου (ασθενείς με

προϋπάρχουσα λοίμωξη από *B. burgdorferi*, έκθεση σε κρότωνα, έκθεση σε γάτα ή σκύλο, αγρότες, εργαζόμενοι στα δάση) στην Ευρώπη (μέσος όρος 9.1%) και στη Βόρεια Αμερική (μέσος όρος 5.3%) [Dumler JS., 2005]. Παρά το γεγονός ότι η μεγάλη πλειοψηφία αυτών των μελετών πραγματοποιήθηκε στις περιοχές που ήταν γνωστές σαν ενδημικές για κροτωνογενείς λοιμώξεις, τα υψηλά ποσοστά προκαλούν προβληματισμό λαμβάνοντας υπόψη την αντίληψη ότι η ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση θεωρείται μια σπάνια νόσος. Η απόκλιση που καταγράφεται μεταξύ της οροθετικότητας και του ποσοστού των καταγεγραμμένων περιστατικών προκύπτει είτε από την υποδιάγνωση της λοίμωξης, είτε από τους ασυμπτωματικούς τίτλους αντισωμάτων, ή από διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα παθογόνα.

Μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν με σκοπό τη διερεύνηση των ενδιάμεσων και των φυσικών ξενιστών για το κάθε είδος της οικογένειας Anaplasmataceae (Ehrlichiae), σε διάφορα μέρη του κόσμου, έδειξαν ότι οι σημαντικότεροι μεταβιβαστές τους είναι οι κρότωνα της οικογένειας *Ixodidae*. Πολλά είδη μικρών και μεγάλων, άγριων και κατοικίδιων θηλαστικών έχουν αναφερθεί ότι λειτουργούν σαν υπόδοχα. Τέτοια είναι διάφορα είδη τρωκτικών, τα ελάφια, τα κυνοειδή, τα άλογα και τα αιγοπρόβατα. Πιο συγκεκριμένα: η *E. chaffeensis* μεταδίδεται μεταξύ άλλων στον άνθρωπο, τα κυνοειδή και τα σκυλιά από τον κρότωνα *Amblyomma americanum* (Lone Star tick) και προκαλεί την ανθρώπινη μονοκυτταρική ερλιχίωση (HME). Στην Ευρώπη το *A. phagocytophilum* μεταδίδεται μεταξύ άλλων στον άνθρωπο, τα κυνοειδή, τα άλογα, τα πρόβατα και τις αίγες από τον κρότωνα *Ixodes ricinus* (sheep tick), και προκαλεί την ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική ερλιχίωση (HGE) (Εικόνα V). Στην Αμερική η μετάδοση της νόσου γίνεται με μεταβιβαστή τους κρότωνα *Ixodes scapularis* (deer tick), στις βορειοανατολικές και βορειοδυτικές περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών [Pancholi P. και άλλοι, 1995] και *Ixodes pacificus* σε περιοχές που βρέχονται από τον Ειρηνικό Ωκεανό [Richter PJ. και άλλοι, 1996]. Σε περιοχές της Ασίας επικρατέστερος μεταβιβαστής θεωρείται ο *I. persulcatus* [Santos AS. και άλλοι, 2004].



Εικόνα V: Προτεινόμενος κύκλος μετάδοσης για τον παράγοντα της Ανθρώπινης κοκκιοκυτταρικής Αναπλάσμωσης

Μεγάλη σημασία έχει το γεγονός ότι η μόλυνση των κροτώνων είναι δυνατή μονάχα μετά από γεύμα με μολυσμένο αίμα διότι δεν είναι δυνατή η διωθητική μετάδοση του βακτηρίου. Από το προηγούμενο προκύπτει ότι τα θηλαστικά διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και διαδοση των βακτηρίων αυτών στην φύση [Dumler JS. και Bakken JS., 1998]. Λόγω του μεγέθους τους οι νύμφες είναι δυσκολότερο να εντοπιστούν και να αφαιρεθούν σε σχέση με τους ενήλικες κρότωνα, γεγονός που τις κατατάσσει ως τους σημαντικότερους μεταβιβαστές για τη μετάδοση του *A. phagocytophilum*. Η διάρκεια ενός γεύματος για να καταστεί δυνατή η μετάδοση του βακτηρίου από τον κρότωνα στον άνθρωπο-ξενιστή απαιτείται να είναι τουλάχιστον 24 ώρες [Parola P. και άλλοι, 2005]. Παρ' όλα αυτά, λοίμωξη από το παθογόνο έχει αναφερθεί και σε σφαγείς οι οποίοι τεμάχιζαν μεγάλες ποσότητες φρέσκων κρεάτων καθώς και κνηγούς οι οποίοι έρχονταν σε επαφή με μολυσμένο αίμα από φρεσκοσκοτωμένα ελάφια. Φαίνεται έτσι ότι ακόμα κι η έκθεση σε μολυσμένο αίμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για μόλυνση από τον HGE μέσω εκδορών του δέρματος ή μόλυνσης των βλεννοδών μεμβρανών [Bakken JS. και Dumler JS., 2006]. Ταυτόχρονα με τα παραπάνω έχουν αρχίσει να κερδίζουν έδαφος και η μεταφορά του παθογόνου κατά τη μετάγγιση αίματος [Leiby DA. και άλλοι 2002], κατά τη διενέργεια

μεταμόσχευσης [Thomas LD. και άλλοι, 2007], διαπλακουντικά [Horowitz HW. και άλλοι, 1998] κι ενδονοσοκομειακά [Krause PJ. και Wormser GP., 2008]. Το *A. phagocytophilum* επιζεί μέχρι και 18 ημέρες στο κατεψυγμένο αίμα, επομένως η μετάδοση μέσω της μετάγγισης δεν μπορεί να επηρεαστεί από τους όρους αποθήκευσης.

2.5. Κλινική εικόνα

Η νόσος εμφανίζεται σαν οξύ εμπύρετο (μη ειδικό), με υψηλό πυρετό ($\theta > 38,5$ °C) διάρκειας από 2-11 ημέρες (μέσος όρος 10 ημέρες).

Τα κλινικά συμπτώματα δεν είναι ειδικά. Συνηθέστερα συμπτώματα είναι: πυρετός, κεφαλαλγία, μυαλγία, ανορεξία, ηπατοσπληνομεγαλία. Συχνά συμπτώματα είναι επίσης το ρίγος, η έντονη κεφαλαλγία, οι γενικευμένες μυαλγίες και/ή αρθραλγίες. Λιγότερο συχνά εμφανίζεται η ναυτία, ο κοιλιακός πόνος, η διάρροια, ο βήχας. Σπάνια εμφανίζεται δερματικό εξάνθημα, ή μπορεί να εκδηλωθεί εικόνα άτυπης πνευμονίας.

Στο 50% των ασθενών χρειάζεται εισαγωγή σε νοσοκομείο. Επιπλοκές δεν έχουν ακόμα περιγραφεί στην Ευρώπη, όπου τα συμπτώματα είναι ηπιότερα σε σχέση με τις ΗΠΑ.

2.6. Εργαστηριακά ευρήματα

Τα κυριότερα εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία, ουδετεροπενία, αυξημένα ηπατικά ένζυμα και χαμηλό αιματοκρίτη [Horowitz HW. και άλλοι, 1998].

Ο αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος αποτελούν χρήσιμες εξετάσεις για τη διάγνωση. Στο 90% των περιπτώσεων έχει παρατηρηθεί ουδετεροπενία και στο 70% λευκοπενία με αριστερή μετατόπιση. Οι χαμηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων παρατηρούνται κατά την 7^η ημέρα ασθένειας. Κατά τη δεύτερη εβδομάδα ασθένειας, ο αριθμός των κυττάρων επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα ακόμη κι εάν τα κλινικά συμπτώματα επιμένουν για να ακολουθήσει γενικευμένη λεμφοκυττάρωση σε περίπτωση απουσίας θεραπείας. Έχουν επίσης αναφερθεί αύξηση ηπατικών ενζύμων κι αύξηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης. Λιγότερο συχνά εμφανίζεται αναιμία κι αύξηση της κρεατινίνης του ορού. Η κλινική και εργαστηριακή εικόνα είναι όμοια με αυτή που προκαλείται από τον ιό της εγκεφαλίτιδας που μεταδίδεται από κρότωνες (ενδημικός στη Βόρεια, Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη) [Lotric-Furla S. και άλλοι, 2002; Brouqui P. και άλλοι, 2004].

2.7. Case definition

Επιβεβαιωμένη Αναπλάσμωση

1. Εμπύρετο με ιστορικό δείγματος κρότωνα ή έκθεση σε κρότωνα **και**
2. Επιβεβαίωση της λοίμωξης από *A. Phagocytophilum* με ορομετατροπή ή αλλαγή ≥ 4 στον τίτλο αντισωμάτων (IFA) **ή**
3. Θετικό PCR στο αίμα – εύρεση αλληλουχίας στα προϊόντα της PCR (*Anaplasma-specific DNA*) **ή**
4. Απομόνωση του *A. Phagocytophilum* σε καλλιέργεια

Πιθανή Αναπλάσμωση

1. Εμπύρετο με ιστορικό δείγματος κρότωνα ή έκθεση σε κρότωνα **και**
2. Παρουσία σταθερού τίτλου των αντισωμάτων έναντι του *A. Phagocytophilum* στο 1^ο και στο 2^ο δείγμα ορού αν ο τίτλος είναι >4 φορές από το σημείο cut off (έμμεσος ανοσοφθορισμός, IFA) **ή**
3. Θετικό PCR χωρίς εύρεση αλληλουχίας **ή**
4. Παρουσία του «μούρου» σε επίχρισμα αίματος.

2.8. Εργαστηριακή διάγνωση**2.8.1. Δείγμα αίματος (με αντιπηκτικό)**

Κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου το δείγμα ελέγχεται για υψηλή συγκέντρωση μολυσμένων κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων καθώς και για την παρατήρηση των μολυσμένων φαγοκυττάρων σε επίχρισμα αίματος (χρώσεις Giemsa και Diff-quick), για την παρουσία των «μούρων». Ο έλεγχος για «μούρα» είναι πολύ ειδικός αλλά με χαμηλή ευαισθησία, γι αυτό και τούτα ανιχνεύονται εξαιρετικά σπάνια μετά την πρώτη εβδομάδα της νόσου [Blanco JR. και Oteo JA., 2002]. Το δείγμα ελέγχεται με μοριακές μεθόδους (PCR) για την ύπαρξη του παθογόνου [Fenollar F. και Raoult D., 2004] και ακολουθεί προσπάθεια για απομόνωση και καλλιέργεια του. Η δυσκολία συνίσταται στο ότι απαιτείται εργαστήριο ασφάλειας επιπέδου 3.

Όσο αφορά στην κυτταροκαλλιέργεια, χρησιμοποιείται η προμυελοκυτταρική σειρά HL-60, και γίνεται έλεγχος της μόλυνσης με χρώση Giemsa ή Diff-quick και παρατήρηση του «μούρου», 3-7 μέρες μετά τον ενοφθαλμισμό [Goodman JL. και άλλοι, 1996].

2.8.2. Δείγμα ορού

Απαιτούνται τουλάχιστον 2 δείγματα, το πρώτο κατά την έναρξη της νόσου και το δεύτερο 15-21 ημέρες μετά. Η μέθοδος που ακολουθείται είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός [Nicholson WL. και άλλοι, 1997]. Σε κάθε περίπτωση αυξημένη προσοχή θα πρέπει να δίδεται κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων λόγω πιθανών διασταρούμενων αντιδράσεων με άλλα παθογόνα, όπως τα *Coxiella burnetii*, *Rickettsia mooserii*, *Chlamydia* sp. και είδη των ερλιχιών [Blanco JR. και Oteo JA., 2002]. Θα πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι καμία από τις παραπάνω τεχνικές δεν είναι 100% ευαίσθητη.

2.9. Θεραπεία

Οι συστάσεις για την προτεινόμενη αντιβιοτική θεραπεία που πρέπει να ακολουθείται βασίζονται περισσότερο στην κλινική εμπειρία με φάρμακα που δρουν αποτελεσματικά. Βάση αυτής, και η υδροχλωρική δοξυκυκλίνη (doxycycline hydrochloride) και η δοξυκυκλίνη (doxycycline hyclate) έχουν αποδειχθεί ότι δρουν αποτελεσματικά έναντι του *A. phagocytophilum* αν και η δεύτερη προτιμάται λόγω καλύτερης φαρμακοκινητικότητας και ανοχής από τους ασθενείς. Έχει μάλιστα αναφερθεί ότι σε ασθενείς με ιστορικό δαγκώματος από κρότωνα, θα πρέπει να χορηγείται δοξυκυκλίνη προφυλακτικά [Zeidner NS. και άλλοι, 2008].

Η δοξυκυκλίνη μπορεί να χορηγηθεί από 8 ετών και άνω για 14 ημέρες. Παιδιά ηλικίας κάτω των 8 ετών μπορούν να λάβουν την ίδια θεραπεία για συντομότερο χρονικό διάστημα. Ασθενείς που δε μπορούν να λάβουν τετρακυκλίνη μπορούν να λάβουν ριφαμπικίνη για 7-10 ημέρες, ή εναλλακτικά κινολόνες [Horowitz HW. και άλλοι, 2001]. Παρ' όλα αυτά έγκυες γυναίκες στις οποίες χορηγήθηκε ριφαμπικίνη έδειξαν καλή ανταπόκριση. Σε γενικά πλαίσια, η θεραπευτική επίδραση της δοξυκυκλίνης και ριφαμπικίνης γίνεται εμφανής από την υπόχωρηση του πυρετού και τη βελτίωση της κλινικής εικόνας μέσα στις επόμενες 24 ώρες.

2.10. Ερλιχιώσεις/Αναπλσμώνσεις στα ζώα

Η ερλιχώση του σκύλου, είναι μια ασθένεια η οποία αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στην Αλγερία το 1935 και ακολούθως αναφέρθηκε εκτενώς κατά τη διάρκεια του πολέμου του Βιετνάμ, όπου νόσησαν και πέθαναν πολλοί σκύλοι του στρατού. Η *E. canis* η οποία μεταδίδεται με τον κρότωνα του σκύλου *R. sanguineus*, προσβάλλει τα μονοκύτταρα των σκύλων με περισσότερο ευπαθή τη φυλή German shepherd, καθώς επίσης και λύκους και τσακάλια, ζώα τα οποία αποτελούν και τις φυσικές δεξαμενές του παθογόνου.

Είναι γνωστή με τους όρους, Canine rickettsiosis, Canine haemorrhagic fever, Canine typhus, Tracker dog disease και Tropical canine pancytopenia. (Ettinger και άλλοι 1995). Η ασθένεια εκδηλώνεται με τρεις κλινικές μορφές (οξεία, υποκλινική και χρόνια), και μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή του μυελού των οστών, πανκυτοπενία, αιμορραγίες, άλλες βακτηριακές μολύνσεις, νευρολογικές και οφθαλμικές ανωμαλίες, καθώς και νεφρική νόσο.

Η *E. chaffeensis* μολύνει σκύλους, κογιότ, αλεπούδες, ελάφια, αίγες και λεμούριους. Φυσικές δεξαμενές της αποτελούν τα ελάφια και αποτελεί μαζί με την προηγούμενη, τους αιτιολογικούς παράγοντες της Μονοκυτταρικής ερλιχίωσης των κυνοειδών (Canine monocytic ehrlichiosis).

Η *E. ewingii* μολύνει σκύλους, οι οποίοι αποτελούν και τις φυσικές δεξαμενές. Αποτελεί μαζί με το *A. phagocytophilum* τους αιτιολογικούς παράγοντες της Κοκκιοκυτταρικής ερλιχίωσης των κυνοειδών (Canine granulocytic ehrlichiosis).

Τα αναπλάσματα μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια και στα ζώα εκτός από τον άνθρωπο. Υπεύθυνα είναι τα παθογόνα που ανήκουν στο γένος *Anaplasma* (*A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* και *A. bovis*) [Hechemy KE. και άλλοι, 2006]. Τα παθογόνα μεταβιβάζονται μέσω των κροτώνων. Τα σπονδυλωτά και οι κρότωνα με παρατεταμένη βακτηραιμία μπορούν να θεωρηθούν ως φυσικές δεξαμενές των παθογόνων [Dumler JS. και άλλοι, 2001; Kocan KM. και άλλοι, 2003; Rikihisa Y., 2003].

Το *A. phagocytophilum*, μολύνει σκύλους, άλογα, λάμα, γάτες, αγελάδες, πρόβατα, αίγες, πτηνά, πρωτεύοντα, βίσσονες, ελάφια, άλκες και τρωκτικά [Kuttler KL., 1984; Kocan KM. και άλλοι, 2003; Lew AE. και άλλοι, 2003]. Τα τέσσερα τελευταία αποτελούν και τις φυσικές δεξαμενές του παθογόνου στη φύση.

Στις γάτες, το *A. phagocytophilum* σπάνια αναφέρεται ότι προκαλεί την κοκκιοκυτταρική ερλιχίωση (μια αναφορά στη Σουηδία).

Στα άλογα προκαλεί την Κοκκιοκυτταρική Ερλιχίωση των Ιπποειδών (Equine Granulocytic Ehrlichiosis), μια ήπια νόσο η οποία εμφανίζει ως μοναδικό σύμπτωμα τον πυρετό, είτε εκδηλώνεται με μείωση της όρεξης, αταξία, καταστολή, ίκτερο, τριχοειδείς αιμορραγίες, οίδημα των οπισθίων άκρων και απροθυμία μετακίνησης.

Η νόσος Tick Born Fever, εμφανίζεται σε κατοικίδια/ παραγωγικά ζώα, αλλά και άγρια μηρυκαστικά, ιδιαίτερα όμως στις αγελάδες και τα πρόβατα.

Στα πρόβατα, προσβάλλονται κυρίως αμνοί και νεοεισερχόμενα στα ποίμνια ενήλικα ζώα. Η παρουσία διαφορετικών στελεχών του παθογόνου ακόμη και στο ίδιο ποίμνιο μπορεί να προκαλέσει διαφορές και στις κλινικές εκδηλώσεις. Συμπτώματα είναι ο πυρετός διάρκειας 4-

7 ημερών, η απώλεια βάρους, ταχύπνοια, ταχυκαρδία, βήχας, ατονία, αποβολές στο τέλος της κύησης και μείωση της γονιμότητας των κριών. Μπορεί να αποτελέσει το υπόβαθρο για άλλες μολύνσεις, όπως ο σταφυλόκοκκος, η εντεροτοξιναιμία κ.α.

Στα βοοειδή παρατηρούνται καταστολή, ανορεξία, διαταραχές της αναπνευστικής λειτουργίας, βήχας, μείωση της γαλακτοπαραγωγής και της ποιότητας του σπέρματος και αποβολές.

Η *E. ruminantium* προκαλεί στα βοοειδή την ασθένεια Heartwater. Η νόσος αυτή αναφέρεται ότι προσβάλλει τα βοοειδή και τα αιγοπρόβατα στη Ν. Αφρική, τη Ζιμπάμπουε τη Σενεγάλη και την Καραϊβική. Δεξαμενή του παθογόνου φαίνεται να αποτελούν τα άγρια μηρυκαστικά και οι κρότωνες του γένους *Amblyomma*, οι οποίοι αποτελούν και τους μεταβιβαστές του [Cowdry, 1926; Camus και άλλοι, 1993].

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την μελέτη του *A. phagocytophilum* σε κατοικίδια ζώα είναι η PCR [Stuen S. και άλλοι, 2003; Matsumoto K. και άλλοι, 2006] και ο έμμεσος ανοφθορισμός [Rajput ZI. και άλλοι, 2005; Amusatogui I. και άλλοι, 2006].

Το *A. platys* μολύνει τα αιμοπετάλια του σκυλιού. Προκαλεί τη μολυσματική κυνοειδή κυκλική θρομβοκυτοπενία (ICCT). Η νόσος είναι συχνά ασυμπτωματική αλλά τα θρομβοκυτοπενικά ζώα παρουσιάζουν αιμορραγική διάθεση και μπορεί αιμορραγήσουν μετά από ένα κτύπημα ή κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων [Waner T. και άλλοι, 1997].

Τα είδη *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis* και *A. ovis* έχουν ως κύριο ξενιστή τους τα μηρυκαστικά. Το *A. marginale* προκαλεί την αναπλάσμωση των βοοειδών [Rikihisu Y., 2006], αλλά έχει εντοπιστεί και σε άλλα μηρυκαστικά επίσης [Naranjo V. και άλλοι, 2006]. Η νόσος χαρακτηρίζεται από πυρετό, αναιμία, ίκτερο, απώλεια όρεξης, την επιδείνωση της φυσικής κατάστασης και δυσφορία στην αναπνοή [Razmi GR. και άλλοι, 2006]. Το *A. centrale* προσβάλλει μόνο τα βοοειδή και αν και τα συμπτώματα είναι ηπιότερα, μπορεί να προκαλέσει έναν μέτριο βαθμό αναιμίας.

Η αναπλάσμωση των μικρών μηρυκαστικών, σχετίζεται συνηθέστερα με την αιμολυτική αναιμία στις αίγες. Παρ' όλα αυτά το *A. ovis* μπορεί να μολύνει τα πρόβατα ειδικά όταν τα ζώα βρίσκονται σε συνθήκες στρες ή υπό την επίδραση άλλων παραγόντων [Splitter EJ. και άλλοι, 1956; Friedhoff KT., 1997]. Το *A. ovis* προσβάλλει τα ερυθρά αιμοσφαίρια των προβάτων, των αιγών και των άγριων μηρυκαστικών [de la Fuente J. και άλλοι, 2006], σε αντίθεση με το *A. phagocytophilum* που προσβάλλει τα ουδετερόφιλα [Herron MJ. και άλλοι,

2005]. Το παθογόνο μεταβιβάζεται κατά κύριο λόγο με τον κρότωνα *R. bursa*, αλλά πιθανότατα και με άλλα είδη κροτώνων [de la Fuente J. και άλλοι, 2007].

Η παρουσία των παραπάνω ειδών αναπλάσμάτων έχει καταγραφεί και στη νότια Ευρώπη, με τις κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εργαστηριακή διάγνωση να είναι η PCR [Petronvec M. και άλλοι 2003; Naranjo V. και άλλοι 2006] και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός [Torina A. και άλλοι, 2007].

3. ΡΙΚΕΤΣΙΕΣ

3.1. Ιστορική Αναδρομή

Στην Ευρώπη, οι ρικετσιώσεις αποτελούν από πολύ παλιά, γνωστά λοιμώδη νοσήματα. Αν και η επιδημιολογία και η αιτιολογία τους έχουν αλλάξει με την ιστορία, εξακολουθούν μέχρι και σήμερα να αποτελούν σημαντική απειλή για την ανθρωπότητα. Η παλαιότερη καταγραφή επιδημίας, που θεωρείται να ήταν επιδημικός τύφος (*Rickettsia prowazekii*) αναφέρεται από το Θουκιδίδη στην Αθήνα (λοιμός των Αθηνών), περίπου το 429 π.Χ. ([Roux V. και Raoult D., 1999]. Η πρώτη στρατιωτική έκθεση σχετικά με επιδημία τύφου περιγράφει περισσότερους από 17.000 θανάτους στο Στρατό των Καθολικών Βασιλέων, κατά τη διάρκεια της πολιορκίας της Γρανάδας το 1489 [Kelly DJ. και άλλοι, 2002].

Αργότερα, η νόσος επανεμφανίζεται στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια των ναπολεόντειων πολέμων, και των δύο Παγκόσμιων Πολέμων. Ο Κηλιδώδης Πυρετός των Βραχωδών Ορέων (ΚΠΒΟ), περιγράφηκε για πρώτη φορά σαν νοσολογική οντότητα από τον Maxey το 1899, και το 1909 ο Ricketts [Ricketts HT., 1909] απέδειξε ότι, ο κρότωνας *D. andersoni* εμπλεκόταν στη μετάδοση της *R. rickettsii* του παθογόνου παράγοντα του ΠΒΟ.

Ο Μεσογειακός Κηλιδώδης Πυρετός (ΜΚΠ) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1910 [Conor A. και Bruch A., 1910] και είκοσι χρόνια μετά, αναγνωρίστηκε σαν ρικετσιακό νόσημα μεταδιδόμενο με τον καφέ κρότωνα του σκύλου (*Rhipicephalus sanguineus*).

Ο όρος «ενδημικός τύφος» (*murine typhus*) αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1910, στις ΗΠΑ από τον Brill ο οποίος από το 1898 έως το 1910 μελέτησε 221 περιπτώσεις μιας νόσου που έμοιαζε με τον τυφοειδή πυρετό χωρίς να είναι κλασσικός επιδημικός τύφος [Brill NE., 1910].

Η πρώτη περιγραφή της νόσου και αναγνώρισή της ως ανεξάρτητης κλινικοεπιδημιολογικής οντότητας έγινε από το Maxey, ο οποίος το 1923 ανέφερε μια ενδημική νόσο σε ασθενείς (με θετική την αντίδραση Weil- Felix) στις νότιες πολιτείες των ΗΠΑ, της οποίας η επιδημιολογία διέφερε σημαντικά απ' αυτή του επιδημικού τύφου και το 1926 περιγράφει την οικολογία της νόσου, ενοχοποιώντας τα τρωκτικά και τους ψύλλους σαν ξενιστές [Maxey KF., 1926].

Το 1928, ο Hermann Mooser διαχωρίζει την *R.typhi* από τη *R.prowazekii* με βάση τις διαφορές στην μολυσματικότητά τους για τα ινδικά χοιρίδια [Mooser H., 1928]. Το 1931 στη Βαλτιμόρη ο Dyer απομονώνει στον ψύλλο τον υπεύθυνο μικροοργανισμό για τον ET [Dyer R. και άλλοι, 1931] και αποκαλύπτεται ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι ένα μικρό (0,4 X 1,3 μm) gram αρνητικό βακτήριο, που ονομάζεται *R. mooseri* προς τιμή του

Mooser, ο οποίος πρώτος πραγματοποίησε μελέτες για τα βιολογικά χαρακτηριστικά αυτού του μικροοργανισμού και προσδιόρισε τις διαφορές της από την *R. prowazekii*.

3.2. Ταξινόμηση

Ιστορικά η τάξη των *Rickettsiales*, εδαιρείτο σε τρεις οικογένειες: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae*, *Anaplasmataceae*. Η οικογένεια *Rickettsiaceae* αποτελείται από τρεις φυλές την *Rickettsieae*, την *Ehrlichieae* και την *Wolbachieae*. Η φυλή *Rickettsieae* για πολλά χρόνια αποτελείται από τρία γένη, το γένος *Coxiella*, το γένος *Rickettsia* και το γένος *Rochalimaea* [Weiss E. και Moulder JW., 1984].

Επιπλέον το γένος *Rickettsia* υποδιαιρείται α) στην ομάδα του Τύφου (Ο.Τ) της οποίας μέλη είναι η *R. typhi*, και η *R. prowazekii*, β) στην ομάδα των κηλιδωδών πυρετών (Ο.Κ.Π), η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 20 διαφορετικά είδη και γ) στην ομάδα των τύφων των θάμνων, η οποία περιλάμβανε την *R. tsutsugamushi* (αυτή είναι απύσα από την Ευρώπη).

Για την προηγούμενη ταξινόμηση των ρικετσιών αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήρια τα οικολογικά, γεωγραφικά, κλινικά και βακτηριολογικά χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας. Αργότερα, ο προσδιορισμός της αντιγονικής τους σύνθεσης επέτρεψε την ταξινόμησή τους οροτυπικά. Η γενετική ανάλυση του γονιδιώματος του γένους *Rickettsia*, επέτρεψε τον ακριβέστερο προσδιορισμό των σχέσεων του γένους αυτού με τα άλλα γένη των βακτηρίων, καθώς και τη γενετική απόσταση των διαφόρων ειδών του γένους μεταξύ τους.

Ο όρος «*ρικέτσια*» ενώ χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για να προσδιορίσει την ευρύτερη τάξη των *Rickettsiales*, σήμερα χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει τα είδη του γένους *Rickettsia*.

Η ραγδαία πρόοδος των μοριακών ταξινομικών μεθόδων και ειδικά της 16S rRNA ανάλυσης [Fox GE. και άλλοι, 1980], έκανε δυνατό τον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα στα διάφορα είδη των βακτηρίων [Woese CR., 1987] και συνέβαλε σημαντικά στην επαναταξινόμηση αρκετών ειδών.

Σήμερα, η *Coxiella burnetii* έχει μετακινηθεί όχι μόνο από την οικογένεια των *Rickettsiaceae*, αλλά και από την τάξη των *Rickettsiales* αφού με την 16S rRNA ανάλυση αποδείχθηκε ότι έμοιαζε περισσότερο με τα μέλη της γ- υποομάδας των Proteobacteria, παρά με αυτά της α1-υποομάδας στην οποία ανήκει το γένος *Rickettsia* [Weisburg WG. και άλλοι, 1989].

Επιπλέον το γένος *Rochalimaea* έχει πρόσφατα ενωθεί με το γένος *Bartonella* το οποίο μετακινήθηκε από την τάξη των *Rickettsiales* από τότε που τα μέλη της τοποθετήθηκαν στην α2-υποομάδα των Πρωτεοβακτηρίων [Brenner DJ. και άλλοι, 1993].

Έτσι, σήμερα, μετά την απομάκρυνση των δυο προηγούμενων γενών από την φυλή των *Rickettsiae*, παρέμεινε να ανήκει σε αυτή μόνο το γένος *Rickettsia*. Το γένος αυτό υποδιαιρέθηκε α) στην ομάδα του Τύφου (Ο.Τ) της οποίας μέλη είναι η *R. typhi* και η *R. prowazekii* και β) στην ομάδα των κηλιδωδών πυρετών (Ο.Κ.Π), η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 20 διαφορετικά είδη.

Πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες, απέδειξαν ότι η *R. tsutsugamushi* η οποία αποτελούσε την ομάδα των τύφων των θάμνων, διαφέρει αρκετά ώστε να μπορεί να καταταχθεί σε νέο ξεχωριστό γένος, αυτό της *Orientia*, και να μετονομαστεί σε *Orientia tsutsugamushi* [Tamura A. και άλλοι, 1995].

Η υποδιαίρεση του γένους *Rickettsia* στις 2 ομάδες και τα είδη της κάθε ομάδας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

ΓΕΝΟΣ	ΟΜΑΔΑ	ΕΙΔΟΣ
<i>Rickettsiae</i>	Τύφου	<i>R. prowazekii</i> <i>R. typhi</i>
	Κηλιδωδών Πυρετών	<i>R. akari</i> <i>R. australis</i> <i>R. bellii</i> <i>R. conorii</i> <i>R. helvetica</i> <i>R. japonica</i> <i>R. montana</i> <i>R. parkeri</i> <i>R. rhipicephali</i> <i>R. rickettsii</i> <i>R. sibirica</i> <i>R. slovacae</i> <i>R. massilia</i> <i>Astrakhan fever rickettsia</i> <i>R. africae</i> <i>R. israeli</i> κλπ

Πίνακας II: Η υποδιαίρεση του γένους *Rickettsia* και τα είδη της κάθε ομάδας

Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλουχίας της 16S rRNA και συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των ορολογικών και γονοτυπικών μελετών οι Roux V. και Raoult D., το 1995 πρότειναν την παρακάτω ταξινόμηση για το γένος *Rickettsia* :

ΓΕΝΟΣ	ΟΜΑΔΑ	Ισχύουσα ονοματολογία
<i>Rickettsia</i>	Ομάδα I	<i>R. typhi</i> <i>R. prowazekii</i>
	Ομάδα II	<i>R. canada</i>
	Ομάδα III	<i>R. conorii</i> <i>R. rickettsii</i> <i>R. parkeri</i> <i>R. africae</i> <i>R. israeli</i>
	Ομάδα IV	<i>R. australis</i>
	Ομάδα V	<i>R. akari</i>
	Ομάδα VI	<i>R. montana</i>
	Ομάδα VII	<i>R. massiliae</i>
	Ομάδα VIII	<i>R. helvetica</i>
	Ομάδα IX	<i>R. bellii</i>

Πίνακας III : Ταξινόμηση των ρικετσιών σε ομάδες και είδη με βάση τα αποτελέσματα της αλληλουχίας της 16S rRNA και το συνδυασμό αποτελεσμάτων των ορολογικών και γονοτυπικών μελετών [Roux V. και Raoult D., 1995].

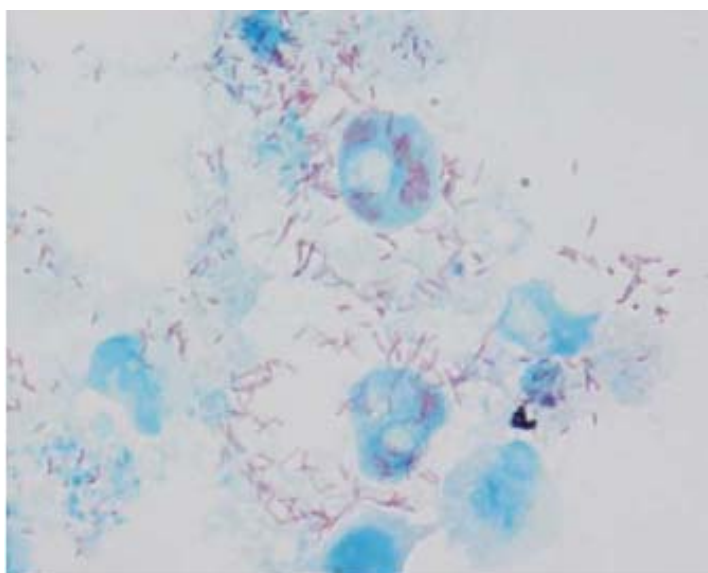
3.3. Βακτηριολογία

Οι ρικέτσιες είναι μικρά (0,8-2μm x 0,3-0,4μm) υποχρεωτικά ενδοκυττάρια, αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μορφής κόκκου ή κοκκοβάκιλλου που πολλαπλασιάζονται με απλή διχοτόμηση και κατακρατούν την βασική φουξίνη όταν βάφονται με την χρώση Gimenez [Gimenez DF., 1964; Raoult D. και Roux V., 1997], (Εικόνα VI). Η καλλιέργεια τους στο εργαστήριο, απαιτεί ζωντανά κύτταρα ξενιστών (πειραματόζωα, εμβρυοφόρα αυγά), ή κυτταροκαλλιέργειες (κυτταρικές σειρές Vero, L929, Hel, MRC5).

Μεταξύ των ρικετσιακών πρωτεϊνικών αντιγόνων, δύο πρωτεΐνες της επιφάνειας με μεγάλο μοριακό βάρος (rOmpA και rOmpB) περιέχουν ειδικά του είδους επίτοπα [Raoult D. και Roux V, 1997; Lascola B. και Raoult D, 1997]. Η λιποσακχαριδική μεμβράνη των

οργανισμών αυτών, περιέχει αντιγόνα τα οποία δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με όλα τα μέλη της υποομάδας αλλά και με άλλα βακτήρια.

Οι ρικέτσιες της ομάδας των Κηλιδωδών πυρετών εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυτάρων ξενιστών, πιθανόν επειδή έχουν την ικανότητα να κινούνται μέσα στο κύτταρο με τον πολυμερισμό της ακτίνης [Burgdorfer W. και άλλοι, 1968; Heinzen R. και άλλοι, 1993; Teysseire N. και άλλοι, 1992], ενώ αυτές της ομάδας του Τύφου εντοπίζονται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα [Heinzen R. και άλλοι, 1993; Teysseire N. και άλλοι, 1992]. Το γένωμα των ρικετσιών έχει μικρό μέγεθος (1-1.6 Mb) και αποτελείται από ένα μοναδικό κυκλικό χρωμόσωμα [Eremeeva ME. και άλλοι, 1993; Roux V. και άλλοι, 1992; Roux V. και Raoult D., 1993].



Εικόνα VI: *Rickettsia conorii* σε μολυσμένα Vero cells (κόκκινοι κόκκοβάκκιλοι, μεγέθυνση X1000) [Rovero C. και άλλοι, 2008].

3.4. Διάκριση Ρικετσιώσεων ανάλογα με τον Μεταβιβαστή:

3.4.1. Ρικέτσιες με μεταβιβαστή τους ψύλλους

Μια από τις συχνά εμφανιζόμενες ρικετσιώσεις του ανθρώπου που έχουν ως μεταβιβαστή τον ψύλλο, είναι ο ενδημικός τύφος (ή τύφος των τρωκτικών). Οι αρουραίοι και άλλα τρωκτικά ενεργούν ως υπόδοχα και ο ψύλλος του αρουραίου (*Xenopsylla cheopis*) είναι ο κύριος μεταβιβαστής της *R. typhi*. Οι άνθρωποι μολύνονται με ενοφθαλμισμό μολυσμένων

κοπράνων ψύλλων μέσω λύσεων συνεχείας του δέρματος. Ο ενδημικός τύφος εμφανίζεται παγκόσμια, κυρίως σε θερμές περιοχές, ιδιαίτερα σε πόλεις λιμάνια και παράκτιες περιοχές, όπου υπάρχει παρουσία τρωκτικών. Στην Ευρώπη, αυτή η ρικετσιώση επικρατεί στην Πορτογαλία, την Ισπανία (περιλαμβανομένων των Κανάριων Νήσων), και στην Ελλάδα [Anon., 1998; Bernabeu-Wittel M. και άλλοι, 1999; Gikas A. και άλλοι, 2002; Tselentis Y. και άλλοι, 1996; Hernandez-Cabrera M. και άλλοι, 2004]. Στη Νότια Ισπανία, ο ενδημικός τύφος θεωρείται μια σημαντική αιτία του πυρετού μέσης διάρκειας [Bernabeu-Wittel M. και άλλοι, 1999]. Οι περισσότερες των περιπτώσεων εμφανίζονται το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Οι ασθενείς έχουν πυρετό, σωματικά συμπτώματα (κεφαλαλγία, μυαλγία) και συχνά ένα ελάχιστο ορατό κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα στον κορμό. Μερικές φορές, είναι δύσκολο να σκεφτεί κανείς την εμπλοκή της *R. typhi*, εξαιτίας της απουσίας των αρουραίων και των ψύλλων τους. Περαιτέρω, η διάγνωση των περιπτώσεων στον άνθρωπο γινόταν με ορολογικές μεθόδους (απουσία καλλιιεργειών) και είναι γνωστό ότι οι διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ ρικετσιών αποτελούν κανόνα. Έτσι, είναι πολύ πιθανό η ασθένεια να οφειλόταν σε άλλες "murine typhus-like" ρικετσιώσεις, όπως τη μόλυνση από την *R. felis*. Η *R. felis* που αποτελεί μέλος της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών, μεταδίδεται με τους ψύλλους της γάτας (κυρίως των *Ctenocephalides felis*) και έχει περιγραφεί σε ψύλλους στην Ισπανία, την Γαλλία [Marquez FJ. και άλλοι, 2002; Blanco JR. και άλλοι, 2005; Rolain JM. και άλλοι, 2003] και το Ηνωμένο Βασίλειο [Kenny MJ. και άλλοι, 2003]. Στην Ευρώπη, ο παθογόνος ρόλος της έχει αποδειχθεί (με ορολογικές ή/και με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης [PCR]) σε ασθενείς από τη Γαλλία [Raoult D. και άλλοι, 2001] και τη Γερμανία [Richter J. και άλλοι, 2002]. Πρέπει να έχουμε πάντα υπόψη αυτή τη διάγνωση σε ασθενείς που εμφανίζουν πυρετό και/ή εξάνθημα και με ιστορικό επαφής με γάτες ή και τσίμπημα ψύλλου.

3.4.2. Ρικέτσιες με μεταβιβαστή τις ψείρες

Ο επιδημικός τύφος είναι μια ασθένεια που προκαλείται από την *R. prowazekii* και μεταδίδεται με τη ψείρα του σώματος (*Pediculus humanus corporis*). Υπόδοχο είναι ο άνθρωπος. Στην Ευρώπη ο επιδημικός τύφος είναι γνωστός με διάφορα ονόματα όπως, Fleckfieber (Γερμανία), typhus exanthematique (Γαλλία), ή tabardillo (Ισπανία). Η ασθένεια αυτή είναι πάντα στενά συνδεδεμένη με τον πόλεμο, τη φτώχεια, τις φυσικές καταστροφές και την πείνα. Παρόλο που η λοίμωξη μπορεί προφανώς να αυτοιαθεί, τα βακτήρια μπορεί να επιβιώσουν εφ' όρου ζωής στον άνθρωπο, και υπό συνθήκες στρες (πόλεμοι, κακές συνθήκες

διαβίωσης και φυσικές καταστροφές) επανεμφανίζονται προκαλώντας χρόνια νόσο, γνωστή ως Brill-Zinsser νόσος. Παρόλο που κανένα κρούσμα επιδημικού τύπου δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στην κεντρική και νότια Ευρώπη, θα πρέπει να είμαστε σε εγρήγορση για την πιθανότητα επανάδυσης αυτής της νόσου στην Ευρώπη (δηλαδή, εισαγόμενος τύπος) [Niang M. και άλλοι, 1999]. Πρόσφατα, μία αυτόχθονη περίπτωση λοίμωξης από *R. prowazekii* έχει αναφερθεί σε άστεγο ασθενή άστεγοι από τη Μασσαλία της Γαλλίας [Badiaga S. και άλλοι, 2005].

3.4.3. Ρικέτσιες με μεταβιβαστή ακάρεα

Η Rickettsialprox περιγράφεται συνήθως σαν μια chickenpox-like ασθένεια, καθώς το εξάνθημα που παρουσιάζει είναι φυσαλλιδώδους τύπου. Η νόσος προκαλείται από τη *R. akari* και έχει ως μεταβιβαστή το ακάρεο *Allodermanyssus sanguineus* και δεξαμενή τον κατοικίδιο ποντικό *Mus musculus*. Παρόλο που οι ξενιστές των ακάρεων (συνήθως τα ποντίκια) είναι ευρέως διαδεδομένα στις πόλεις, η νόσος συνήθως υποδιαγιγνώσκεται. Η ασθένεια, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά στη Νέα Υόρκη, τυπικά χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση στους ασθενείς πρωτογενούς εσχάρας στο σημείο του δαγκώματος του αρthropόδου, ακολουθούμενης από πυρετό, πονοκέφαλο και την ανάπτυξη φυσαλλιδοφλυκταινώδους εξανθήματος. Το 1991, η *R. akari* απομονώθηκε από το αίμα ενός ασθενούς στην Κροατία [Radulovic S. και άλλοι, 1996], γεγονός το οποίο αναφέρθηκε σαν η πρώτη απομόνωση μετά από 40 χρόνια της *R. akari* και το πρώτο περιστατικό με προέλευση την Νότια Ευρώπη. Το στέλεχος που απομονώθηκε, ήταν αντιγονικά και γενετικά πανομοιότυπο με το πρωτότυπο που απομονώθηκε στην Αμερική καθώς και με αυτό που απομονώθηκε στην Ουκρανία. Πιο πρόσφατα, ένα περιστατικό ανακοινώθηκε και αφορούσε ένα 9χρονο αγόρι στην Τουρκία [Ozturk MK. και άλλοι, 2003]. Στην πραγματικότητα η ασθένεια αυτή θα έπρεπε να διαγιγνώσκεται συχνότερα στην Ν. Ευρώπη εάν οι κλινικοί επεδείκνυαν περισσότερη προσοχή στη διάγνωση. Πρόσφατα οι εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι που είναι σε θέση να διακρίνουν τη νόσο αυτή από τις άλλες ρικετσιώσεις της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών, είναι διαθέσιμες σε εργαστήρια αναφοράς [Brouqui P. και άλλοι, 2004].

3.4.4. Ρικέτσιες μεταδιδόμενες με τους κρότωνες

Μέχρι πρόσφατα εθεωρείτο ότι, ο Μεσογειακός κηλιδώδης πυρετός (ΜΚΠ), γνωστός επίσης και ως "botonneuse fever", "Marseilles fever" ή "Escaro-nodular fever", ήταν η μόνη κροτωγενής ρικετσιώση στην Ευρώπη, αλλά συνεχώς νέα είδη ρικετσιών απομονώνονται και αποδεικνύεται να εμπλέκονται στην ανθρώπινη παθολογία.

Ο ΜΚΠ προκαλείται από την *R. conorii* και κάποιες γενετικές παραλλαγές (*R. conorii* στέλεχος Israel και *R. conorii* στέλεχος Astrakhan). Όλες αυτές έχουν ως μεταβιβαστή τον *Rhipicephalus sanguineus* (καφέ κρότωνας του σκύλου) [Gilot B. και άλλοι, 1990; Oteo JA. και άλλοι, 1996; Giammanco G. και άλλοι, 1986]. Η ασθένεια είναι ενδημική κυρίως στη νότια Ευρώπη (Μεσογειακή ζώνη) [Raoult D. και άλλοι, 1986; Raoult D. και άλλοι, 1986; Anton E. και άλλοι, 2003; De Sousa R. και άλλοι, 2003; Sardelic S. και άλλοι, 2003], αλλά έχει περιγραφεί και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες [Lambert M. και άλλοι, 1984] (Εικόνα VII). Οι περισσότερες από τις περιπτώσεις συμβαίνουν κατά τη διάρκεια των θερμών μηνών (τέλη Άνοιξης και το καλοκαίρι). Μετά από μια περίοδο επώασης περίπου 7 ημερών, η έναρξη των συμπτωμάτων του ΜΚΠ είναι απότομη και οι ασθενείς παρουσιάζουν υψηλό πυρετό, κακουχία, κεφαλαλγία, εξάνθημα (συνήθως με συμμετοχή των πελμάτων και των παλαμών) (100%) και συχνά, την εμφάνιση τοπικά μιας μαύρης εσχάρας (ή tache noire) στο σημείο του δαγκώματος του κρότωνα (70%). Όσον αφορά τις γενετικές παραλλαγές της *R. conorii*, το 1999 η *R. conorii israelensis* συνδέθηκε με την εμφάνιση ασθένειας σε ανθρώπους στην Πορτογαλία και στη Σικελία [Bacellar F. και άλλοι, 1999; Parola P. και Raoult D., 2001]. Φαίνεται ότι η μόλυνση με αυτή τη γενετική παραλλαγή είναι πιο σοβαρή από τον κλασικό ΜΚΠ και η παρουσία σε αυτή της εσχάρας είναι λιγότερο συχνή (35%) [Sousa R. και άλλοι, 2005]. Το 2001, η *R. conorii* στέλεχος Astrakhan ανιχνεύθηκε σε ένα *R. sanguineus* που αποσπάστηκε από ένα γάλλο στρατιώτη των Ηνωμένων Εθνών στο Κοσοβο [Fournier PE. και άλλοι, 2003]. Αυτή ήταν και η πρώτη ανίχνευση αυτής της ρικέτσιας έξω από τη Ρωσία.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, και άλλες πρόσφατα αναγνωρισμένες κροτωγενείς ασθένειες έχουν περιγραφεί σε όλη την Ευρώπη. Μια από αυτές είναι η λοίμωξη από *R. slovaca* της οποίας μεταβιβαστής είναι ο κρότωνας *Dermacentor marginatus* και κύρια δεξαμενή στη φύση οι αγριόχοιροι. Στην Ουγγαρία, το όνομα αυτής της ασθένειας είναι TIBOLA (Tick-borne lymphadenopathy) [Lakos A., 1997] και DEBONEL στην Ισπανία (Dermacentor-borne-necrosis-erythema lymphadenopathy) [Oteo JA. και Ibarra V., 2002; Oteo JA. και άλλοι, 2003]. Η *R. slovaca* έχει εντοπιστεί στο *D. marginatus* και *D. reticulatus* σε μια μεγάλη πλειοψηφία ευρωπαϊκών χωρών [Bacellar F. και άλλοι, 1995; Raoult D. και άλλοι, 2002; Oteo JA. και άλλοι, 2004; Punda-Polic V. και άλλοι, 2002].

Το 1997, αναφέρθηκε η πρώτη τεκμηριωμένη περίπτωση μόλυνσης με *R. slovaca* [Raoult D. και άλλοι, 1997]. Από τότε, πολλά ανθρώπινα κρούσματα έχουν περιγραφεί στην Ευρώπη, κυρίως στην Ουγγαρία, τη Γαλλία, και Spain [Lakos A. και άλλοι, 2002; Oteo JA. και άλλοι, 2004; Ibarra V. και άλλοι, 2005; Lakos A., 2002; Komitova R. και άλλοι, 2003; Cazorla C. και άλλοι, 2003; Oteo JA. και άλλοι, 2003]. Οι περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις συμβαίνουν κατά τη διάρκεια των ψυχρών μηνών (το χειμώνα). Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από μια μαύρη νεκρωτική βλάβη που περιβάλλεται από ερύθημα στο σημείο του δαγκώματος του κρότωνα και οδυνηρό πόνο στους περιφερειακούς λεμφαδένες. Ο πυρετός και το εξάνθημα σπάνια εμφανίζονται [Oteo JA. και άλλοι, 2003; Raoult D. και άλλοι, 2002; Oteo JA. και άλλοι, 2004; Oteo JA. και άλλοι, 2003]. Στη νόσο DEBONEL, το σημείο του δαγκώματος του κρότωνα είναι πιο κοινό στο κεφάλι (<0.001) σε σύγκριση με ασθενείς με ΜΚΠ [Ibarra V. και άλλοι, 2005; Oteo JA. και άλλοι, 2003]. Σε αυτό το σημείο ο ασθενής συνήθως αναπτύσσει αλωπεκία.

Το 1996, αναφέρθηκε το πρώτο ανθρώπινο κρούσμα το οποίο οφειλόταν στη *Rickettsia sibirica mongolotimonae* [Raoult D. και άλλοι, 1996]. Από τότε, νέες περιπτώσεις έχουν περιγραφεί, κυρίως στη Γαλλία [Fournier PE. και άλλοι, 2000; Psaroulaki A. και άλλοι, 2005; Fournier PE. και άλλοι, 2005]. Η ρικέτσια αυτή απομονώθηκε για πρώτη φορά από κρότωνες *Hyalomma asiaticum* οι οποίοι συλλέχθηκαν στη Μογγολία το 1991 [Yu X. και άλλοι, 1993]. Στην Ευρώπη, οι περισσότερες από τις περιπτώσεις συμβαίνουν την άνοιξη. Σε αντίθεση με άλλες κροτωγενείς ρικετσιώσεις, σε αυτή την ασθένεια, η παρουσία διογκωμένων λεμφογαγγλίων, λεμφαγγειτίδας, και πολλαπλών εσχαρών, είναι κοινά [Fournier PE. και άλλοι, 2005], γι' αυτό και κάποιοι συγγραφείς προτείνουν να εκφράζεται αυτή η ασθένεια σαν LAR (lymphangitis-associated rickettsiosis). Λόγω της απουσίας του κρότωνα μεταβιβαστή από την Ευρώπη, είναι δυνατόν κάποιο άλλο είδος κρότωνα να συμπεριφέρεται ως τέτοιος. Η συμμετοχή των πτηνών στη διάδοση αυτής της λοίμωξης (πουλιά που μεταφέρουν κρότωνες) φαίνεται να είναι πολύ πιθανή [Fournier PE. και άλλοι, 2000; Fournier PE. και άλλοι, 2005].

Το 1992 στη Μασσαλία, ένα νέο είδος ρικέτσιας της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών, απομονώθηκε από κρότωνα του είδους *Rhipicephalus sanguineus*. Χαρακτηρίστηκε ως ξεχωριστό είδος εντός της ομάδας των SFG ρικετσιών και ονομάστηκε *Rickettsia massiliae* [Beati L. και άλλοι, 1992; Beati L. και Raoult D., 1993]. Στην Ευρώπη, στη συνέχεια έχει ανιχνευθεί με μοριακές μεθόδους σε κρότωνα *R. sanguineus* στην Ελλάδα [Babalís T. και άλλοι, 1994] και *R. turanicus* στην Πορτογαλία [Bacellar F. και άλλοι, 1995]. *Rickettsia*

massiliae ανιχνεύθηκε και στην Αφρική σε κρότωνα *R. sulcatus*, στην Κεντροαφρικανική Δημοκρατία [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1994], και από *R. muhsamae* που συλλέχθηκαν από βοοειδή στο Μάλι [Parola P. και άλλοι, 2001]. Το 1996, μια παραλλαγή του στελέχους *R. massiliae*, ονομάστηκε Bar29, και απομονώθηκε σε κρότωνα *R. sanguineus* στην Ισπανία [Beati L. και άλλοι, 1996]. Μέχρι το 2005, η *R. massiliae* είχε απομονωθεί και / ή ανιχνευθεί μόνο από κρότωνα και η παθογένειας της για τον άνθρωπο ήταν άγνωστη. Το 2005 έγινε ανίχνευση αυτής της ρικέτσιας από ρικετσιακή απομόνωση από ασθενή που νόσησε το 1985 και μόνον τότε αναγνωρίστηκε η παθογονικότητα της για τον άνθρωπο. [Vitale G. και άλλοι, 2006].

Το 1999, η *R. helvetica* είχε εμπλακεί σε ένα περιστατικό θανατηφόρας περιμυοκαρδίτιδας σε ένα νεαρό ασθενή στη Σουηδία [Nilsson K. και άλλοι, 1999]. Ακόμη, έχει εμπλακεί ως αιτία μη ειδικής εμπύρετου ασθένειας [Fournier PE. και άλλοι, 2000; Fournier PE. και άλλοι, 2004] και στη σαρκοείδωση [Nilsson K. και άλλοι, 2002], αν και ο ρόλος της είναι ασαφής στην τελευταία. Αυτή η ρικέτσια έχει ανιχνευθεί σε κρότωνα του είδους *Ixodes ricinus* στη Γαλλία, Σουηδία, Σλοβενία, Πορτογαλία, Ιταλία, Ελβετία, και πιο πρόσφατα στην Ισπανία [Fournier PE. και άλλοι, 2004; Parola P. και άλλοι, 1998; Baumann D. και άλλοι, 2003; Fernandez-Soto P. και άλλοι, 2003; Beninati T. και άλλοι, 2002]. Η λοίμωξη εμφανίζεται κατά τη διάρκεια των θερμών μηνών ως ήπια νόσος και συνδέεται με πυρετό, κεφαλαλγία, αρθραλγία και μυαλγία, αλλά όχι με δερματικό εξάνθημα [Fournier PE. και άλλοι, 2004].

Πιο πρόσφατα, η *R. aeschlimannii* έχει εμπλακεί στην παθολογία του ανθρώπου και απομονώθηκε σε έναν ασθενή από τη Γαλλία, που επέστρεψε από το Μαρόκκο [Raoult D. και άλλοι, 2002]. Αυτή η ρικέτσια κυρίως απομονώνεται από κρότωνα του είδους *Hyalomma marginatum*, αν και έχει εντοπιστεί σε άλλους κρότωνα, όπως *Rhipicephalus* sp. και *Ixodes* sp.. Η *R. aeschlimannii* εντοπίστηκε στο *H. marginatum* στην Πορτογαλία, την Ισπανία, την Κροατία και την περιοχή της Κορσικής στην Γαλλία [Parola P. και Raoult D., 2001; Punda-Polic V. και άλλοι, 2002; Fernandez-Soto P. και άλλοι, 2003; Oteo JA. και άλλοι, 2005; Matsumoto K. και άλλοι, 2004] και τα συμπτώματά της είναι παρόμοια με εκείνα του ΜΚΠ. Αυτός ο κρότωνα συχνά δαγκώνει ανθρώπους και έχει αποδειχθεί η παρουσία αυτής της ρικέτσιας σε ασθενείς που δαγκώθηκαν από τον *H. marginatum*, αλλά κανένας από αυτούς δεν ανέπτυξε ασθένεια. Είναι πιθανό ότι η παθογονικότητα της *R. aeschlimannii* είναι μικρότερη από αυτή των άλλων ρικετσιών [Oteo JA. και άλλοι, 2005].

Τέλος, οι ευρωπαϊκοί κλινικοί πρέπει να λάβουν υπόψη και άλλες κροτωγενείς ρικετσιώσεις οι οποίες περιγράφονται διεθνώς, όπως την περίπτωση του African tick bite fever που

προκαλείται από τη *R. africae* κυρίως σε ασθενείς που επιστρέφουν από περιοχές της Αφρικής, κυρίως νότια της Σαχάρας [Raoult D. και άλλοι, 2001; Fournier PE. και άλλοι, 1998; Jensenius M. και άλλοι, 1999; Jensenius M. και άλλοι, 2002; Oteo JA. και άλλοι, 2004].

3.5. Οικολογία-Επιδημιολογία

Όλες οι ρικέτσιες, με σπάνιες εξαιρέσεις, μεταδίδονται στα σπονδυλωτά- ξενιστές πρωτίστως μέσω αρθρόποδων, κυρίως κροτώνων αλλά και ακάρεων, ψειρών και ψύλλων [Raoult D. και Roux V., 1997]. Αερογενής μετάδοση [Oster CN. και άλλοι, 1977] καθώς και μόλυνση μετά από μετάγγιση αίματος [Wells GM. και άλλοι, 1978] έχουν επίσης αναφερθεί. Τα τρωκτικά λειτουργούν σαν υπόδοχα για τα περισσότερα είδη των ρικετσιών. Οι κύκλοι μετάδοσης περιλαμβάνουν επίσης σαν δεξαμενές ή υπόδοχα για τις ρικέτσιες, ένα μεγάλο αριθμό κατοικιδίων περιοικιακών, κτηνοτροφικών και άγριων ζώων.

Την τελευταία 10ετία, με την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων απομόνωσης και καλλιέργειας, (μέθοδος ταχείας διάγνωσης-κυτταροκαλλιέργειες), και τη χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση και τυποποίηση, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ένας μεγάλος αριθμός ρικετσιακών στελεχών, κυρίως από αρθρόποδα, πολλά από τα οποία είναι αμφιβόλου παθογονικότητας για τον άνθρωπο ή παραμένουν αταξινόμητα. Η παθογενετικότητά πολλών τέτοιων ρικετσιακών στελεχών που είχαν απομονωθεί από κρότωνες και για χρόνια εθεωρούνταν μη παθογόνα διαπιστώθηκε πρόσφατα. Η σημασία τους ως παθογόνα οδήγησε την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας να συμπεριλάβει τις ρικετσιώσεις στα επιτηρούμενα μεταδοτικά νοσήματα.

Στα αρθρόποδα, οι ρικέτσιες εντοπίζονται στον πεπτικό σωλήνα και πολλαπλασιάζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, προκαλώντας μικρή ή μεγάλη καταστροφή των κυττάρων.

Τα αρθρόποδα μπορούν να μολυνθούν με βακτήρια όταν τρέφονται από βακτηριαμικά ζώα ή από διασταδιακή (transstadial) και διωοθηκική (transovarial) μετάδοση. Για παράδειγμα, οι ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών μπορεί να μεταδοθούν μέσω όλων των οδών [Raoult D. και Roux V., 1997]. Τρία σημεία είναι ουσιώδη για την κατανόηση των τρόπων με τους οποίους τα βακτήρια μεταδίδονται από κρότωνες και τις συνέπειες των κροτωγενών νόσων βακτηριακής αιτιολογίας. Πρώτον, οι ρικέτσιες πολλαπλασιάζονται σε όλα σχεδόν τα όργανα και τα υγρά των κροτώνων και ιδίως τους σιελογόνους αδένες και τις ωοθήκες, γεγονός το οποίο επιτρέπει α) τη μεταβίβαση των οργανισμών κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος σε ένα σπονδυλωτό- ξενιστή και β) μεταβίβαση διωοθηκικά στους απογόνους των κροτώνων. Άλλα βακτήρια μπορούν μεν να μεταβιβάζονται διωοθηκικά αλλά

δεν μολύνουν τους σιελογόνους αδένες των κροτώνων που τα φιλοξενούν και άρα δεν μπορούν στη συνέχεια να μεταβιβάζονται σε επιδεκτικά σπονδυλωτά όπου θα μπορούσαν να προκαλέσουν νόσο [Niebylski ML. και άλλοι, 1997]. Δεύτερον, κάθε στάδιο των σκληρών κροτώνων τρέφεται μία μόνο φορά και τα βακτήρια που αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος, μπορεί στη συνέχεια να μεταβιβαστούν σε άλλο ξενιστή μόνον όταν ο κρότωνας έχει μεταμορφωθεί στο επόμενο εξελικτικό στάδιο. Δεν είναι όλα τα είδη της οικογένειας ικανά να μεταδίδουν τα βακτήρια διασταδιακά. Τέλος, αν τα βακτήρια, όπως συμβαίνει με τις ρικέτσιες, μεταβιβάζονται τόσο διασταδιακά όσο και διωθητικά σε κάποιο είδος κρότωνα, αυτός αποτελεί επίσης δεξαμενή και πολλαπλασιαστικό ξενιστή των βακτηρίων, και η γεωγραφική κατανομή των νόσων που προκαλούνται από τα βακτήρια θα ακολουθεί εκείνη των κροτώνων μεταβιβαστών [Raoult D. και Roux V., 1997]. Πολύ σπάνια, οι κρότωνες μπορούν να μολυνθούν με βακτήρια από cofeeding, δηλαδή όταν αρκετοί κρότωνες τρέφονται σε στενή επαφή πάνω στον ίδιο ξενιστή, πιθανόν να συμβεί άμεση μετάδοση των βακτηρίων από ένα μολυσμένο κρότωνα σε ένα άλλο μη μολυσμένο [Raoult D. και Roux V., 1997]. Για ορισμένες μόνο ρικέτσιες έχει περιγραφεί σεξουαλική μετάδοση των βακτηρίων από μολυσμένους αρσενικούς σε θηλυκούς κρότωνες [Raoult D. και Roux V., 1997]. Περιορισμένες μελέτες υπάρχουν σχετικά με το ποιες είναι οι συνέπειες στον κρότωνα μετά τη μόλυνση του. Αναφέρεται μείωση της γονιμότητας και υψηλή θνησιμότητα σε κρότωνες που έχουν μολυνθεί με την *R. rickettsii* [Niebylski ML. και άλλοι, 1999]. Πάντως ο κρότωνας δεν πεθαίνει, σε αντίθεση με το μεταβιβαστή της *R. prowazekii* την ψείρα, όπου πεθαίνουν οι μολυσμένες με *R. prowazekii* ψείρες [Raoult D. και Roux V., 1997]. Πολλά ερωτηματικά υπάρχουν σε σχέση με το αν ιδιότητες των βακτηρίων, όπως για παράδειγμα η λοιμογόνος δύναμη τους, τροποποιούνται μέσα στους κρότωνες που τα φιλοξενούν. Ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι η *R. rickettsii* χάνει την λοιμογόνου δύναμη της σε ινδικά χοιρίδια όταν οι κρότωνες μεταβιβαστές υπόκεινται σε φυσιολογικό στρες όπως μακρά περίοδο νηστείας [Raoult D. και Roux V., 1997].

Γενικά οι αρθροποδο- μεταδιδόμενες βακτηριακές νόσοι των ανθρώπων, είναι ζωνοόσοι, με τα βακτήρια να διατηρούνται σε φυσικούς κύκλους, στους οποίους εμπλέκονται αρθρόποδα και άγρια ή / και κατοικίδια ζώα ξενιστές. Τα αρθρόποδα μπορούν, μερικές φορές ευκαιριακά να τρέφονται σε ανθρώπους και έτσι να προκαλούν λοιμώξεις. Για κάθε βακτηριακή νόσο πιθανόν να υπάρχουν, ένα ή περισσότερα αρθρόποδα μεταβιβαστές και ένα ή περισσότερα υπόδοχα [Lane SL., 1994; Mather TN. και Howard SG., 1994]. Τα ζώα ξενιστές, πρέπει να

είναι επιδεκτικά στη μόλυνση και πρέπει να αναπτυχθεί μια σχετικά μακρά διάρκεια βακτηριαμίας για να αποτελούν αποτελεσματικές δεξαμενές του μικροβίου.

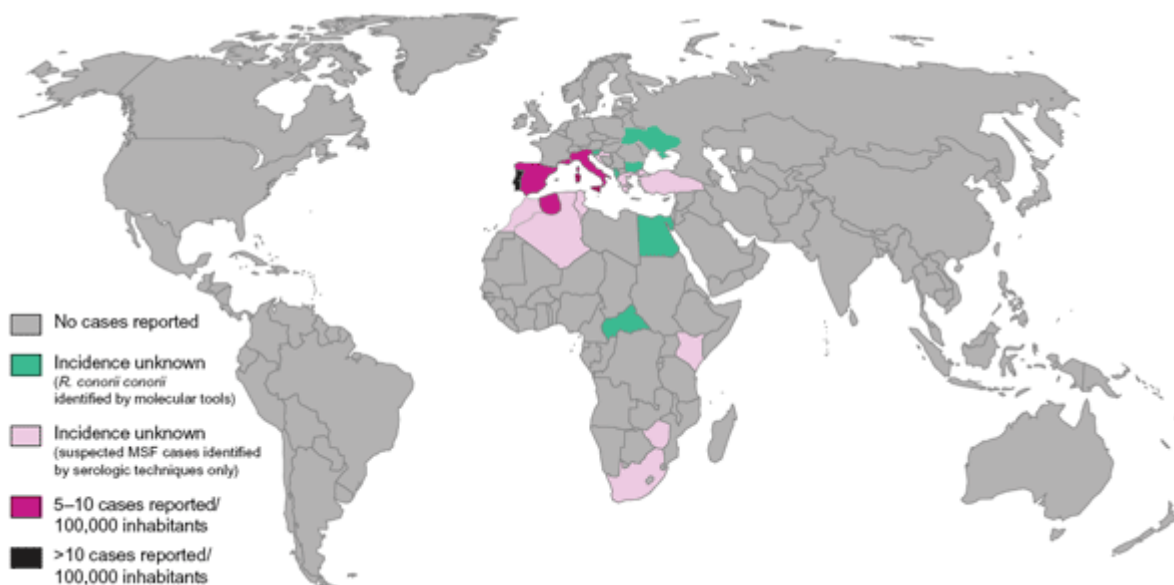
Τα αρθρόποδα μεταβιβάζουν τις ρικέτσιες στους ανθρώπους όταν τα σημεία επαφής/προσκόλλησης μολύνονται με μολυσμένες εκκρίσεις των σιελογόνων αδένων (π.χ., ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών), εμέσματα περιεχόμενου του μέσου εντέρου (π.χ., *B. burgdorferi*), κόπρανα (π.χ. *Coxiella burnetii*, *R. typhi*, *R. prowazekii*). Η αύξηση του κινδύνου μετάδοσης της νόσου με την αύξηση του χρόνου προσκόλλησης έχει αποδειχθεί σαφώς για τις ρικέτσιες της ΟΚΠ [Raoult D. και Roux V., 1997]. Έμμεσοι οδοί μετάδοσης είναι επίσης πιθανές, όπως η μόλυνση από εκδορές του δέρματος ή τα μάτια μετά τη σύνθλιψη των κροτώνων με τα δάχτυλα.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι σκληροί κρότωνα συνήθως δεν προκαλούν πόνο κατά την προσκόλληση και απομύζηση αίματος, και τα ανώριμα εξελικτικά τους στάδια συχνά δεν ανιχνεύονται από τους ανθρώπους λόγω του μικρού τους μεγέθους. Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης ΜΚΠ παρατηρείται τον Αύγουστο, περίοδο κατά την οποία οι ανώριμες μορφές του κρότωνα-μεταβιβαστή είναι περισσότερο παρούσες [Raoult D. και Roux V., 1997]. Συχνά στο ιστορικό δεν αναφέρεται δήγμα από κρότωνα από άτομα που έχουν διαγνωσθεί να πάσχουν από κροτωγενή νόσο [Raoult D. και Roux V., 1997]. Από το 1981 έως το 1992, το αμερικάνικο Center Disease Control (CDC) ανέφερε 9223 περιπτώσεις κηλιδώδους πυρετού των βραχωδών όρεων (ΚΠΒΟ) και μόνο το 59,6% των ασθενών ανέφερε ιστορικό δήγματος από κρότωνα 2 εβδομάδες πριν από την εκδήλωση των συμπτωμάτων [Dalton MJ. και άλλοι, 1995]. Έχουν αναφερθεί διάφοροι παράγοντες που σχετίζονται με τα αρθρόποδα και οι οποίοι πιθανόν να επηρεάζουν τη συχνότητα λοίμωξης των ανθρώπων με ρικετσιακές νόσους. Τέτοιοι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση/παρουσία των μεταβιβαστών, το ποσοστό (βαθμός) μόλυνσης των αρθροπόδων-μεταβιβαστών, η ικανότητα/συνήθεια τους να τρέφονται από τους ανθρώπους (π.χ ανθρωπόφιλοι ή όχι κρότωνα), την παρουσία του συνηθισμένου επιδεκτικού σπονδυλωτού-υποδόχου. Σημαντικό ρόλο επίσης παίζουν παράγοντες που σχετίζονται με ανθρώπινη δραστηριότητα, όπως για παράδειγμα η πιθανότητα να εισέρχονται οι άνθρωποι στους βιότοπους των αρθροπόδων, η συνήθεια της σύνθλιψης αρθροπόδων μεταξύ των δακτύλων, η ευαισθησία για τα βακτήρια, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και η ανοσολογική ανταπόκριση του ξενιστή

Η μολυσματικότητα των υποδόχων, το ποσοστό, και η πυκνότητα των ξενιστών (τόσο των μεταβιβαστών όσο και των υποδόχων), αποτελούν σημαντικές μεταβλητές που καθορίζουν την επιδημιολογία των νόσων που μεταδίδονται από κρότωνα και γενικά από αρθρόποδα.

Αυτές επηρεάζονται από πολλούς φυσιολογικούς και οικολογικούς παράγοντες, που έχουν αναθεωρηθεί πρόσφατα [Lane SL., 1994; Mather TN. και Howard SG., 1994], και οι οποίοι περιλαμβάνουν την προτίμησή για το είδος του ξενιστή, το βαθμό επαφής αρthropόδου-μεταβιβαστή, την εποχική δραστηριότητα και των δύο.

Για παράδειγμα, ο καφέ κρότωνας του σκύλου, *R. sanguineus*, είναι καλά προσαρμοσμένος σε αστικά ανθρώπινα περιβάλλοντα, όπου παρουσιάζει σχετικά αυξημένη προτίμηση σε φυσικό ξενιστή (προτιμητέος ξενιστής) και σπάνια παρασιτεί -τρέφεται από τον άνθρωπο. Μολονότι ~5% (μέχρι 12%) αυτών των κροτώνων είναι μολυσμένοι με *Rickettsia conorii* στη Νότια Γαλλία, η συχνότητα εμφάνισης του Μεσογειακού κηλιδώδους πυρετού και το ποσοστό των οροθετικών ατόμων, είναι σχετικά χαμηλές σε αυτή την περιοχή [Raoult D. και Roux V., 1997], ενώ στη Βόρεια Καρολίνα, η *R. rickettsii* έχει βρεθεί να μολύνει μόνο το 0,5% του *D. variabilis*, αλλά αυτοί οι κρότωνες τρέφονται πολύ εύκολα από τους ανθρώπους και ο κηλιδώδης πυρετός των βραχυδών όρεων είναι κοινός στην περιοχή [Dalton MJ. και άλλοι, 1995; Walker DH., 1995].



Εικόνα VII: Γεωγραφική κατανομή της *Rickettsia conorii* και επίπτωση του MKΠ [Rovero C. και άλλοι, 2008].

Στις νοτίως της Σαχάρας περιοχές της Αφρικής, οι κρότωνες του γένους *Amblyomma*, αποτελούν τους μεταβιβαστές της *Rickettsia africae*, που είναι ο παράγοντας του

αφρικανικού tick bite πυρετού. Αυτοί οι κρότωνα είναι πολύ συχνά μολυσμένοι από τον οργανισμό (>50% σε ορισμένες περιοχές) και τρέφονται εύκολα από ανθρώπους που εισέρχονται στους βιότοπους τους (στους θάμνους). Ο οροεπιπολασμός σε άτομα από τις περιοχές αυτές είναι κατά συνέπεια πολύ υψηλός, συχνά >80% [Raoult D. και Roux V., 1997].

Η προέλευση και η διασπορά των ρικετσιώσεων, έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών υποθέσεων και περιλαμβάνει την έννοια της παράλληλης εξελικτικής πορείας (coevolution) των μικροοργανισμών, των αρθροπόδων-μεταβιβαστών και των σπονδυλωτών-ξενιστών [Korch GW Jr., 1994]. Οι ρικετσιώσεις είναι συνήθως γεωγραφικά εντοπισμένες και σημειώνονται μόνο σε εστίες με ιδανικές συνθήκες για τα αρθρόποδα και τα ζώα που συμμετέχουν στην κυκλοφορία και διασπορά στη φύση των βακτηρίων. Έτσι, η *R. rickettsii* ενδημεί στην Αμερική, η *R. conorii* από τη Νότια Ευρώπη έως τη νοτιοδυτική Ασία, την Ινδία, και Αφρική, η *R. africae* στην υποσαχάρια Αφρική, η *Rickettsia sibirica* στα βόρεια της Κεντρικής Ασίας, την Κίνα, και τη νοτιοανατολική Ασία, η *Rickettsia australis* στην Αυστραλία, ο παράγοντα του κροτωγενούς τύφου της Ταϊλάνδης στη νοτιοανατολική Ασία και την Αυστραλία [Raoult D. και Roux V., 1997]. Μια σειρά συμβάντων μπορούν να διαταράξουν αυτές τις συνθήκες και συμπεριλαμβάνουν μακροκλιματικές αλλαγές, αστικοποίηση, και την αλόγιστη υλοτόμηση των δασών.

Η διάδοση των κροτωγενών νόσων απαιτεί τη διασπορά των αρθροπόδων μεταβιβαστών ή / και των σπονδυλωτών-ξενιστών των βακτηρίων [Korch GW Jr., 1994]. Για να είναι δυνατή τη διατήρηση των λοιμώξεων σε νέες περιοχές, οι μεταβιβαστές ή οι δεξαμενές ξενιστές πρέπει να βρουν ξενιστές ή αρθρόποδα αντίστοιχα, που είναι επιδεκτικά στη μόλυνση και οι οποίοι μπορούν να διατηρήσουν και να συντηρήσουν τον μικροοργανισμό. Τα αρθρόποδα μπορεί να διασκορπιστούν με τα πόδια, αλλά αυτό συμβαίνει μόνο σε μικρές αποστάσεις οι οποίες σπάνια υπερβαίνουν τα 50 μέτρα (π.χ., 5 m για τον *I. ricinus*). Οι κρότωνα μπορούν επίσης να διασπαρούν προσκολλημένοι πάνω σε ξενιστές που μπορούν να κινούνται σε μεγαλύτερες αποστάσεις, ιδίως στην περίπτωση των αποδημητικών πτηνών ή των θηλαστικών [Sonenshine DE., 1991; Sonenshine DE., 1993].

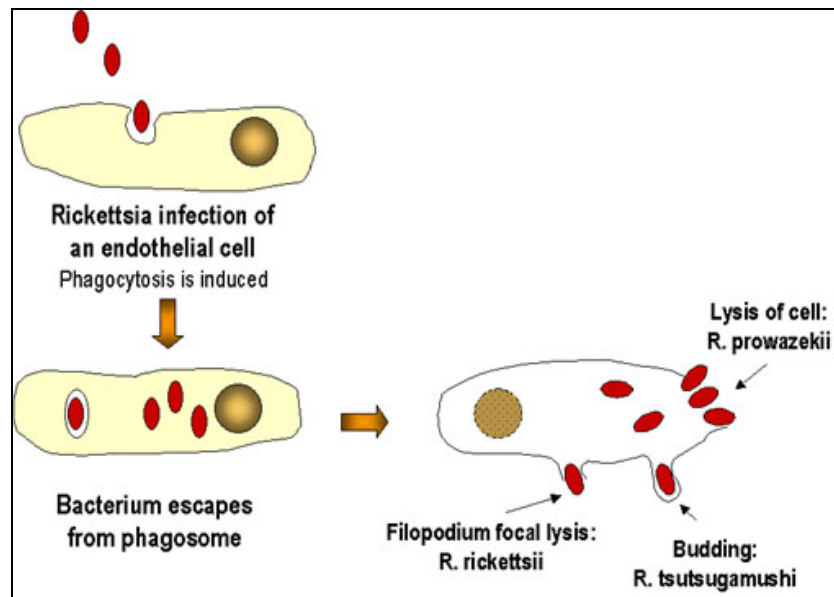
Οι άνθρωποι μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη διασπορά των αρθροπόδων, με τις γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζουν ή με την τροποποίηση των οικοτόπων των κροτώνων ή με την αποστολή ζώων με κρότωνα σε πολύ μεγάλες αποστάσεις. Παράδειγμα αποτελεί, ο Αφρικανικός πυρετός από δάγμα κρότωνα που οφείλεται στη *R. africae* και μεταδίδεται από κρότωνα του γένους *Amblyomma*. Είναι μια αναδυόμενη κροτωνομεταδιδόμενη νόσος που

έχει εξαπλωθεί από την υποσαχάρια Αφρική, όπου η ασθένεια είναι ενδημική, στις Δυτικές Ινδίες με τη μετακίνηση κτηνοτροφικών ζώων [Parola P. και άλλοι, 1998; Parola P. και άλλοι, 1999]. Ο μεταβιβαστής και υπόδοχο της νόσου, ο κρότωνας *A. variegatum*, εισήχθη στις Δυτικές Ινδίες κατά τη διάρκεια του 18ου ή του 19ου αιώνα με βοοειδή που αποστέλλονταν από τη Σενεγάλη στη Γουαδελούπη. Ο κρότωνας εγκαταστάθηκε στην Καραϊβική, και διαδόθηκε μεταξύ των νησιών με την κυκλοφορία των ζώων και των αποδημητικών πτηνών. Επειδή ο *A. variegatum* εύκολα τρέφεται από τους ανθρώπους και η επαφή με τους ανθρώπους είναι συχνή, ο οροεπιπολασμός αντισωμάτων έναντι της *R. africae* είναι υψηλός σε ανθρώπους από τη Γουαδελούπη (>50%), και ο Αφρικανικός πυρετός από δήγμα κρότωνα εμφανίζεται συχνά στα νησιά της Καραϊβικής.

Οι λόγοι για την διασπορά ορισμένων κροτονομεταδιδόμενων νόσων δεν έχουν ωστόσο ακόμα καθοριστεί. Για παράδειγμα, ο καφέ κρότωνας του σκύλου, *R. sanguineus*, αποτελεί το μεταβιβαστή και την εν δυνάμει δεξαμενή της *R. conorii*, τον παράγοντα του Μεσογειακού κηλιδώδους πυρετού στην Ευρώπη και την Αφρική. Ωστόσο, παρόλο που το είδος αυτό των κροτώνων κατανέμεται παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών, η λοίμωξη με την *R. conorii* δεν έχει ποτέ αναφερθεί εκεί.

3.6. Ρικετσιώσεις - Κλινική εικόνα

Στον άνθρωπο, οι ρικέτσιες, αφού εισβάλλουν από την πύλη εισόδου (σημείο νύγματος), διασπείρονται στο κυκλοφορικό σύστημα (ρικετσειαιμία), εισέρχονται και πολ/ζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των μικρών αιμοφόρων αγγείων όλων των οργάνων, τα οποία διογκώνονται, σπάζουν και προκαλείται αγγειίτιδα (**Εικόνα VIII**).



Εικόνα VIII: Εισβολή στο κύτταρο και αναπαραγωγή των Rickettsia and Orientia

Η μόλυνση με ρικέτσιες ακολουθείται από μια περίοδο επώασης, που διαρκεί κατά μέσο όρο 6-10 ημέρες, προτού εκδηλωθούν τα πρώτα συμπτώματα της λοίμωξης που είναι πυρετός ($> 39^{\circ}\text{C}$), πονοκέφαλος, μυαλγία, αρθραλγία, και λίγο αργότερα ένα χαρακτηριστικό κηλιδοβλατιδώδες ή πετεχειώδες εξάνθημα [Conor A. και Bruch A., 1910]. Στην περίπτωση των ρικετσιών της ΟΚΠ παρατηρείται στο σημείο ενοφθαλμισμού μετά από το δήγμα του κρότωνα χαρακτηριστική «εσχάρα ενοφθαλμισμού» (Εικόνα IX).



Εικόνα IX: Τυπική εσχάρα ενοφθαλμισμού και εξάνθημα, στο πόδι ασθενούς με Μεσογειακό κηλιδώδη Πυρετό [Rovero C. και άλλοι, 2008].

Η κλινική εικόνα και η σοβαρότητα των ρικετσιώσεων ποικίλει αρκετά και εξαρτάται άμεσα από το ρικετσιακό στέλεχος που εμπλέκεται κάθε φορά, από την ανοσολογική ανταπόκριση και την γενικότερη κατάσταση της υγείας των ασθενών, την έγκαιρη διάγνωση και εφαρμογή ορθών θεραπευτικών σχημάτων γι' αυτό και εμφανίζονται από ήπιες σχεδόν ασυμπτωματικές, έως σοβαρές λοιμώξεις με θανατηφόρο απόληξη.

3.7. Εργαστηριακή διάγνωση

Η διάγνωση των ρικετσιώσεων είχε για χρόνια βασισθεί κυρίως στην κλινική εικόνα και το ιστορικό του ασθενή, το περιβάλλον δηλαδή που διαμένει, επαφή με ζώα-ξενιστές και μεταβιβαστές, εποχή μόλυνσης (κυρίως καλοκαίρι). Ορολογικές εξετάσεις, όπως ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η έμμεση αιμοσυγκόλληση δίνουν μόνο αναδρομική διάγνωση, αφού η ανοσολογική αντίδραση εμφανίζεται αργά στην πορεία της λοίμωξης. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, έχουν εισαχθεί νέες τεχνικές για τη διάγνωση των λοιμώξεων με ρικέτσιες. Μια από αυτές, είναι η τεχνική των shell vials [Marrero M. και Raoult D., 1989; Peter O. και άλλοι, 1990; Lascola B. και Raoult D., 1996] που είναι μια μέθοδος ταχείας, άμεσης εργαστηριακής διάγνωσης που επιτρέπει, σε μικρό χρονικό διάστημα, την απομόνωση των ρικετσιών σε κυλινδρικά σωληνάκια (shell vials) που περιέχουν κύτταρα και την καλλιέργεια τους στη

συνέχεια σε κυτταρικές σειρές. Περιλαμβάνει την απομόνωση των ρικετσιών και καλλιέργεια σε κύτταρα (Hel, Vero, L929) ή κυλινδρικά σωληνάκια (shell-vial) στο έλασμα των οποίων έχουν αναπτυχθεί μονόστιβοι, ινοβλάστες Hel. Η απομόνωση είναι γενικά πολύπλοκη μέθοδος, απαιτεί εξειδικευμένα εργαστήρια, η λήψη των παθολογικών υλικών (αίμα, βιοψία) πρέπει να γίνεται πριν τη χορήγηση αντιβιοτικών και η μεταφορά τους πρέπει να είναι ταχεία. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται επίσης και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, PCR που προσφέρει γρήγορη, ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση των ρικετσιών. Η ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών ρικετσιών γίνεται με τη μέθοδο PCR-RFLP, ή PCR-sequencing analysis [Gage KL. και άλλοι, 1992; Gage K. και άλλοι, 1994, Williams WJ. και άλλοι, 1994, Stein A. και Raoult D., 1992]. Η ανίχνευση των ρικετσιών επίσης γίνεται με άμεσο ανοσοφθορισμό.

Η έμμεση διάγνωση βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων με ορολογικές δοκιμασίες. Έχουν χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση, η αντίδραση Weil-Felix [Halle S. και άλλοι, 1977], η σύνδεση συμπληρώματος, η μικροσυγκόλληση, η συγκόλληση με latex, η παθητική αιμοσυγκόλληση, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, καθώς και οι μέθοδοι ELISA [Raoult D. και Dasch GA., 1989] και Western blot. Εξ αυτών, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός είναι σήμερα διεθνώς αποδεκτή σαν δοκιμασία επιλογής. Είναι μέθοδος ευαίσθητη και ειδική εμφανίζοντας τις λιγότερες διασταυρούμενες αντιδράσεις, επιτρέποντας τον προσδιορισμό IgG και IgM αντισωμάτων και απαιτώντας ελάχιστη ποσότητα αντιγόνου.

4. ΠΥΡΕΤΟΣ Q (*Coxiella burnetii*)

Ο πυρετός Q, οφείλεται στη *Coxiella burnetii*, ένα ενδοκυτταρικό Gram αρνητικό παθογόνο, το οποίο εισβάλλει και ζει στα φαγολυσοσώματα των κυττάρων του ξενιστή. Αποτελεί μία ζωνόσο διαδεδομένη σε ολόκληρο τον κόσμο [Marrigie TJ., 1990]. Ο άνθρωπος μολύνεται με την εισπνοή μολυσμένων μικροσταγονιδίων, με την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς και με τον χειρισμό μολυσμένων υλικών [Marmion RA και Stoker MQR., 1959].

Η *Coxiella burnetii* παρουσιάζει μεγάλη φαινοτυπική και κλινική πολυμορφία. Η νόσος μπορεί να εμφανισθεί με οξεία ή χρόνια μορφή. Η οξεία μορφή εκδηλώνεται ως ψευδογριππώδης συνδρομή, αυτοπεριοριζόμενο εμπηρετο νόσημα, πνευμονία, κοκκιωματώδης ηπατίτιδα ή ως λοίμωξη του ΚΝΣ. Η χρόνια μορφή της νόσου μπορεί να εκδηλωθεί ως ενδοκαρδίτιδα (σε έδαφος βαλβιδοπάθειας, προσθετική βαλβίδα κ.λ.π.) ή ως οστεομυελίτιδα [Raoult D. και άλλοι, 1986; Tselentis Y. και άλλοι, 1995; Spelman DW., 1982; Tissot Dupont H. και άλλοι, 1992 ; Reilly S. και άλλοι, 1990 ; Dupuis G. και άλλοι, 1985]. Οι ξενιστές της *Coxiella burnetii* στη φύση είναι κυρίως τα αιγοπρόβατα, τα βοοειδή αλλά και οι γάτες, τα τρωκτικά οι κρότωνες κ.α. [Badudieri B., 1959; Langley JM. και άλλοι, 1988]. Η *Coxiella burnetii* βρίσκεται στο γάλα, στα ούρα, στα κόπρανα και στα λόχεια των μολυσμένων ζώων χωρίς να υπάρχει κλινικά εμφανής λοίμωξη σε αυτά [Baca OG. και Paretsky D., 1983]. Ο μικροοργανισμός είναι εξαιρετικά ανθεκτικός στους φυσικούς και χημικούς παράγοντες και μπορεί να επιζήσει για πολλά χρόνια διατηρώντας αναλλοίωτη την λοιμογόνο του δράση, ένας μόνον μικροοργανισμός μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη [Sawer LA. και άλλοι, 1987].

Η εργαστηριακή διάγνωση της *Coxiella burnetii* είναι ορολογική. Αντισώματα εναντίον της φάσης I και εναντίον της φάσης II μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες μεθόδους. Τις δύο προηγούμενες δεκαετίες η μέθοδος εκλογής ήταν αυτή της σύνδεσης του συμπληρώματος (CF). Σήμερα οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFAT) και η ELISA [Worswick D. και Marmion BP., 1985; Robert C. και άλλοι, 1981]. Η *Coxiella burnetii* μπορεί να καλλιεργηθεί σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας, σε ινοβλάστες εμβρύου ποντικού, σε καρκινικές σειρές κυττάρων κ.α. [Stein A. και Raoult D., 1992; Raoult D. και άλλοι, 1990].

4.1. Ιστορική Αναδρομή - Ταξινόμηση

Η πρώτη περιγραφή της νόσου έγινε από τον Derrick το 1935 ο οποίος παρατήρησε ότι εννέα εργαζόμενοι σε σφαγείο στο Brisbane, στην Αυστραλία παρουσίασαν ένα εμπύρετο αυτοπεριοριζόμενο νόσημα άγνωστης αιτιολογίας [Derrick EH., 1937]. Ο Edward Derrick ονόμασε την ασθένεια που περιέγραψε, ως πυρετό Q [από το query], [Derrick E., 1964] "μέχρις ότου πληρέστερη γνώση της ασθένειας θα επέτρεπε καλύτερο όνομα. Μέσα στα επόμενα 10 χρόνια, το βακτήριο περιγράφηκε, οι δεξαμενές στη φύση βρέθηκαν, και η διαδρομή της λοίμωξης αποσαφηνίστηκε [Derrick E., 1964], αλλά το όνομα παρέμεινε το ίδιο. [Raoult D., 1996; Kovacova E. και Kazar J., 2002]. Το έτος 1937, οι Burnet και Freeman απομόνωσαν και ταυτοποίησαν από ινδικά χοιρίδια τα οποία είχαν μολύνει με παθολογικό υλικό το οποίο τους απέστειλε ο Derrick και προερχόταν από το αίμα των εργατών που νόσησαν στο σφαγείο στο Brisbane, έναν μικροοργανισμό ο οποίος έμοιαζε με ρικέτσια. Ο μικροοργανισμός που απομονώθηκε ονομάστηκε αρχικά *Rickettsia burnetii* [Burnet FM. και Freeman M., 1937], δεδομένου ότι διέθετε ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά με την οικογένεια Rickettsiae, όπως τον αυστηρά ενδοκυτταρικό παρασιτισμό και το γεγονός ότι είχε σαν ξενιστή του κρότωνες, αφού ένα χρόνο μετά, το 1938, οι Cox και Davis απομόνωσαν τον ίδιο μικροοργανισμό από κρότωνες *Dermacentor andersoni* που συλλέχθηκαν κοντά στο Nine Mile Creek στη Μοντάνα [Davis GE. και Cox HR., 1938]. Αργότερα, ο Cornelius B. Phillip, πρότεινε τη δημιουργία ενός νέου γένους, το γένος *Coxiella*, καθώς και τη μετονομασία του βακτηρίου σε *Coxiella burnetii* [Weiss E., 1986], δίνοντας του ένα όνομα προς τιμήν των Cox και Burnet, και το οποίο αντικατοπτρίζει τη σχεδόν ταυτόχρονη απομόνωση του μικροοργανισμού από τους ερευνητές της Αυστραλίας και της Αμερικής.

Η *Coxiella burnetii* μοιάζει με τα μέλη του γένους *Rickettsia* ως προς το ότι είναι αυστηρά ενδοκυττάριο παράσιτο, διαφέρει όμως στους βιοχημικούς μηχανισμούς, στην είσοδο και στην επιβίωση της στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αρχικά τοποθετήθηκε στην τάξη των Rickettsiales και στην οικογένεια των Rickettsiaceae αλλά σύμφωνα με φυλογένεση με βάση την ανάλυση του 16S rRNA, αποδείχθηκε ότι το βακτήριο ανήκει στη γ- υποδιαίρεση των Proteobacteria [Stein A. και άλλοι, 1993] και τοποθετήθηκε σε ένα ξεχωριστό γένος, το γένος *Coxiella*, μαζί με τα γένη *Legionella*, *Franciscella*, και *Rickettsiella* που αποτελούν τους πλησιέστερους συγγενείς του [Maurin M. και Raoult D., 1999].

Το γένος *Coxiella* περιλαμβάνει ένα μοναδικό εκπρόσωπο, την *Coxiella burnetii*, η οποία εμφανίζει μεγάλη φαινοτυπική ποικιλομορφία ως προς τη λοιμογόνο της δύναμη, την

κυτταροπαθογόνο δράση και την ευαισθησία στα αντιβιοτικά. Η *Coxiella burnetii* προκαλεί τον πυρετό Q, μια ανθρωποζωνόσο με παγκόσμια εξάπλωση.

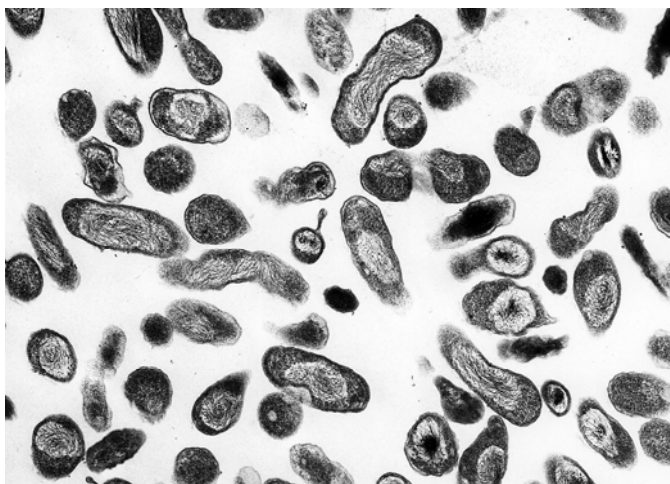
4.2. Βακτηριολογία

Η *C. burnetii* είναι ένας υποχρεωτικά ενδοκυτταρικός, πλειομορφικός βάκιλος (0.2-0.4 μm πλάτος, 0,4-1,0 μm μήκος) (Εικόνα X), που δεν μπορεί να καλλιεργηθεί σε συνήθη υποστρώματα και διαθέτει κυταρική μεμβράνη, παρόμοια με εκείνη των gram-αρνητικών βακτηρίων [Maurin M. και Raoult D., 1999; Κονασινα Ε. και Kazar J., 2002], αλλά παρόλα ταύτα, δε βάφεται με την χρώση Gram.



Εικόνα X: Η *Coxiella. burnetii* όπως φαίνεται στο ΗΜ

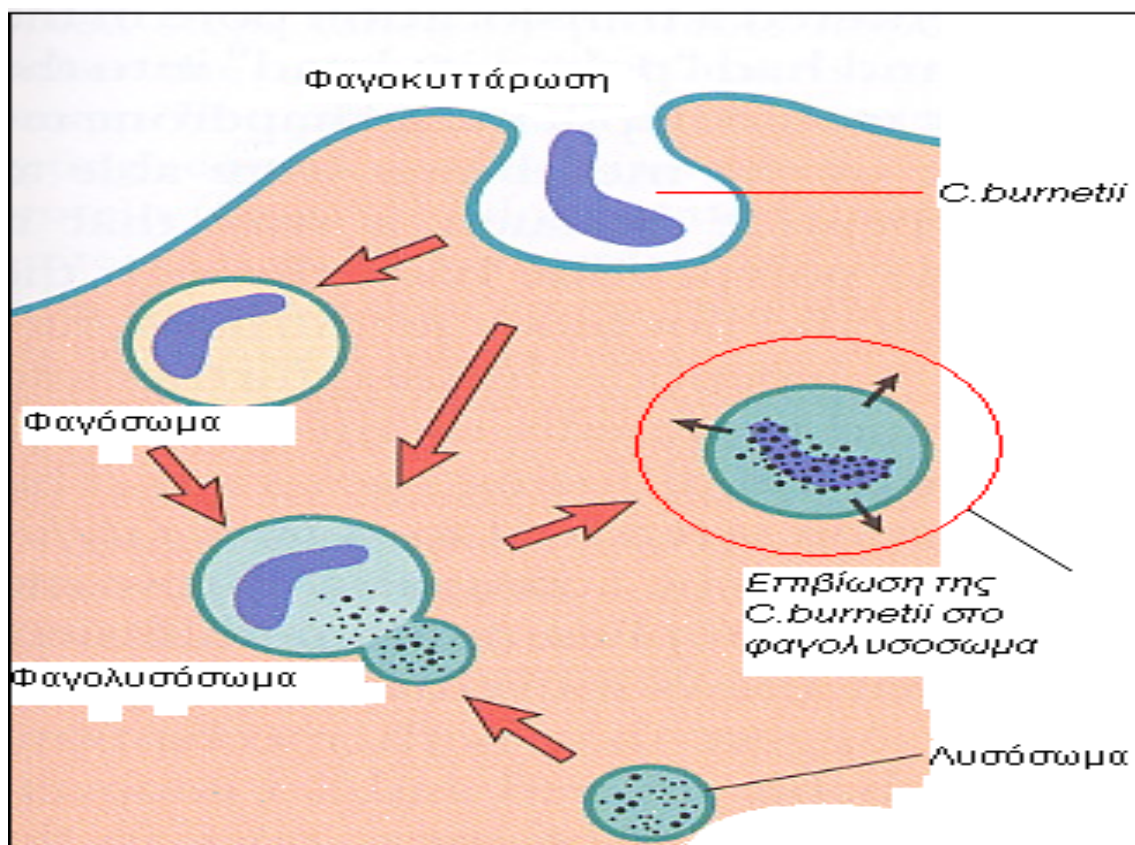
Η χρώση Gimenez [Gimenez DF., 1964] χρησιμοποιείται συνήθως, για να χρωματίσει την *C. burnetii* από παθολογικά υλικά και καλλιέργειες. Το βακτήριο είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στη θερμότητα, την πίεση, και το χημικό stress [Heinzen RA. και άλλοι, 1999], έτσι ώστε να μπορεί να επιβιώνει για μήνες στο περιβάλλον. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή μολυσματικότητα και την εύκολη εξάπλωση στους ανθρώπους, την τοποθετεί στην "κατηγορία Β" των παραγόντων βιολογικού πολέμου [Rotz LD. και άλλοι, 2002].



Εικόνα XI: Ο σχηματισμός ενδοσπορίου καθιστά το βακτήριο ιδιαίτερα ανθεκτικό σε συνθήκες περιβάλλοντος

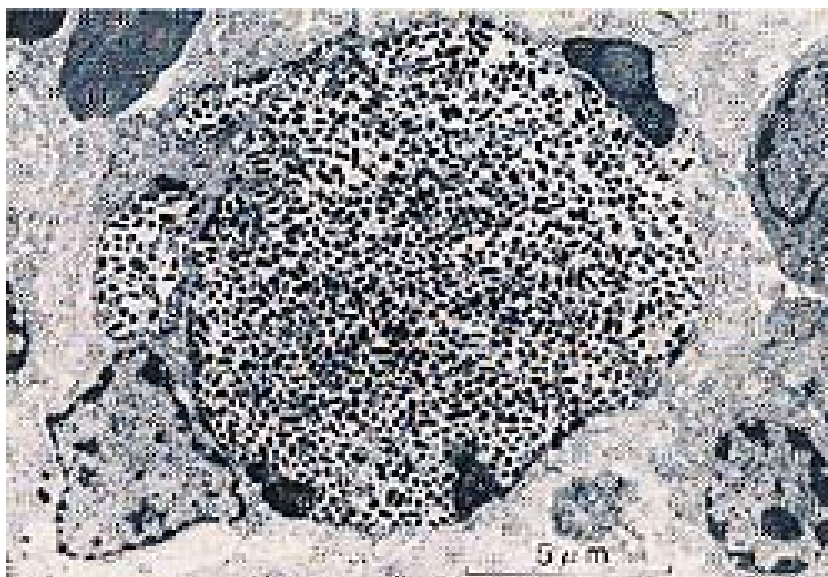
Ως ένα υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό παράσιτο, μπορεί να πολλαπλασιαστεί μόνο εντός των ζωντανών κυττάρων και στη συγκεκριμένη περίπτωση, μέσα στα φαγολυσοσώματα, κάτω από σκληρές συνθήκες όξινου pH [Hackstad T. και Williams JC., 1981]. Η *C. burnetii* διαθέτει ένα σύνθετο ενδοκυτταρικό κύκλο [McCaul TF. και Williams JC., 1981], που οδηγεί στο σχηματισμό μορφών που μοιάζουν με σπόρια (Εικόνα XI). Τα ενδοκυττάρια στάδια της ανάπτυξης της *C. burnetii* περιλαμβάνουν μεταβολικά αδρανείς "small-cell παραλλαγές" (SCV), που αντιστοιχούν στις εξωκυτταρικές μορφές της *C. burnetii*, και "large-cell παραλλαγές" (LCV), που αντιστοιχούν στις μεταβολικά ενεργές ενδοκυτταρικές μορφές του βακτηρίου [Maurin M. και Raoult D., 1999]. Μετά την είσοδο στα φαγοςώματα των ξενιστών-κυττάρων, η *C. burnetii* καθυστερεί τη συγχώνευση των φαγοςωμάτων με τα λυσοσώματα, χρησιμοποιώντας αυτή την καθυστέρηση πιθανώς για να αλλάξει από SCV σε LCV μορφή [Heinzen RA. και άλλοι, 1999; Howe D. και Mallavia LP., 2000] (Εικόνα XII). Η *C. burnetii* αξιοποιεί το όξινο (pH 4,8) του συντηγμένου φαγολυσοσώματος και επιβιώνει [Vogel JP., 2004]. Η *C. burnetii* εμφανίζει αντιγονικές φάσεις, τη φάση I και τη φάση II, που οφείλονται στο λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της μεμβράνης. Η ύπαρξη των δύο φάσεων I και II διαφοροποιεί την *C. burnetii* από τις άλλες «ρικέτσιες», ενώ προσομοιάζει με τη μεταβολή φάσης των εντεροβακτηριοειδών. Η φάση I αντιστοιχεί στη λεία φάση (Smooth) των Gram αρνητικών βακτηριδίων που είναι περισσότερο λοιμογόνος και η φάση II στην κοκκώδη φάση (Rough) η οποία έχει μικρότερη λοιμογόνο δύναμη. Βακτήρια που λαμβάνονται απευθείας από τους ασθενείς ή πειραματόζωα είναι στη φάση I, αλλά και εκείνα

που λαμβάνονται μετά από επαναλαμβανόμενες διόδους σε εμβρυοφόρα αυγά ορνίθων, βρίσκονται στη φάση II [Fournier P. και άλλοι, 1998].



Εικόνα XII: Είσοδος και ενδοκυττάρια ζωή της *C. burnetii*

Η χυμική ανοσολογική απόκριση και η παραγωγή αντισωμάτων στην οξεία νόσο απευθύνεται κυρίως κατά των μικροοργανισμών της φάσης II [Fournier P. και άλλοι, 1998]. Ωστόσο, αδρανοποιημένα εμβόλια που παρασκευάζονται από οργανισμούς στη φάση II, παρέχουν ανεπαρκή προστασία. Στην παραγωγή εμβολίων χρησιμοποιούνται βακτήρια της φάσης I [Ormsbee RA. και Marmion BP., 1990]. Τα στελέχη της *C. burnetii* που απομονώνονται από μια περιοχή είναι γενετικά όμοια [Maurin M. και Raoult D., 1999], και πιθανόν διαφοροποιούνται, από συγγενικά στελέχη που προέρχονται από γειτονικές περιοχές [Jager C. και άλλοι, 1998].



Εικόνα XIII: Ενδοκυττάριος πολλαπλασιασμός της *C. burnetii*

4.3. Οικολογία-Επιδημιολογία

Το φάσμα των φυσικών δεξαμενών (reservoir) της *Coxiella burnetii* είναι πολύ εκτενές και συμπεριλαμβάνει άγρια και οικόσιτα θηλαστικά, πτηνά και αρθρόποδα.

Ο πυρετός Q (*C. burnetii*) διατηρείται στη φύση μέσα από πολύπλοκους κύκλους στους οποίους εμπλέκονται μια ποικιλία ξενιστών, η οποία συμπεριλαμβάνει τους ανθρώπους, τα μηρυκαστικά (βοοειδή, πρόβατα, αίγες), τα ζώζ συντροφιάς/κατοικίδια ζώα (γάτες, σκύλους και κουνέλια), και, σπανίως, τα ερπετά, τα πουλιά, και αρθρόποδα, ιδιαίτερα τους κρότωνα. Έχει απομονωθεί από 40 περίπου είδη κροτώνων και αποδειχθεί ότι, οι κρότωνα εμπλέκονται στον κύκλο ως μεταβιβαστές αλλά και ως ξενιστές της *Coxiella burnetii*. Η αντοχή του μικροοργανισμού είναι πολύ μεγάλη και η *C. burnetii* μπορεί να επιβιώσει στο περιβάλλον για εβδομάδες. Είναι εξαιρετικά λοιμογόνος μικροοργανισμός και ένα ή μερικά μικρόβια αρκούν για να προκαλέσουν νόσο [Raoult D. και άλλοι, 2005].

4.3.1. Ο ρόλος των κροτώνων στη διατήρηση της *C. burnetii*.

Οι μολυσμένοι κρότωνα είναι σημαντικοί στη διατήρηση του φυσικού κύκλου της *C. burnetii*. Κάθε είδος κρότωνα, που παρασιτεί έναν επιδεκτικό ξενιστή σε μια γνωστή ενδημική περιοχή, αναμένεται να φιλοξενεί και να διαδίδει την *C. burnetii*, συνεπώς, αποτελεί μεταβιβαστή και δεξαμενή του παράγοντα [Kazar J., 1999]. Η *C. burnetii* μπορεί να μεταδίδεται από περισσότερα από 40 φυσικώς μολυσμένα είδη κροτώνων, οι οποίοι δύνανται να μεταβιβάζουν τον παράγοντα τόσο κάθετα (transtadially ή transovarially στους απογόνους

τους αλλά και οριζοντίως (μέσω δήγματος ή με τα κόπρανα) σε άγρια σπονδυλωτά και άγρια πτηνά, δημιουργώντας έτσι την κοξιέλλωση (coxiellosis) των άγριων ζώων [Lang GH., 2005]. Τα είδη των κροτώνων που αποτελούν τους πιο συχνούς μεταβιβαστές της *C. burnetii* ανήκουν στα γένη *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, και *Dermacentor* [Parola P. και Raoult D., 2001].

4.3.2. *C. burnetii* (Coxiellosis) και σπονδυλωτά-ξενιστές

Οι κρότωνες δεν μεταδίδουν την *C. burnetii* με το δήγμα τους στους ανθρώπους, αλλά μπορεί να το κάνουν με τα κατοικίδια ζώα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία της κοξιέλλωσης των ζώων, η οποία διατηρείται στη φύση και μεταδίδεται είτε με άμεση επαφή με τα μολυσμένα ζώα, είτε με επαφή με μολυσμένα υλικά/ κτηνοτροφικό εξοπλισμό [Lang GH., 1990]. Τα ζώα και κυρίως τα οικόσιτα μηρυκαστικά, βοοειδή, πρόβατα, αίγες διασπείρουν την *C. burnetii* με τις εκκρίσεις τους, και κυρίως τα προϊόντα του τοκετού, έμβρυα και λόχεια, τα οποία αντιπροσωπεύουν την πιο σημαντική πηγή της λοίμωξης στον άνθρωπο [Arricau-Bouvery N. και άλλοι, 2003; Marrie TJ., 1990; Stoker MG. και Marmion BP., 1955; Berri M. και άλλοι, 2001]. Στα μολυσμένα ζώα, το βακτήριο εντοπίζεται στα ούρα, τα κόπρανα, το γάλα και ιδιαιτέρως στα λόχεια κατά τη διάρκεια του τοκετού. Το τελευταίο αποτελεί και μια από τις πιο σημαντικές πηγές μόλυνσης του περιβάλλοντος με *C. burnetii*, αφού σε αυτά τα υλικά εντοπίζονται πάρα πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του βακτηρίου. Ένα γραμμάριο μολυσμένου πλακούντα μπορεί να περιέχει αρκετά βακτήρια να μολύνει 100000000 ινδικά χοιρίδια [Stoker MG. και Marmion BP., 1955]. Η μόλυνση θα μπορούσε να επιτευχθεί επίσης, από ζώα συντροφιάς, δηλαδή γάτες [Langley JM. και άλλοι, 1988] και σκύλους [Komiya T. και άλλοι, 2003], τα οποία μολύνονται τρεφόμενα με μολυσμένο πλακουντικό υλικό και μερικές φορές ακόμη και από τα κατοικίδια πτηνά [Rehacek J. και Tarasevich IV., 1988] ή τα περιστέρια [Stein A. και Raoult D., 1999]. Η λοίμωξη από *C. burnetii* στα εκτρεφόμενα ζώα, συνήθως είναι ασυμπτωματική/υποκλινική αλλά έχει συσχετιστεί με στειρότητα, αποβολές εμβρύων, θνησιγένεια και γενικότερα με τη γέννηση θνησιγενών νεογνών στις αίγες και τα πρόβατα [Lang GH., 1990]. Υψηλός επιπολασμός της *C. burnetii* βρέθηκε σε δείγματα από δεξαμενές γάλακτος, σε εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στις ΗΠΑ [Kim SG. και άλλοι, 2005]. Σε άλλες χώρες ο ρόλος των αγελάδων στη διάδοση της λοίμωξης από *C. burnetii* αντικαθίσταται από τα πρόβατα [Hellebrand W. και άλλοι, 2001] και τις αίγες [Serbezov V. και άλλοι, 1999]. Οι χοίροι αν και μολύνονται και καθίστανται οροθετικοί, σπάνια μολύνουν τους ανθρώπους [Lang G., 1990].

Τα άγρια ζώα δεν αποτελούν άμεση πηγή της λοίμωξης του ανθρώπου με *C. burnetii*, αλλά συμβάλλουν στη διατήρηση του παράγοντα στη φύση. Εκτός από τα πιο σημαντικά, μικρά άγρια τρωκτικά, η *C. burnetii* βρέθηκε και σε εντομοφάγα, λαγόμορφα, σαρκοφάγα, οπληφόρα, μαρσιποφόρα, πιθήκους, νυχτερίδες, και πτηνά, και μάλιστα σε ερπετά και ψάρια [Rehacek J. και Tarasevich IV., 1988; McQuiston JH. και Childs JE., 2002; Hirai K. και To H., 1998; Lang G., 1990; Marrie T. και άλλοι, 1993; Woldehiwet Z., 2004]. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, τα άγρια ποντίκια είχαν προταθεί ως σημαντική δεξαμενή της *C. burnetii* [Webster JP. και άλλοι, 1995], και επειδή μπορεί να χρησιμεύσουν ως λεία για τις κατοικίδιες γάτες, θα μπορούσαν να διατηρήσουν την *C. burnetii* μεταξύ σποραδικών επιδημιών του ανθρώπου. Τα αποδημητικά πτηνά είναι σε θέση να εξαπλώσουν την *C. burnetii* σε μεγάλες αποστάσεις μέσω των κοπράνων και των εκτοπαρασίτων τους [Rehacek J. και Tarasevich IV., 1988]. Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι η άγρια πανίδα αποτελεί δεξαμενή καθώς αποτελεί δυνητική πηγή του πυρετού Q [Madariaga MG., 2005].

Παρά τη χρήση κάποιων εμβολίων [Serbezov VS. και άλλοι, 1999], λίγες προσπάθειες έχουν καταβληθεί για τον έλεγχο της *C. burnetii* στα ζώα, καθώς σπάνια αναγνωρίζεται ως οικονομικώς σημαντική ασθένεια [Hirai K. και To H., 1998; Woldehiwet Z., 2004; Centinkaya B. και άλλοι, 2000]. Οι αληθινές επιπτώσεις επί των εσόδων είναι ακαθόριστες και αβέβαιες, δεδομένου ότι η λοίμωξη από *C. burnetii* σχετίζεται με πλακουντίτιδες, αποβολές, στειρότητα, και γέννηση εμβρύων χαμηλού βάρους [Hatchette TF. και άλλοι, 2001; Berri M. και άλλοι, 2000; To H. και άλλοι, 1998]. Ο ψηλός οροεπιπολασμός συνδέεται με προβλήματα αναπαραγωγής σε εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής [Lang G., 1990; To H. και άλλοι, 1998]. Πολλές μελέτες οροεπιπολασμού που έγιναν σε δείγματα ζώων για ευκολία ή έχουν ακολουθήσει ανθρώπινα κρούσματα, καθιστούν δύσκολες τις γενικεύσεις. Ορισμένα από τα αναφερόμενα ποσοστά είναι τα ακόλουθα: Στο Κεμπέκ, το 41% των προβάτων [Dolce P. και άλλοι, 2003], στην Ανατολική Τουρκία, το 11% των προβάτων και το 6% των βοοειδών [Centinkaya B. και άλλοι, 2000], στις ΗΠΑ, το 41% των αιγών, το 17% των προβάτων, και το 3% των βοοειδών [McQuiston JH. και Childs JE., 2002], και στο Τσαντ, το 80% των καμήλων [Schelling E. και άλλοι, 2003]. Οι τιμές στα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής στην Ιαπωνία κυμαίνονται από 20% μέχρι 30% [Hirai K. και To H., 1998]. Η οροθετικότητα για τις εκτροφές είναι πολύ ψηλότερη. Για παράδειγμα, αν και μόνο το 6% των βοοειδών ήταν οροθετικά στην Ανατολική Τουρκία, 35% των εκτροφών είχε τουλάχιστον ένα οροθετικό ζώο [Centinkaya B. και άλλοι, 2000]. Παρομοίως, στο Κεμπέκ, όπου το 41% των προβάτων ήταν οροθετικά, αυτά περιλαμβάνονταν στο 89% των

εξετασθέντων ποιμνίων [Dolce P. και άλλοι, 2003]. Η επίπτωση αυξάνει όσο πιο εντατική είναι η κτηνοτροφία [Caruano F. και άλλοι, 2001]. Εντός των εκτροφών, ο οροεπιπολασμός είναι κυκλικός [Yanase T. και άλλοι, 1997] και είναι υψηλότερος, αμέσως μετά από την περίοδο των τοκετών [Enright J. και άλλοι, 1971]. Η χρόνια λοίμωξη έχει αναφερθεί πιο συχνά στα βοοειδή και στις αίγες παρά στα πρόβατα [Maurin M. και Raoult D., 1999; Hirai K. και To H., 1998; Lang G., 1990]. Η μετάδοση από τα ζώα στον άνθρωπο επηρεάζεται από την μεταξύ τους επαφή, την πυκνότητα των ζώων, την ποικιλομορφία των ειδών, καθώς και άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες [Marric TJ., 1990].

4.3.3. *C. burnetii* (πυρετός Q) - Μετάδοση στον άνθρωπο

Οι συνήθεις πηγές μόλυνσης του ανθρώπου με *Coxiella burnetii* είναι τα οικόσιτα μηρυκαστικά όπως βοοειδή, αίγες και πρόβατα, καθώς τα ζώα, αποβάλλουν το μικρόβιο με τα κόπρανα, τα ούρα, το γάλα και τα προϊόντα του τοκετού/λοχείας. Τα βακτήρια αποβάλλονται από τις διάφορες εκκρίσεις των μολυσμένων ζώων στο έδαφος είναι ιδιαίτερος ανθεκτικά στην αποξήρανση και παραμένουν ζωντανά στο περιβάλλον ακόμη και για χρόνια. Η μετάδοση στον άνθρωπο γίνεται μέσω της εισπνοής μολυσμένων αερολυμάτων (aerosols) τα οποία προκύπτουν απευθείας από τις εκκρίσεις μολυσμένων ζώων, ή μπορούν να επιμολύνουν τα νεογνά, τον πλακούντα ή το μαλλί. [Maurin M. και Raoult D., 1999]. Εξ αιτίας της μακροχρόνιας επιβίωσης της *C. burnetii* στο περιβάλλον, ο πυρετός Q μπορεί να θεωρηθεί ως αερογενής λοίμωξη που εξαπλώνεται από περιοχές με φάρμες, στις αστικές περιοχές και σε πολλά απρόσμενα μέρη [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 2004]. Η μολυσματική σκόνη αποτελεί πηγή μόλυνσης για ανθρώπους και ζώα. [Parker NR. και άλλοι, 2006].

Επιπλέον έχουν υπάρξει αναφορές όπου άλλα οικόσιτα ζώα όπως γάτες και σκύλοι αποτέλεσαν πηγή μόλυνσης με *C. Burnetii*.

Σπανιότερα, η μόλυνση στον άνθρωπο μπορεί να προκύψει δια μέσου του γαστρεντερικού σωλήνα. Έχει αναφερθεί μετάδοση στον άνθρωπο μέσω της πεπτικής οδού, αλλά παραμένει αμφιλεγόμενη, αφού αφ' ενός σε αρκετές περιπτώσεις κρουσμάτων έχει καταγραφεί άμεση σύνδεση της λοίμωξης με την κατανάλωση μολυσμένου νωπού γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων [Fishbein DB. και Raoult D., 1992], αφ' ετέρου εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκε μολυσμένο γάλα δεν νόσησαν από πυρετό Q [Kazar J., 1999]. Η σεξουαλική, η από άτομο σε άτομο, και η από του δέρματος (συμπεριλαμβανομένης και της κροτωγενούς) μετάδοσης, είναι σπάνιες [Kazar J., 1999], καθώς και οι νοσοκομειακές λοιμώξεις είναι σπάνιες, ωστόσο όμως έχουν αναφερθεί [Osorio S. και άλλοι, 2003].

Παρά τη γενικώς παραδεκτή σύνδεση του πυρετού Q με τα μηρυκαστικά, η άμεση έκθεση σε αυτά δεν είναι απαραίτητη για τη μόλυνση, όπως φαίνεται σε πρόσφατες αναφορές περιστατικών κατά τα οποία οι ασθενείς δεν σχετίζονταν με προφανείς παράγοντες κινδύνου για την ασθένεια, εκτός από ότι βρίσκονταν σε ενδημική περιοχή [Parker NR. και άλλοι, 2006; Hartzell JD. και άλλοι, 2007; Leung-Shea C. και Danaher PJ, 2006].

4.3.4. Η άμεση έκθεση σε ζώα

Οι περισσότερες λοιμώξεις πυρετού Q προκύπτουν από την εισπνοή μολυσμένων σωματιδίων αερολυμάτων από υλικά τοκετών ή σφαγής μηρυκαστικών [Derrick E., 1964; Hirai K. και To H., 1998; Woldehiwet Z., 2004]. Περιβαλλοντική μόλυνση που σχετίζεται με αυτά τα γεγονότα διαρκεί για μήνες [Williams JC., 1991] ή ενδεχομένως για χρόνια [van Woerden HC. και άλλοι, 2004], έτσι η εισπνοή της σκόνης να είναι επίσης πολύ σημαντική [Marrig TJ., 1990]. Τα βοοειδή, τα πρόβατα, και οι αίγες αποτελούν τις κύριες πηγές [Maurin M. και Raoult D., 1999; Derrick E., 1964; Ormsbee RA. και Marmion BP., 1990]. Η επαγγελματική έκθεση σε προϊόντα ζωικής προέλευσης, ιδίως των δερμάτων και του μαλλιού, αποτελούν επίσης κινδύνους, πιθανώς μέσω της εισπνοής κοπράνων κροτώνων [Derrick E., 1961], συνεπεία του ότι οι κρότωσης συγκεντρώνουν το μικροοργανισμό στα κόπρανα τους [Maurin M. και Raoult D., 1999]. Οι άνθρωποι σπάνια, αν όχι ποτέ, μολύνονται μέσω δήγματος από κρότωσης [Maurin M. και Raoult D., 1999]. Η νόσος συνδέεται επίσης με την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων [Fishbein D. και Raoult D., 1992] καθώς και την επαφή με μολυσμένο ρουχισμό [Varga V., 1997].

Ο πυρετός Q μπορεί να θεωρηθεί πρωτίστως ως επαγγελματική ασθένεια των εργαζομένων σε στενή επαφή με παραγωγικά ζώα ή την επεξεργασία των προϊόντων τους, σε εργαζόμενους στα εργοστάσια επεξεργασίας βαμβακιού, σε ερευνητές και προσωπικό εργαστηρίων, σε φοιτητές της κτηνιατρικής. Όμως μπορεί να συμβεί και σε γενικό πληθυσμό που διαμένει σε περιοχές υψηλού κινδύνου ή επισκέπτες- ταξιδιώτες σε περιοχές όπου ο πυρετός Q ενδημεί [Kazar J., 1999]. Αυξημένη συχνότητα της νόσου παρατηρείται σε ενήλικα άτομα, στους άνδρες από ότι στις γυναίκες [Kazar J., 1999]. Η συχνότερη και η πιο σοβαρή εμφάνιση της νόσου στους άνδρες μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τον επαγγελματικό χαρακτήρα του πυρετού Q και από ορμονικούς παράγοντες που σχετίζονται με το φύλο [Leone M. και άλλοι, 2004]. Παράγοντες που σχετίζονται με την εθνότητα ή τη φυλετική καταγωγή, φαίνεται να μην έχουν καμία σημασία. Όσον αφορά την εποχιακή εμφάνιση, ο οξύς πυρετός Q στην

Ευρώπη αναφέρεται πιο συχνά κατά την άνοιξη και τις αρχές του καλοκαιριού [Maurin M. και Raoult D., 1999].

4.3.5. Η έμμεση έκθεση σε ζώα

Πολλά άτομα με πυρετό Q δεν έχουν άμεση επαφή με ζώα [Carrieri MP. και άλλοι, 2002; van Woerden HC. και άλλοι, 2004; Beck MD. και άλλοι, 1949]. Η αερογενής εξάπλωση είναι αναγνωρισμένη πολύ καλά [Boschini A. και άλλοι, 1999], και μελέτες δείχνουν ο οργανισμός μπορεί να ταξιδεύει πολλά χιλιόμετρα [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1999; Hawker JI. και άλλοι, 1998]. Οι κάτοικοι της υπαίθρου μπορούν να μολυνθούν από τα φορτηγά που μεταφέρουν βοοειδή, πρόβατα, ή μολυσμένη στρωμνή [Salmon M. και άλλοι, 1982; Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1999]. Κρούσματα συμβαίνουν σε αστικές περιοχές [Carrieri MP. και άλλοι, 2002; Salmon M. και άλλοι, 1982; Hawker JI. και άλλοι, 1998] και η προαστιακή διείσδυση σε αγροτικές περιοχές φέρνει περισσότερα άτομα σε επαφή με τα ζώα.

4.3.6. Μετάδοση από άτομο σε άτομο

Ο πυρετός Q είναι κυρίως ζωνοσός, και η μετάδοση από άτομο σε άτομο, είναι σπάνια [Marrig TJ., 1990]. Υπάρχουν δύο αναφορές από τις αρχικές, που μιλούν για εξάπλωση μέσω του αναπνευστικού μετά από διενέργεια νεκροψιών [Stoker MG. και Marmion BP., 1955], και μία πρόσφατη αναφορά περιστατικού για αναπνευστική νοσοκομειακή εξάπλωση [Osorio S. και άλλοι, 2003], αν και η προτεινόμενη περίοδος επώασης είναι μεγάλη. Πυρετός Q ακολούθησε μεταμόσχευση μυελού των οστών [Kanfer E. και άλλοι, 1988] και υπάρχει μια αναφορά της μετάδοσης μέσω μετάγγισης αίματος [Pantanowitz L. και άλλοι, 2002]. Ένας γυναικολόγος είχε μολυνθεί όταν παρακολουθούσε μια μολυσμένη με πυρετό Q, έγκυο γυναίκα και στην περίπτωση αυτή υπήρξε επίσης και κάθετη μετάδοση [Raoult D. και Stein A., 1994]. Σεξουαλική μετάδοση πιθανότατα εμφανίζεται [Milazzo A. και άλλοι, 2001].

4.3.7. Βιοτρομοκρατία

Οι ισχυρισμοί ότι ένας μόνο οργανισμός *C. burnetii* μπορεί να προκαλέσει ασθένεια σε ευπαθή άτομα [Bartlett JG., 2000; Madariaga MG. και άλλοι, 2003; CDC, 2003; Ayres JG. και άλλοι, 2002] έχει συμβάλει ώστε η *C. burnetii* να ταξινομείται ως παράγοντας βιοτρομοκρατίας κατηγορίας B. Παρόλο που έχει χαμηλό ποσοστό θνητότητας, πληροί κριτήρια, όπως είναι η ευκολία της παρασκευής, της σταθερότητας στο περιβάλλον, και της ικανότητάς του να προκαλεί ασθένεια [Madariaga MG. και άλλοι, 2003]. Ο πυρετός Q

αποτελεί επίσης μέρος της στρατιωτικής ιστορίας, με ορισμένες μονάδες στρατού να έχουν ποσοστά άνω του 30% κατά τη διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου [Williams JC., 1991].

Η περίοδος επώασης είναι συνήθως 2-3 εβδομάδες [Dumler SJ, 2002], αλλά είναι δοσοεξαρτώμενη [Derrick E., 1937; Tigertt W. και άλλοι, 1961] με τις 4 μέρες [Marrie T. και άλλοι, 1988] και τις 6 εβδομάδες να εκπροσωπούν τις ακραίες περιπτώσεις [Raoult D. και Marrie T., 1995; Madariaga MG. και άλλοι, 2003].

4.3.8. Γεωγραφική κατανομή

Ο πυρετός Q, είναι μια παγκόσμια ζωνόσος που απαντάται σε όλες τις γεωγραφικές και κλιματολογικές ζώνες [Kazar J., 1999]. Η Νέα Ζηλανδία, αποτελεί την μόνη μεγάλη χώρα που δεν αναφέρεται ο πυρετός Q, γεγονός που οφείλεται πιθανότατα στη σχετική γεωγραφική απόσταση/απομόνωση και στα αυστηρά μέτρα ελέγχου [Hilbink F. και άλλοι, 1993; Greenslade E. και άλλοι, 2003]. Η νόσος υπό-διαγιγνώσκεται και υπο-δηλώνεται [Bartlett JG., 2000; McQuiston JH. και Childs JE., 2002; Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1992]. Στη βορειοδυτική Αυστραλία, δεν υπήρχε δήλωση πυρετού Q για 15 χρόνια, την ίδια στιγμή που το 66% από 59 άτομα που αποτάθηκαν για εμβολιασμό είχαν ενδείξεις προϋπάρχουσας ανοσίας [Mak DB. και άλλοι, 2003]. Τα ποσοστά αυξάνονται και μειώνονται σε μια περιοχή ανάλογα με το ενδιαφέρον για τον έλεγχο που επιδεικνύουν οι υπηρεσίες υγείας [Raoult D., 1996; Levy PY. και άλλοι, 1999; Marrie TJ., 2003] και την ευαισθησία της δοκιμής που εφαρμόζεται για την εργαστηριακή διάγνωση [Richardus J. και άλλοι, 1987]. Η πραγματική επίπτωση προφανώς διαφέρει κατά καιρούς [Marrie TJ. και Pollak PT., 1995], καθώς η επαφή μεταξύ των ανθρώπων και των ζώων αλλάζει [Dupuis G. και άλλοι, 1987; Serbezov VS. και άλλοι, 1999; Derrick E., 1961; Marmion BP. και άλλοι, 1990]. Στα παιδιά η λοίμωξη συνήθως διαδράμει ασυμπτωματικά [Jorm LR. και άλλοι, 1990], και οι περισσότερες λοιμώξεις συμβαίνουν σε πρόωρη παιδική ηλικία [Konacova E. και Kazar J., 2002; Hirai K. και To H., 1998].

Αν και ο πυρετός Q έχει παγκόσμια κατανομή, ορισμένες χώρες παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Τα ποσοστά που ορίζονται στη Γαλλία (500 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκους) και την Αυστραλία (38 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκους) είναι μεγαλύτερα από εκείνα των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (0,28 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκους), και το πιθανότερο αντανακλούν τη διαφορά της σημασίας των ζώων-ξενιστών που υπάρχει μεταξύ των διαφόρων χωρών [McQuiston JH. και

άλλοι, 2006]. Από τότε που ο πυρετός Q έγινε υποχρεωτικά δηλωτέο νόσημα στις ΗΠΑ το 1999, ο αριθμός των περιπτώσεων έχει αυξηθεί δραματικά. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, οι περιπτώσεις πυρετού Q στις ΗΠΑ έχουν αυξηθεί από 21 περιπτώσεις ανά έτος (1978-1999) σε 51 περιπτώσεις ανά έτος (2000-2004). Οι πολιτείες με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είναι οι κεντροδυτικές, ωστόσο η Καλιφόρνια αναφέρει το μεγαλύτερο συνολικό αριθμό των περιστατικών [McQuiston JH. και άλλοι, 2006]. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι πυρετός Q δεν θα πρέπει πλέον να θεωρείται ως νόσος επαγγελματικής επικινδυνότητας (αγρότες, εργαζόμενοι στα σφαγεία, ή κτηνίατροι) στις Ηνωμένες Πολιτείες, αλλά μάλλον σαν μια ενδημική περιβαλλοντική ασθένεια.

Από το 1991 έως το 2004, η Αυστραλία είχε μέση ετήσια συχνότητα τρεις περιπτώσεις ανά 100,000 πληθυσμού [NNDSS, 2005; Maurin M. και Raoult D., 1999; Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1992]. Η αναφερόμενη επίπτωση στην Αυστραλία συνδέεται έντονα με την παρουσία του ζωικού κεφαλαίου και των σφαγείων [Garner MG. και άλλοι, 1997]. Αν και σε εθνικό επίπεδο, από το 1999, οι περιπτώσεις είναι κοινοποιήσιμες στις ΗΠΑ, η συλλογή στοιχείων είναι ελλιπής [McQuiston JH. και Childs JE., 2002], με μόνο 21, 26, και 61 περιπτώσεις να έχουν αναφερθεί το 2000, το 2001, και το 2002, αντίστοιχα [CDC, 2004]. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, αναγνωρίζονται περίπου 70 ύποπτες περιπτώσεις το χρόνο [van Woerden HC. και άλλοι, 2004]. Στη Γαλλία, από το 1994 -1998, διαγνώστηκαν από το εθνικό εργαστήριο αναφοράς κατά μέσο όρο 100 οξείες και 32 χρόνιες περιπτώσεις πυρετού Q [Raoult D. και άλλοι, 2000].

Η αναλογία της νόσου σε άνδρες-γυναίκες 5.3: 1 έχει αναφερθεί στην Αυστραλία [Garner MG. και άλλοι, 1997] και 2.5: 1 στη Γαλλία [Raoult D. και άλλοι, 2000]. Αυτοί οι δείκτες δείχνουν πιθανόν μεγαλύτερη επαγγελματική έκθεση στους άνδρες [Boland PJ. και Parker NR., 1999; Beck MD. και άλλοι, 1949], πιθανόν όμως τα υψηλότερα ποσοστά της νόσου στους άνδρες, μπορεί επίσης να οφείλονται σε μεγαλύτερη ευαισθησία [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1992]. Μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η οιστραδιόλη φαίνεται να έχει προστατευτική επίδραση στα ζώα [Leone M. και άλλοι, 2004].

4.3.9. Οροεπιδημιολογικές μελέτες σε γενικό υγιή πληθυσμό

Αρκετές οροεπιδημιολογικές μελέτες έχουν δημοσιευθεί [Marrigie TJ., 1990]. Σε μελέτη στην Ολλανδία, σε υγιείς αιμοδότες, ο οροεπιπολασμός κυμάνθηκε από 31% - 73%. Τα παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών, εμφάνιζαν παρόμοια ποσοστά με τους ενήλικες από την ίδια περιοχή [Richardus J. και άλλοι, 1987]. Χαμηλότερα ποσοστά οροεπιπολασμού έχουν βρεθεί

στη Νέα Σκωτία (15%) [Marrie TJ. και Pollak PT., 1995] και σε αιμοδότες από Kent (4%) [Marmion BP. και άλλοι, 1956]. Οι οροεπιδημιολογικές μελέτες είναι δύσκολο να συγκριθούν, δεδομένου ότι οι ερευνητές χρησιμοποιούν διαφορετικές εξετάσεις και διαφορετικά cut-off [McQuiston JH. και Childs JE., 2002; Richardus J. και άλλοι, 1987; Bolanos M. και άλλοι, 2003]. Η εκτίμηση του χρόνου της έκθεσης από την έρευνα του επιπολασμού, εξαρτάται από τις υποθέσεις σχετικά με την επιμονή των αντισωμάτων και το αποτέλεσμα της εκ νέου έκθεσης στο παθογόνο [Marrie TJ. και Pollak PT., 1995]. Αυτές οι υποθέσεις μερικές φορές [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1992], αλλά όχι πάντα [Richardus J. και άλλοι, 1987], δεν καθίστανται σαφείς.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με μια εκτεταμένη έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 1990 σε 3.686 δείγματα ασθενών οι οποίοι είχαν νοσήσει από «άτυπες πνευμονίες», το 4,7% των ασθενών είχαν αναπτύξει αντισώματα έναντι της *C. burnetii* [Alexiou-Daniil S. και άλλοι, 1990]. Μεταξύ του 1989 και του 1993, στο Κέντρο Αναφοράς Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) στο Ηράκλειο της Κρήτης διαγνώστηκαν ορολογικά 98 περιπτώσεις πυρετού “Q”. Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών (73,5%) ήταν άντρες, ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις διαγνώστηκαν την περίοδο μεταξύ Ιανουαρίου και Ιουνίου. Το ένα τρίτο των ασθενών (35,4%) είχαν έρθει σε επαφή με ζώα ή/και μη-παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα [Tselentis Y. και άλλοι, 1995].

Στην Κύπρο, στα τέλη του 1960 ο Kelly [Kelly HB, 1974] είχε προβεί σε διερεύνηση 547 ορών αίματος που λήφθηκαν τυχαία από ανθρώπους στο Γενικό Νοσοκομείο Λευκωσίας κατά τα έτη 1968 και 1969. Το 5,3% των ορών αποδείχθηκαν θετικοί με τη μέθοδο της εκτροπής συμπληρώματος αντισωμάτων φάσης 2 του αντιγόνου της *C. burnetii*. Επιπλέον, σε οροεπιδημιολογική μελέτη που έγινε το 1996-1999, ο οροεπιπολασμός των IgG αντισωμάτων έναντι της *Coxiella burnetii* σε τυχαίο δείγμα γενικού ανθρώπινου πληθυσμού ήταν 34,3% (με cut off το 1/120) ενώ με cut off το 1/60 ο οροεπιπολασμός των IgG αντισωμάτων στο τυχαίο δείγμα του γενικού πληθυσμού ήταν 42,7% [Psaroulaki A. και άλλοι, 2006].

4.4. Κλινική εικόνα

Ο πυρετός Q στον άνθρωπο παρουσιάζει μια μεγάλη ποικιλομορφία κλινικών εκδηλώσεων και μπορεί να εκδηλωθεί σε δυο μορφές, την οξεία και τη χρόνια μορφή. Η παρουσίαση της ασθένειας είναι πράγματι ποικιλόμορφη και η αρχική μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε ασυμπτωματική ορομετατροπή, στην οξεία μορφή της νόσου (η οποία κυμαίνεται από μια

ψευδογριπώδη συνδρομή μέχρι μια πολύ σοβαρή πνευμονία η οποία χρήζει εντατικής παρακολούθησης και θεραπείας), ή τέλος σε χρόνια μόλυνση (η οποία εκδηλώνεται κυρίως ως ενδοκαρδίτιδα ή ηπατίτιδα) [Maurin M. και Raoult D., 1999].

Η **οξεία λοίμωξη** είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη. Η περίοδος επώασης διαρκεί από 2 -3 εβδομάδες και είναι ανάλογη με τον αριθμό των εισβαλλόντων μικροοργανισμών. Η νόσος συχνά υποδιαγνώσκεται δεδομένου ότι τα συμπτώματα ποικίλλουν και είναι μη ειδικά [Raoult D., 1996; Fournier P. και άλλοι, 1998; McQuiston JH. και Childs JE., 2002]. Δεν εμφανίζεται πάντα πυρετός [Levy PY. και άλλοι, 1999; Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1992], γεγονός που καθιστά ακόμα πιο δύσκολη τη διάγνωση. Η θνητότητα είναι 1-2% [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1992; Kermode M. και άλλοι, 2003]. Σπάνια έχουμε την εμφάνιση μυοκαρδίτιδας (<1%), η οποία όμως αποτελεί μία από τις πιο κοινές αιτίες θανάτου [Fournier P. και άλλοι, 2001]. Εξάνθημα εμφανίζεται στο 5-20% των περιπτώσεων [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1992; de Alarcon A. και άλλοι, 2003]. Η πνευμονία από πυρετό Q παρουσιάζεται με βήχα, που συχνά είναι παραγωγικός, και πλευριτικό-θωρακικό πόνο. Τα ευρήματα στις ακτινογραφίες του θώρακα και στην αξονική τομογραφία δεν είναι ειδικά [Gikas A. και άλλοι, 1999; Voloudaki AE. και άλλοι, 2000]. Η πνευμονία είναι συνήθως ήπια, αλλά περιστασιακά εμφανίζεται αναπνευστική δυσχέρεια που χρειάζεται μηχανικό αερισμό [Marrig JT., 2003]. Ηπατίτιδα με ίκτερο εμφανίζεται σπάνια [Maurin M. και Raoult D., 1999], αλλά η εμφάνιση ηπατομεγαλίας και η αύξηση των τιμών των ηπατικών ενζύμων είναι κοινές.

Η **χρόνια λοίμωξη** με *Coxiella burnetii* μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρότατες επιπλοκές με κατάληξη τον θάνατο. Μπορεί να παρουσιαστεί ένα μήνα [Fenollar F. και άλλοι, 2001] ή χρόνια μετά την οξεία ασθένεια, ή ενδέχεται να μην υπάρχει ιστορικό οξείας νόσου [Wilson H. και άλλοι, 1976]. Η ενδοκαρδίτιδα αντιπροσωπεύει το 60-70% των περιπτώσεων χρόνιου πυρετού Q [Raoult D. και Marrig T., 1995] και στη Μασσαλία της Γαλλία 15% των ενδοκαρδίτιδων προκαλείται από την *C. burnetii* [Marrig TJ. και Raoult D., 1997]. Ο πυρετός συχνά απουσιάζει, και οι εκβλαστήσεις συνήθως απουσιάζουν ή είναι μικρές [Marrig TJ. και Raoult D., 1997; Lepidi H. και άλλοι, 2003]. Συνήθως υπάρχει κατά μέσο όρο, ένα διάστημα 12 μηνών μεταξύ της έναρξης της νόσου και της διάγνωσης, [Marrig TJ. και Raoult D., 1997] και αυτή η καθυστέρηση συμβάλλει ουσιαστικά στην θνησιμότητα [Maurin M. και Raoult D., 1999; Raoult D. και Marrig T., 1995]. Σε όλους τους ασθενείς με αρνητικές καλλιέργειες για ενδοκαρδίτιδα, πρέπει ο πυρετός Q να αποκλείεται [Fournier P. και άλλοι, 1998]. Ενδοκαρδίτιδες χωρίς αντιβιοτική θεραπεία, είναι συνήθως θανατηφόρες [Rolain J. και άλλοι, 2003]. Η ενδοκαρδίτιδα αναπτύσσεται συνήθως σε άτομα με υποκείμενη νόσο. Σε μια σειρά

102 περιπτώσεων στη Γαλλία, 95 από αυτούς είχαν προϋπάρχουσα βαλβιδοπάθεια, πέντε είχαν ανοσοκατασταλτική ασθένεια, και μόνο δύο δεν είχαν τίποτε από αυτά [Fenollar F. και άλλοι, 2001].

Οι αγγειακές λοιμώξεις είναι η δεύτερη πιο συχνή μορφή της χρόνιας νόσου. Αορτικά ανευρύσματα ή αγγειακά μοσχεύματα συχνά εμπλέκονται, [Botelho-Nevers E. και άλλοι, 2007]. Η θνητότητα είναι υψηλή (25%), ωστόσο, η χειρουργική αντιμετώπιση, αποφέρει βελτίωση του αποτελέσματος [Botelho-Nevers E. και άλλοι, 2007]. Σπάνιες εκδηλώσεις του χρόνιου πυρετού Q, περιλαμβάνουν οστεομυελίτιδα, κοκκιωματώδη ηπατίτιδα, και χρόνιες πνευμονικές λοιμώξεις [Parker NR. και άλλοι, 2006].

Επιπλέον, το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης έχει αναφερθεί σε ασθενείς μετά από λοίμωξη με οξύ πυρετό Q [Hickie I. και άλλοι, 2006], με τις περισσότερες περιπτώσεις να εμφανίζονται στην Ευρώπη και την Αυστραλία. Λίγα άρθρα έχουν γραφτεί για το θέμα αυτό, και η μελλοντική έρευνα είναι απαραίτητη σε ασθενείς με σύνδρομο κόπωσης μετά από πυρετό Q.

Ο πυρετός Q είναι δυνατόν να υποτροπιάσει κατά τη διάρκεια της **κύησης** [Marmion BP., 1959], και μπορεί να προκαλέσει αποβολή σε ζώα εργαστήριου [Arricau-Bouvery N. και άλλοι, 2003] και στον άνθρωπο [Raoult D. και άλλοι, 2002]. Το βακτήριο έχει απομονωθεί από πλακούντες [Marmion BP., 1959] και αποβληθέντα έμβρυα [Raoult D. και άλλοι, 2002]. Σε μια μελέτη με 23 δημοσιευμένες περιπτώσεις πυρετού Q κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το 35% είχε πρόωρο τοκετό, και το 43% εμφάνισε αποβολή ή θάνατο του εμβρύου [Stein A. και Raoult D., 1998]. Μια άλλη μελέτη στον Καναδά, σε 4588 κύσεις, κατέγραψε ότι οροθετικές γυναίκες είχαν τρεις φορές περισσότερες πιθανότητες να έχουν τρέχον ή προηγούμενο εμβρυικό θάνατο [Langley JM. και άλλοι, 2003].

Τα περισσότερα από τα άρθρα που δημοσιεύθηκαν σχετικά με τον πυρετό Q στα **παιδιά** είναι case reports. Ο πυρετός Q πιστεύεται ότι είναι σπάνιος στα παιδιά, αλλά αυτό ίσως να συμβαίνει επειδή συχνά υποδιαγιγνώσκεται [Maltezuou HC. και Raoult D., 2002]. Η κλινική παρουσίαση του πυρετού Q στα παιδιά είναι παρόμοια με εκείνη σε ενήλικες, και κυρίως εμφανίζεται ως αυτοπεριοριζόμενη εμπύρετη νόσος, [Barralet JH. και Parker NR., 2004] αν και έχουν αναφερθεί θάνατοι [Maltezuou HC. και Raoult D., 2002]. Η χρόνια λοίμωξη μπορεί να εκδηλωθεί σαν οστεομυελίτιδα και ενδοκαρδίτιδα, [Maltezuou HC. και Raoult D., 2002; Barralet JH. και Parker NR., 2004; Nourse C. και άλλοι, 2004] και ο πυρετός μπορεί να είναι υποτροπιάζον [Richardus J. και άλλοι, 1985]. Όπως και στους ενήλικες, η ασυμπτωματική λοίμωξη είναι πολύ συχνή [Maltezuou HC. και Raoult D., 2002; Jorm LR. και άλλοι, 1990]. Η πρόληψη περιορίζεται σε αποφυγή δραστηριοτήτων που θέτουν τα παιδιά σε κίνδυνο

λοιμώξης, η οποία δεν είναι πάντοτε δυνατή για τα παιδιά που ζουν σε φάρμες [Barralet JH. και Parker NR., 2004].

Πρόσφατα υπάρχουν αρκετές δημοσιεύσεις που συνδέουν την *C. burnetii* με το σύνδρομο της χρόνιας κόπωσης, και υπάρχει ολοένα και αυξανόμενη αποδοχή της αιτιολογικής σύνδεσης μεταξύ του πυρετού Q και του συνδρόμου της χρόνιας κόπωσης, [Konacova E. και άλλοι, 2002; Madariaga MG. και άλλοι, 2003] αν και υπάρχουν αμφισβητήσεις [Wildman M. και άλλοι, 2002; Raoult D., 2002]. Το 1996, στο Lancet δημοσιεύτηκαν δύο περιστατικά που περιέγραφαν χρόνια κόπωση μετά από εκδήλωση οξέος πυρετού Q. Τα συμπτώματα περιγράφονταν σαν "κούραση, νυχτερινές εφιδρώσεις, πόνος στους μυς και τις αρθρώσεις, αλλαγές της διάθεσης, διακοπτόμενο μη αναζωογονητικό ύπνο, και η απώλεια του λίμπιντο" [Marmion BP. και άλλοι, 1996]. Στην Αγγλία και την Αυστραλία, περίπου το 10% των όσων νοσούν με οξύ πυρετό Q, εμφανίζουν κόπωση που διαρκεί περισσότερο από 6 μήνες [Wildman MJ. και άλλοι, 2002; Marmion BP. και άλλοι, 2005]. Μελετώντας μια εστία της νόσου στον Καναδά εξάγονται παρόμοια ευρήματα [Hatchette TF. και άλλοι, 2003]. Ο προτεινόμενος μηχανισμός, είναι η απορρύθμιση της κυτοκίνης που συνδέεται με τα εμμένοντα αντιγόνα του πυρετού Q [Marmion BP. και άλλοι, 1996; Penttila IA. και άλλοι, 1998], παρόλο που και εκείνοι που δεν εμφανίζουν χρόνια κόπωση μπορούν επίσης να παραμείνουν PCR-θετικοί για ορισμένα χρόνια [Marmion BP. και άλλοι, 2005].

4.5. Εργαστηριακή διάγνωση

Τα κλινικά σημεία και συμπτώματα, είναι μη ειδικά, έτσι που μόνο πολύ μικρή βοήθεια μπορεί να παρέχουν στη διάγνωση. Ένα ιστορικό έκθεσης σε βοοειδή, πρόβατα ή αίγες είναι χρήσιμο, αλλά η επαφή μπορεί να είναι έμμεση και μη αναγνωρίσιμη [Raoult D. και Margie T., 1995; McQuiston JH. και Childs JE., 2002; Marmion BP., 1959; Salmon M. και άλλοι, 1982]. Ο κλινικός ιατρός που υποψιάζεται τον πυρετό Q πρέπει να ελέγχει για ασθένειες των βαλβίδων της καρδιάς και του ανοσοποιητικού συστήματος, επειδή αυτές οι συνθήκες προδιαθέτουν στην ανάπτυξη της ενδοκαρδίτιδας [Fenollar F. και άλλοι, 2001].

Η διάγνωση του πυρετού Q βασίζεται κυρίως στον ορολογικό έλεγχο [Raoult D. και Margie T., 1995]. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IF) αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ορολογική διάγνωση [Fournier PE. και άλλοι, 1998; Field PR. και άλλοι, 2000] λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας που παρουσιάζει (Εικόνα XIV). Η δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT) αποτελεί επίσης δοκιμασία που χρησιμοποιείται σε εξετάσεις ρουτίνας [Field PR. και άλλοι, 2000]. Η δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT)

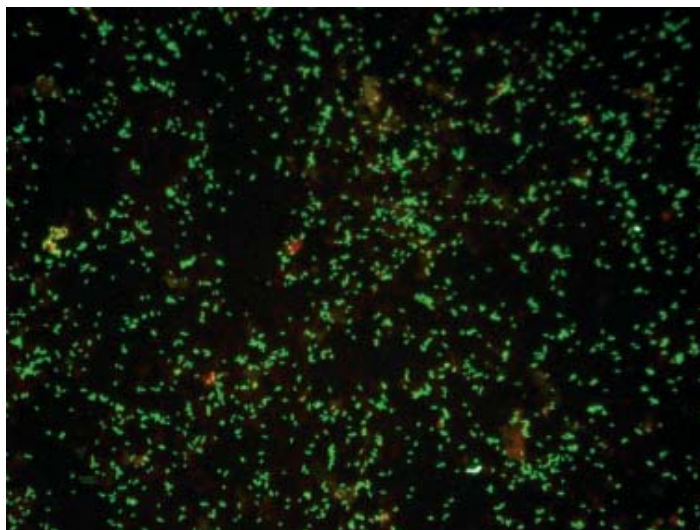
χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να θετικοποιηθεί και είναι λιγότερο ειδική και λιγότερο ευαίσθητη από τον ανοσοφθορισμό [Fournier PE. και άλλοι, 1998; Field PR. και άλλοι, 2000]. Η ELISA έχει προωθηθεί πρόσφατα, αλλά δεν είναι καλύτερη από τον ανοσοφθορισμό [Field PR. και άλλοι, 2000]. Εμφανίζονται ορολογικές διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλες λοιμώξεις [Kovacs E. και άλλοι, 2002] συμπεριλαμβανομένων της λεγιωνέλλωσης [Field PR. και άλλοι, 2002] και της λεπτοσπείρωσης [Field PR. και άλλοι, 2000]. Αξιολογήσιμοι τίτλοι αντισωμάτων μπορεί να πάρει 3-4 εβδομάδες για να εμφανιστούν [Raoult D. και Marrie T., 1995; Fournier PE. και άλλοι, 1998], έτσι η θεραπεία θα πρέπει να αρχίσει το συντομότερο επί υποψίας της νόσου. Μόνο 39% των ατόμων που νοσούν από πυρετό Q είναι θετικά στον έλεγχο του πρώτου δείγματος ορού [Fournier PE. και Raoult D., 2003]. Ασθενείς που είναι οροαρνητικοί κατά την οξεία φάση της νόσου, διστάζουν να επαναλάβουν τις εξετάσεις όταν πλέον αποκατασταθεί η υγεία τους, ιδιαίτερα στις αγροτικές περιοχές, όπου η διενέργεια της εξέτασης δεν είναι εύκολη [Mak DB. και άλλοι, 2003].

Για τον οξύ πυρετό Q, ένας τετραπλασιασμός των τίτλων σε ζεύγη ορών δίνει την υψηλότερη ειδικότητα, αλλά αρκετά αυξημένοι τίτλοι (IF) σε ένα μόνο ορό έχουν επίσης καλή ειδικότητα. Ο Raoult και οι συνεργάτες του έκριναν ότι, ένας IF IgM τίτλος 1:50 και ένας IF 1:200 IgG τίτλος να είναι 100% ειδικό στο δικό τους εργαστήριο [Fournier PE. και άλλοι, 1998]. Υπάρχει σημαντική διακύμανση των cut off τίτλων που χρησιμοποιούνται, η οποία μπορεί να εξηγηθεί από τις περιφερειακές διαφορές στη θετικότητα προηγούμενων περιπτώσεων [Fournier PE. και άλλοι, 1998].

Τα IgM αντισώματα συνήθως δεν είναι ανιχνεύσιμα μετά 4 μήνες [Fournier PE. και άλλοι, 1998], αλλά μπορεί να διαρκέσουν για 12 μήνες ή περισσότερο [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1994; Worswick DA. και Marmion BP., 1985]. Τα CF αντισώματα συνήθως πέφτουν μέσα σε 3 χρόνια [Murphy AM. και Field PR., 1970]. Σε μια επιδημία, σχεδόν το σύνολο των ατόμων που νόσησαν εξακολουθούσαν να έχουν αντισώματα IgG για τη φάση II, ανιχνεύσιμα με IF, 12 χρόνια μετά [Marmion BP. και άλλοι, 2005]. Σε ένα εμφανές παράδοξο, αντισώματα για τη φάση II είναι υψηλά σε οξεία νόσο και αντισώματα για τη φάση I αυξάνονται σε χρόνια νόσο [Fournier PE. και άλλοι, 1998].

Η διάγνωση της ενδοκαρδίτιδας από πυρετό Q, απαιτεί τόσο την κλινική εικόνα της ενδοκαρδίτιδας, όσο την απομόνωση ή την ορολογική ανίχνευση της *C. burnetii*. Ένα μόνο δείγμα ορού είναι αρκετό για τη διάγνωση, και έτσι δεν απαιτούνται ζεύγη ορών. Ένας τίτλος 800 ή μεγαλύτερος για IgG έναντι της φάσης I αποτελεί ένα από τα κύρια κριτήρια για τη διάγνωση του χρόνιου πυρετού Q [Baddour LM. και άλλοι, 2005] και θεωρούνται

διαγνωστικοί για ενδοκαρδίτιδα [Fournier PE. και άλλοι, 1998]. Οι τίτλοι των IgA είναι συνήθως ψηλοί, αν και οι τίτλοι IgA τίποτα δεν προσθέτουν στην διάγνωση [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1994]. Οι IgG τίτλοι για τη φάση II είναι οι ίδιοι ή χαμηλότεροι, και οι IgM τίτλοι μπορεί να απουσιάζουν [Fournier PE. και άλλοι, 1998].



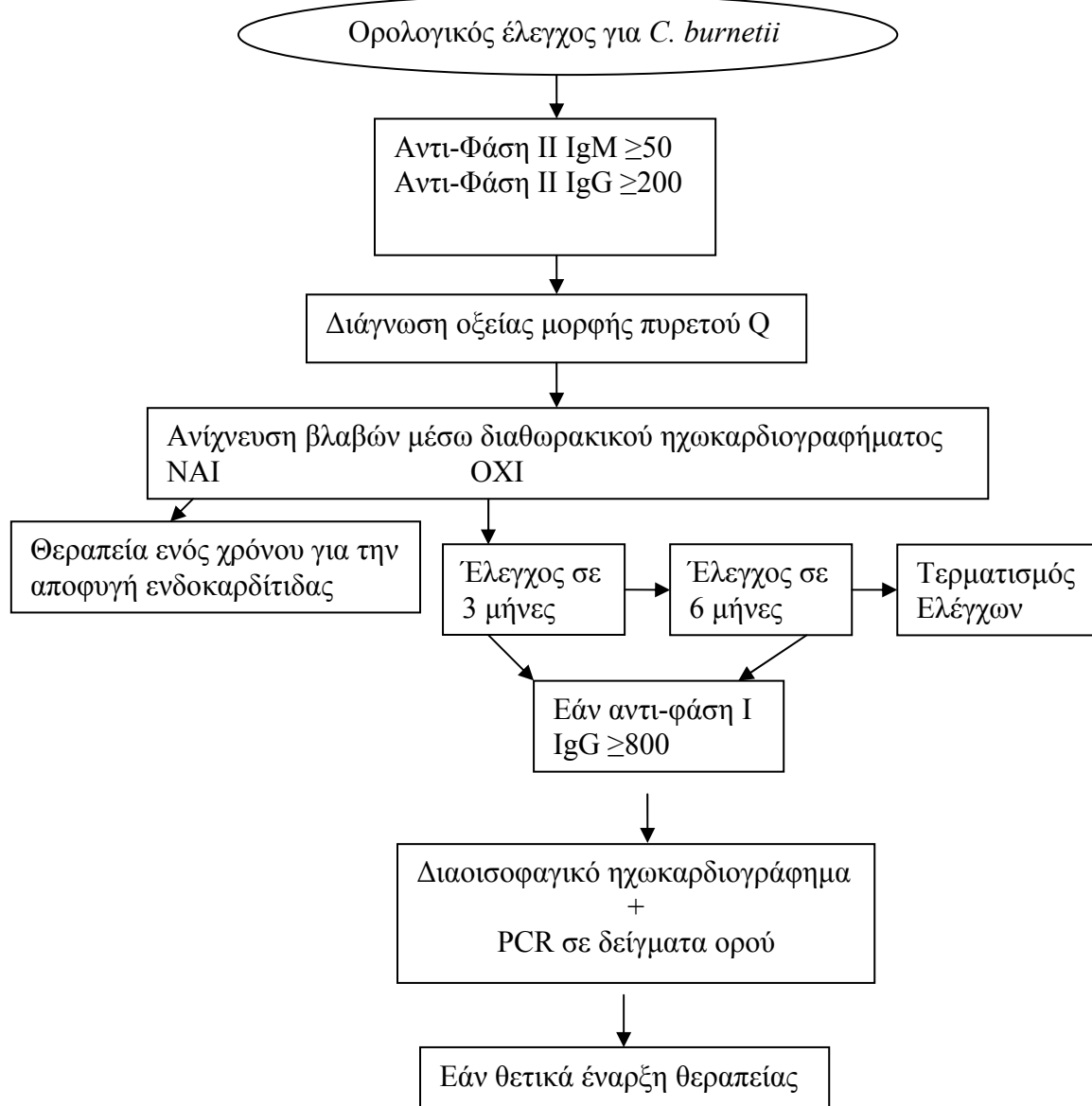
Εικόνα XIV: Θετική ορολογική αντίδραση με έμμεσο ανοσοφθορισμό (Parker NR. και άλλοι, 2006).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, είναι σε θέση στα πρώιμα στάδια της νόσου να εντοπίσει την παρουσία της *C. burnetii*, όμως είναι περιορισμένη σε εργαστήρια αναφοράς και ερευνητικές μελέτες [Parker NR. και άλλοι, 2006; Fournier PE. και Raoult D., 2003]. Η εισαγωγή της PCR στο πεδίο των διαγνωστικών εργαλείων, υπόσχεται την έγκαιρη διάγνωση, δεδομένου ότι θα πρέπει να είναι θετική πριν ακόμη τα αντισώματα να είναι ανιχνεύσιμα. Ωστόσο, η ευαισθησία της PCR στον ορό έχει απογοητευτικά αποτελέσματα. Από 100 ασθενείς με πυρετό Q, μόνο 18 ήταν PCR θετικοί [Fournier PE. και Raoult D., 2003]. Ο ορός περιέχει μερικούς ενδοκυτταρικούς οργανισμούς, και η χρήση δειγμάτων από τις λευκές στοιβάδες μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία της μεθόδου [Fournier PE. και Raoult D., 2003]. Η δοκιμή PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε δείγματα ιστών, όπως οι καρδιακές βαλβίδες, που έχουν μεγαλύτερους αριθμούς βακτηρίων [Lepidi H. και άλλοι, 2003].

Η *C. burnetii* φαίνεται σε επιχρίσματα ή παρασκευάσματα από κατεψυγμένους ιστούς όταν αυτά βαφτούν με χρώση Giemsa. Η παρουσία των κοκκιωμάτων τύπου «ντόνατ», δηλαδή ινωδών δακτυλίων σε ιστοπαθολογικά δείγματα είναι παραδοσιακά συνδεδεμένη με τον πυρετό Q, αλλά δεν είναι ειδική για την ασθένεια [Fournier PE. και άλλοι, 1998].

Η απομόνωση του μικροοργανισμού παρέχει την οριστική διάγνωση, όμως, η καλλιέργεια και απομόνωση του μικροοργανισμού είναι δύσκολη. Τα περισσότερα κλινικά εργαστήρια δεν κάνουν καλλιέργειες της *C. burnetii*, διότι κάτι τέτοιο είναι τεχνικά δύσκολο και απαιτεί εγκαταστάσεις βιοασφάλειας επίπεδου 3 λόγω της μεγάλης μολυσματικότητας του μικροοργανισμού και της ακραίας πιθανής χρήσης του ως όπλο βιοτρομοκρατίας [Fournier PE. και άλλοι, 1998]. Ως εκ τούτου, η απομόνωση της *C. burnetii* πρέπει να επιχειρείται μόνο σε εργαστήριο επιπέδου βιο-ασφάλειας 3, λόγω του μεγάλου βαθμού μολυσματικότητας της. Το βακτήριο μπορεί να απομονωθεί με τον ενοφθαλμισμό του δείγματος σε κυτταροκαλλιέργια (νεφρικά κύτταρα πιθήκου, Vero), σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας [Ormsbee RA., 1952], ή σε πειραματόζωα όπως ποντικούς και ινδικά χοιρίδια [Williams JC. και άλλοι, 1986]. Τα ινδικά χοιρίδια παρουσιάζουν πυρετό 5 – 8 ημέρες μετά τον ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό. Η σπλήνα θεωρείται το πιο κατάλληλο όργανο για την απομόνωση του βακτηρίου.

Η χρήση της τεχνικής (Shell-vial) αύξησε σημαντικά τις πιθανότητες για απομόνωση ενδοκυττάρων βακτηρίων και ειδικά της *C. burnetii* [Raoult D. και άλλοι, 1990]. Τα δείγματα ενοφθαλμίζονται σε κυτταρικές σειρές που έχουν καλλιεργηθεί σε υάλινες καλυπτρίδες ενός τετραγωνικού εκατοστού μέσα σε σωλήνα τύπου shell-vial. Η φυγοκέντριση μιας ώρας που ακολουθεί ενισχύει την προσκόλληση και διείσδυση του βακτηρίου στα κύτταρα. Έπειτα από επώαση έξι ημερών η ανίχνευση της *C. burnetii* στα κύτταρα επιτυγχάνεται με μικροσκοπική εξέταση έπειτα από χρωματισμό. Τα βακτήρια εμφανίζονται σαν μικροί βάκιλλοι εμφανείς μόνο έπειτα από χρώση Gimenez ή Giemsa και όχι με την χρώση Gram [Gimenez DF. 1964]. Η ταυτοποίηση της *C. burnetii* μέσα στα κύτταρα επιτυγχάνεται με τη χρήση άμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντι-*C burnetii* αντισώματα συζευγμένα σε φθορίζουσα χρωστική [Raoult D. και άλλοι, 1990].



Εικόνα XV: Στρατηγική διάγνωσης πυρετού Q. (Τροποποιημένο από Hartzell DJ. και άλλοι, 2008).

4.6. Θεραπεία

Παρά το γεγονός ότι αναγνωρίστηκε περισσότερο από 70 χρόνια πριν, η θεραπεία της *C. burnetii* εξακολουθεί να είναι δύσκολη, λόγω των ποικίλων κλινικών παρουσιάσεων της. Οι περισσότερες οξείες λοιμώξεις (60%) είναι υποκλινικές αλλά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται, όταν αναγνωρίζονται. Μειωμένη αποτελεσματικότητα της θεραπείας έχει αναφερθεί όταν η θεραπεία δεν ξεκινούσε εντός 3 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Ωστόσο, ταχεία βελτίωση έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία εντός της εβδομάδας από την έναρξη των συμπτωμάτων. Στον οξύ πυρετό “Q”, όπου η ασθένεια είναι συνήθως

αυτοπεριοριζόμενη, η θεραπεία στοχεύει στο να προκαλέσει μια βακτηριοστατική δράση η οποία θα περιορίσει τη διάρκεια της νόσου και θα εμποδίσει την μετάπτωση στη χρονιότητα. Η θεραπεία εκλογής αποτελεί την από του στόματος χορήγηση 100 mg doxycycline κάθε 12 ώρες για 14 μέρες [Parker NR. και άλλοι, 2006]. Η ερυθρομυκίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι αναποτελεσματική [Parker NR., Barralet JH. και άλλοι, 2006], αλλά in vitro [Maurin M. και Raoult D., 1993] και κλινική αξιολόγηση [Gikas A. και άλλοι, 2001] άλλων σκευασμάτων μακρολίδων (π.χ., κλαριθρομυκίνη, roxithromycin) δείχνουν να έχουν αποτελεσματικότητα. Η αποτελεσματικότητα των fluoroquinolones (FQs) έχει αποδειχθεί και in vitro και σε οξεία λοίμωξη, αλλά τα κλινικά δεδομένα είναι περιορισμένα [Yeaman MR. και άλλοι, 1987]. Λόγω της μεγαλύτερης ικανότητας τους να διεισδύουν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, οι FQs έχουν θεωρητικό πλεονέκτημα στην αντιμετώπιση των μηνιγγοεγκεφαλίτιδων [Bernit E. και άλλοι, 2002]. Ωστόσο, πρόσφατα, αναφέρονται 29 περιστατικά στα οποία η επιλογή της αντιμικροβιακής θεραπείας FQ vs doxycycline δεν επηρέασε τη πορεία της οξείας νόσου ή τη σοβαρότητα των νευρολογικών εκδηλώσεων [Bernit E. και άλλοι, 2002].

Στο χρόνια πυρετό “Q”, όπου η νόσος είναι βαριά και συχνά θανατηφόρος, η *Coxiella burnetii* επιβιώνει μετά την αρχική μόλυνση, και παρά την χρόνια χορήγηση αντιβιοτικών υποτροπιάζει προκαλώντας σοβαρότατες επιπλοκές. Η ενδοκαρδίτιδα είναι η πιο σοβαρή επιπλοκή, με τα ποσοστά θνητότητας να ξεπερνούν το 65%. Ασθενείς με υποκείμενες βαλβιδοπάθειες, οι οποίοι νοσούν από οξεία λοίμωξη πυρετού Q, αντιμετωπίζουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν ενδοκαρδίτιδα.

Η μονοθεραπεία σπάνια καταλήγει σε κλινική θεραπεία επειδή στερείται βακτηριοκτόνου δράσης. Η χορήγηση μόνο τετρακυκλίνης ή doxycycline, συνδέεται με μεγαλύτερη από 50% θνητότητα [Raoult D. και άλλοι, 1999]. Οι συστάσεις τόσο για τη θεραπεία όσο και την πρόληψη αυτής της επιπλοκής του οξέος πυρετού Q έχει αλλάξει σημαντικά κατά τα τελευταία χρόνια.

In vitro μελέτες, έχουν δείξει ότι, ο συνδυασμός της doxycycline και της υδροξυχλωροκίνης παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση [Maurin M. και άλλοι, 1992]. Αυτό το σχήμα, έδειξε να έχει μεγαλύτερη κλινική αποτελεσματικότητα από ένα πρότυπο εναλλακτικό συνδυασμό (τετρακυκλίνη + FQ). Αν και ένα 5% θνητότητας ήταν συνδεδεμένο και με τα δύο σχήματα, οι ασθενείς σε θεραπεία με doxycycline-υδροξυχλωροκίνη είχε μικρότερη διάρκεια θεραπείας (έως και 2,5 έτη) και λιγότερες υποτροπές [Raoult D. και άλλοι, 1999]. Ο συνδυασμός θα πρέπει να θεωρείται η τυπική θεραπεία για ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα από πυρετό Q. Η τρέχουσα σύσταση για τη θεραπεία της ενδοκαρδίτιδας από πυρετό Q, είναι η από του

στόματος χορήγηση doxycycline (100 mg δύο φορές ημερησίως), σε συνδιασμό με υδροξυχλωροκίνη (200 mg 3 φορές ημερησίως) [Parker NR. και άλλοι, 2006], για τουλάχιστον 18 μήνες. Ωστόσο, η θεραπεία μπορεί να χρειαστεί να παραταθεί. Για ασθενείς οι οποίοι δεν μπορούν να ανεχθούν την υδροξυχλωροκίνη, έχει προταθεί ένα εναλλακτικό σχήμα με doxycycline συν ένα FQ για τουλάχιστον 3 έως 4 χρόνια [Gami AS. και άλλοι, 2004; Levy PY. και άλλοι, 1991]. Doxycycline συν rifampin έχει επίσης, προταθεί ως εναλλακτική θεραπεία. Ωστόσο, αλληλεπιδράσεις των φαρμάκων μπορούν να περιορίζουν τη χρησιμότητα αυτού του συνδυασμού [Landais C. και άλλοι, 2007]. Η βέλτιστη διάρκεια της θεραπείας παραμένει άγνωστη. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας, οι τίτλοι των αντισωμάτων θα πρέπει να λαμβάνονται κάθε 3 μήνες [Raoult D. και άλλοι, 1999; Gami AS. και άλλοι, 2004; Parker NR. και άλλοι, 2006]. Όταν η θεραπεία διακόπτεται, οι τίτλοι θα πρέπει να λαμβάνονται κάθε 3 μήνες για παρακολούθηση ενδεχόμενου τετραπλασιασμού, ενδεικτικού της υποτροπής. Αν παρατηρείται βαλβιδοπάθεια, συνιστάται 12μηνη θεραπεία με doxycycline σε συνδιασμό με υδροξυχλωροκίνη [Fenollar F. και άλλοι, 2001; Fenollar F. και άλλοι, 2006; Landais C. και άλλοι, 2007]. Η θεραπεία για τις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει να εξατομικεύεται και να λαμβάνει υπόψη την πραγματική χειρουργική επέμβαση που εκτελείται.

4.7. Πρόληψη

Έχουν αναπτυχθεί εμβόλια βασιζόμενα στα αντιγόνα τόσο της φάσης I όσο και της φάσης II. Αν και ο εμβολιασμός ενδείκνυται για το προσωπικό των εργαστηρίων, τους εργάτες στα σφαγεία και στα γαλακτοκομικά προϊόντα και γενικά για όλες τις ομάδες πληθυσμού που βρίσκονται σε κίνδυνο από την συχνή επαφή με ζώα ή τα προϊόντα τους, δεν υπάρχει ακόμη εμπορικά διαθέσιμο εμβόλιο στην Ευρώπη.

Η πρώτη περίπτωση πυρετού Q που αναγνωρίστηκε στις ΗΠΑ αφορούσε ενδοεργαστηριακή λοίμωξη [McDade JE., 1990], έτσι σύντομα παρήχθησαν εμβόλια για προστασία του εργαστηριακού προσωπικού. Αυτά ήταν αποτελεσματικά, αλλά εμφάνιζαν μεγάλες τοπικές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων αποστημάτων με δημιουργία συριγγίων [Ormsbee RA. και Marmion BP, 1990]. Ζωντανά [Mossienko EV. και άλλοι, 2003], whole-cell και acellular εμβόλια, έχουν επίσης αναπτυχθεί. Ένα whole-cell εμβόλιο έχει αδειοδοτηθεί στην Αυστραλία (Q-Vax) [Kermode M. και άλλοι, 2003]. Acellular εμβόλια που περιλαμβάνουν ένα εμβόλιο που παράγεται με εκχύλιση με τριχλωροξικό οξύ (TCA) (Chemovaccine) από την πρόην Τσεχοσλοβακία [Camacho MT. και άλλοι, 2000], και ένα μετά από κατεργασία με

χλωροφόρμιο-μεθανόλη (CMR) εμβόλιο από τις ΗΠΑ [Waag DM. και άλλοι, 2002]. Το Αυστραλιανό whole-cell εμβόλιο αδειοδοτήθηκε το 1989 [Marmion BP. και άλλοι, 1990]. Το εμβόλιο παρέχεται μόνον αν δεν υπάρχει ιστορικό ασθένειας πυρετού Q ή εμβολιασμού, καθώς και ύστερα από αρνητικά αποτελέσματα στην ορολογική εξέταση και στην ενδοδερμική δοκιμή [Kermode M. και άλλοι, 2003]. Σε μη ανοσοποιημένους αποδέκτες, οι παρενέργειες είναι ισοδύναμες με αυτές που συνήθως παρατηρούνται μετά από χορήγηση άλλων εμβολίων [Marmion BP. και άλλοι, 1990]. Περιστασιακά μεγάλες τοπικές αντιδράσεις έχουν αναφερθεί [Marmion BP. και άλλοι, 1990; Lawrence G. και άλλοι, 2003], πιθανώς σε άτομα με προηγούμενη ανοσία η οποία διέφυγε του screening ελέγχου. Τα acellular (CMR και TCA) εμβόλια έχουν προωθηθεί ως εξίσου αποτελεσματικά με το whole-cell εμβόλιο, αλλά με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες [Camacho MT. και άλλοι, 2000; Waag DM. και άλλοι, 1997]. Ωστόσο, λίγα στοιχεία από μελέτες σε ανθρώπους είναι διαθέσιμα [Camacho MT. και άλλοι, 2000; Fries LF. και άλλοι, 1993].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα εργασία, αποσκοπούσε σε μια ολοκληρωμένη διερεύνηση και μελέτη των ειδών των κροτώνων που ενδημούν στην Κύπρο και παρασιτούν σε ζώα (παραγωγικά ζώα, άγρια ζώα, μεταναστευτικά πτηνά), και ο προσδιορισμός του ρόλου τους στη μετάδοση και διασπορά 3 ομάδων παθογόνων παραγόντων. Η μελέτη περιλάμβανε, οικογεωγραφική εντομολογική και εργαστηριακή μελέτη, καθώς και οροεπιδημιολογική διερεύνηση σε ζώα πιθανούς φυσικούς ξενιστές για το *A. phagocytophilum*, τη *Rickettsia conorii* και την *Coxiella burnetii* καθώς επίσης και έλεγχο σε δείγμα ανθρώπινου υγιούς πληθυσμού

Περιελάμβανε επίσης την αναζήτηση και γονοτυπική ανίχνευση των *Anaplasma sp.*, των *Rickettsia sp.* και της *Coxiella burnetii* σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές.

Απώτερος στόχος της μελέτης, ήταν να προσδιοριστούν ενδημικές περιοχές ή περιοχές με υψηλό βαθμό έκθεσης στα αναπλάσματα, στις ρικέτσιες και στην *Coxiella burnetii*. [περιοχές «υψηλού κινδύνου» (high-risk regions)].

Η απόκτηση της απαραίτητης γνώσης για τον προσδιορισμό του είδους των κροτώνων και των παθογόνων που μεταφέρουν, θα αποτελέσει βοήθημα στη λήψη μέτρων σε περιοχές υψηλού κινδύνου, με σκοπό τον περιορισμό της εξάπλωσης των κροτώνων και τον περιορισμό της διασποράς των παθογόνων παραγόντων που μεταφέρουν στα άγρια και παραγωγικά ζώα και στον άνθρωπο, καθώς και την παροχή της απαραίτητης πληροφόρησης στους κλινικούς ιατρούς με απώτερο στόχο, την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση των μελετώμενων ζωνόσων.

Αναλυτικότερα η παρούσα μελέτη στόχευε στα ακόλουθα:

A) Συλλογή κροτώνων από ζώα, με στόχο τον προσδιορισμό των ειδών που ενδημούν στην Κύπρο, τον προσδιορισμό του βαθμού διασποράς τους και εκτίμηση του βαθμού παρασιτισμού (infestation rate) ανά είδος ζώου

B) Γονοτυπική ανίχνευση στους κρότωνα, 3 ομάδων παθογόνων βακτηρίων (ρικετσιών, ερλιχιών-αναπλασμάτων, *Coxiella burnetii*.) που είναι αιτιολογικοί παράγοντες για 3 ζωνόσους (ρικετσιώσεις, αναπλάσμωση και πυρετός Q), και προσδιορισμός του βαθμού μόλυνσης (infection rate) των κροτώνων με τα παραπάνω παθογόνα. Εκτίμηση του ρόλου αυτών των ειδών των κροτώνων στη μετάδοση των παραπάνω παθογόνων στην Κύπρο σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές, με στόχο τον προσδιορισμό του βαθμού διασποράς των αναπλασμάτων, των ρικετσιών και της *Coxiella burnetii* στους φυσικούς ξενιστές και τη μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας μετάδοσης.

Γ) Προσδιορισμός των ειδών και του βαθμού διασποράς των κροτώνων που έχουν την ικανότητα να λειτουργούν σαν μεταβιβαστές των παραπάνω παθογόνων, καθώς και ειδών που λειτουργούν σαν «γέφυρες» (“bridge vectors”) ανάμεσα στα διάφορα είδη ζώων.

Δ) Προσδιορισμός του οροεπιπολασμού των αντισωμάτων έναντι των παθογόνων σε αντιπροσωπευτικό δείγμα ζώων και χαρακτηρισμός περιοχών με υψηλή οροθετικότητα. Ο ορολογικός έλεγχος έγινε σε τυχαίο αντιπροσωπευτικό δείγμα ορών από παραγωγικά ζώα (αιγοπρόβατα και βοοειδή), που προσδιορίστηκε με stratified random sampling method.

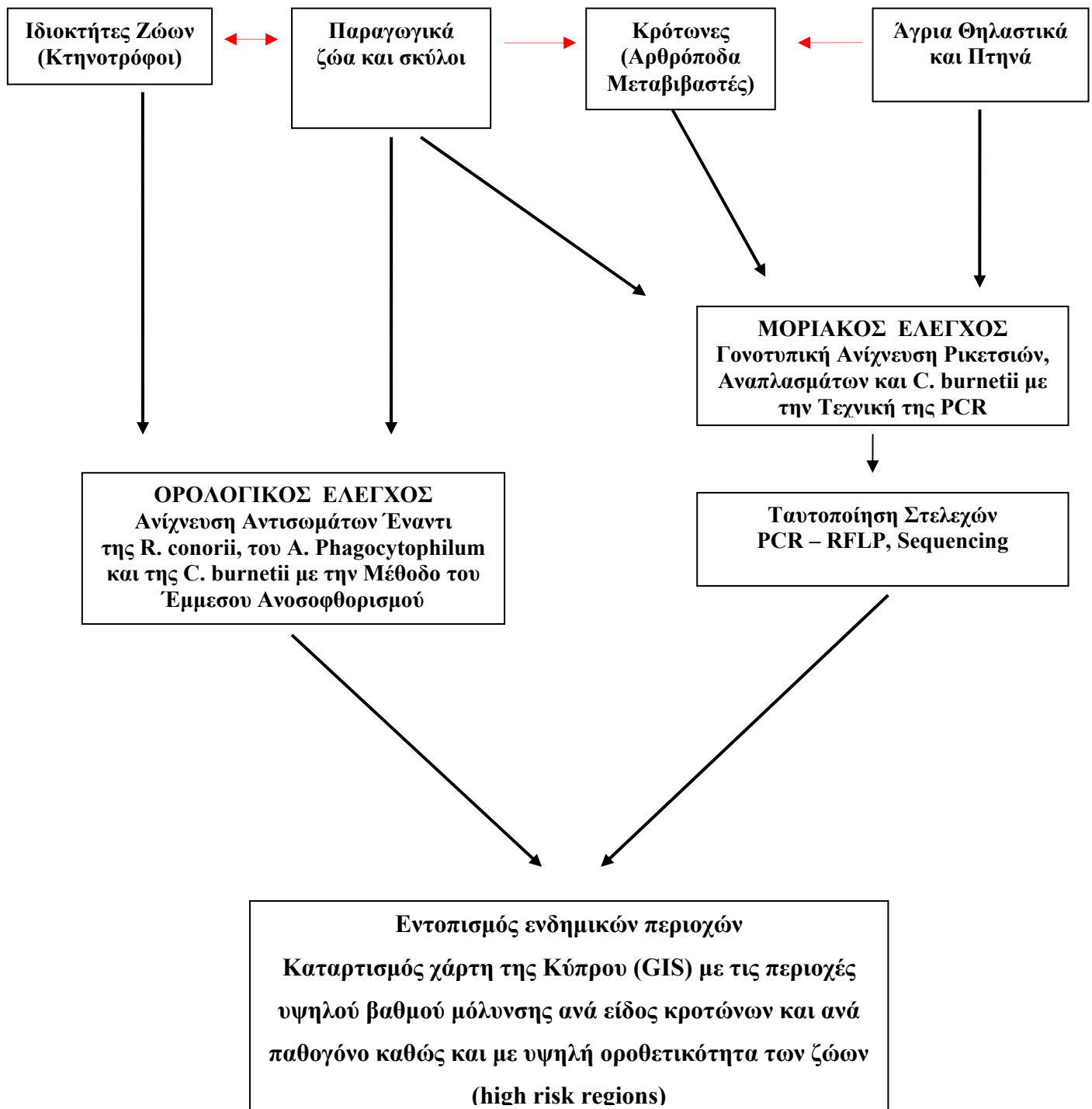
Ε) Προσδιορισμός του οροεπιπολασμού των αντισωμάτων έναντι των παθογόνων, σε δείγμα ομάδας υψηλού κινδύνου ανθρώπινου πληθυσμού (κτηνοτρόφους).

ΣΤ) Εντοπισμός ενδημικών περιοχών.

Ζ) Καταρτισμός χάρτη της Κύπρου (GIS) με τις περιοχές υψηλού βαθμού μόλυνσης ανά είδος κροτώνων και ανά παθογόνο καθώς και με υψηλή οροθετικότητα των ζώων (high risk regions)

Η στρατηγική που ακολουθήθηκε ήταν η παρακάτω: προσδιορίστηκε ο οροεπιπολασμός των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum*, των ρικετσιών και της *Coxiella burnetti* σε αντιπροσωπευτικό τυχαίο δείγμα παραγωγικών ζώων που συλλέχθηκε από εκτροφές σε όλη την Κύπρο. Εκτιμήθηκε επίσης, ο επιπολασμός των παραπάνω παθογόνων σε καθορισμένο δείγμα υγιούς ανθρώπινου πληθυσμού. Η ομάδα υγιούς πληθυσμού προσδιορίστηκε ως εξής: οι συμμετέχοντες ήταν οι ιδιοκτήτες και οι οικογένειές τους καθώς και οι εργαζόμενοι στις εκτροφές από τις οποίες ελέγχθηκαν ζώα, είτε είχαν κάποιας μορφής επαφή με παραγωγικά ζώα και άλλα ζώα ή/και κρότωνες, ψείρες ή είχε σχέση με αγροτοκτηνοτροφικές εργασίες. Ταυτόχρονα, αναζητήθηκαν τόσο το *A. phagocytophilum* αλλά και άλλα είδη αναπλασμάτων (*Anaplasma sp.*), ρικετσιες και η *Coxiella burnetti* σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές. Έγινε γονοτυπική ανίχνευση των πιο πάνω παθογόνων και προσδιορίστηκε ο βαθμός διασποράς τους στους φυσικούς ξενιστές. Το αποτέλεσμα της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της διασποράς και της γεωγραφικής κατανομής *A. phagocytophilum* αλλά και *Anaplasma sp.*, των ρικετσιών και της *Coxiella burnetti* και προσδιορίστηκαν περιοχές υψηλού κινδύνου (high-risk regions).

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την αποπεράτωση των στόχων της παρούσας μελέτης απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα I: Σχηματική παράσταση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γεωγραφικός χώρος - Κύπρος



Χάρτης Ι: Χάρτης της Κύπρου [Γραφείο Τύπου και Πληροφοριών Κύπρου].

Η Κύπρος βρίσκεται στο σταυροδρόμι τριών Ηπείρων, της Ευρώπης, της Ασίας και της Αφρικής. Τοποθετείται στη βορειοανατολική γωνία της Μεσογείου, 75 Km νότια της Τουρκίας, 380 Km βόρεια της Αιγύπτου, 105 Km δυτικά της Συρίας, 380 Km ανατολικά του νησιού της Ρόδου και 800 Km ανατολικά από την ηπειρωτική Ελλάδα (Χάρτης II).

Το γεγονός αυτό προσδίδει στο νησί όχι μόνο τεράστια γεωπολιτικοστρατιγική σημασία, αλλά και σημαντικότατο ρόλο στην επιδημιολογία πολλών ζωοανθρωπονόσων.

Είναι το τρίτο σε έκταση νησί της Μεσογείου, μετά τη Σικελία και τη Σαρδηνία καλύπτοντας μian έκταση 9,251 τετραγωνικών χιλιομέτρων. Η επιφάνεια του νησιού καλύπτεται από δύο οροσειρές, ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλεται η πεδιάδα της Μεσαορίας. Η μεγαλύτερη οροσειρά, αυτή του Τροόδους αρχίζει σχεδόν από το κέντρο του νησιού και επεκτείνεται βόρεια και νότια μέχρι τα δυτικά παράλια. Η υψηλότερη κορυφή της οροσειράς αυτής, ο Όλυμπος έχει υψόμετρο 1951 μέτρα. Η δεύτερη οροσειρά, αυτή του Πενταδακτύλου εκτείνεται κατά μήκος των βόρειων ακτών και έχει μέγιστο υψόμετρο τα 1024 μέτρα.

Ολόκληρο σχεδόν το νησί περιβάλλεται από παράκτιες κοιλάδες, και το 46,8% του εδάφους είναι καλλιεργήσιμο κυρίως για μονοετείς καλλιέργειες. Τα ποτάμια είναι εποχιακά (χειμναροί) και ρέουν μόνον κατόπιν βαριών βροχοπτώσεων.

Κλιματολογικά η Κύπρος αποτελεί το θερμότερο νησί της Μεσογείου. Χαρακτηριστικά του μεσογειακού της κλίματος είναι το ζεστό και ξηρό καλοκαίρι από τα μέσα του Μάη έως τα μέσα του Σεπτέμβρη και ο βροχερός αλλά ήπιος χειμώνας, από τα μέσα του Νιόβρη έως τα μέσα του Μάρτη. Στις τελευταίες δεκαετίες του 20ου αιώνα η βροχόπτωση στην Κύπρο παρουσιάζει πτωτική τάση, ενώ η θερμοκρασία παρουσιάζει ανοδική τάση. Η μέση βροχόπτωση πάνω από ολόκληρο το νησί για το χρόνο συνολικά, είναι 460 χιλιοστόμετρα. Η υψηλότερη βροχόπτωση αφορά τις ορεινές περιοχές (1100 χιλιοστόμετρα στην κορυφή του Ολύμπου) και η χαμηλότερη στις πεδιάδες (300-350 χιλιοστόμετρα).

Τον Ιούλιο και τον Αύγουστο οι μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες κυμαίνονται από 29 βαθμούς Κελσίου στην κεντρική πεδιάδα και 22 βαθμούς Κελσίου στην κορυφή του Τροόδους, ενώ οι μέσες μέγιστες θερμοκρασίες τους μήνες αυτούς είναι 36 και 27 βαθμοί αντίστοιχα.

Τον Ιανουάριο οι μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες είναι 10 βαθμοί Κελσίου στην κεντρική πεδιάδα και 3 βαθμοί Κελσίου στην κορυφή του Τροόδους, με μέσες ελαχιστες τους 5 και 0 βαθμούς αντίστοιχα. [Γραφείο Τύπου και Πληροφοριών Κύπρου, 2006]



Χάρτης II: Γεωπολιτικός χάρτης της Ανατολικής Μεσογείου.

2.2. Ανθρώπινος πληθυσμός

Ο πληθυσμός της Κύπρου στο τέλος του 2004, σύμφωνα με στοιχεία της Στατιστικής Υπηρεσίας, ήταν περίπου 651,100 και το μεγαλύτερο μέρος του είναι συγκεντρωμένο στα μεγάλα αστικά κέντρα, ήτοι στις 4 μεγάλες πόλεις. Στην πρώτη θέση βρίσκεται η πρωτεύουσα Λευκωσία με πληθυσμό περίπου 219,200. Δεύτερη ακολουθεί η Λεμεσός, με πληθυσμό περίπου 172,200 και έπεται η Λάρνακα με πληθυσμό περίπου 77,00. Τέλος η Πάφος κατέχει την τέταρτη θέση με πληθυσμό γύρω στις 51.300. Επιπλέον των μόνιμων Ελληνοκυπρίων κατοίκων, στο νησί κατοικούν περίπου και 98-100,00 ξένοι υπήκοοι.

Τέλος, καλό θα ήταν να αναφερθεί ότι το 2004 η Κύπρος είχε 2,35 εκατομμύρια τουριστικές αφίξεις.

Σημ. Τα στοιχεία αφορούν τις ελεύθερες περιοχές του νησιού.

2.3. Ζώα τα οποία μελετήθηκαν

2.3.1. Αίγες

Ταξινόμηση

Κλάση: Mammalia (Θηλαστικά)

Τάξη: Artiodactyla (Αρτιοδάκτυλα)

Οικογένεια: Bovidae (Βοοειδή)

Υποοικογένεια: Caprinae (Καπρίνοι)

Είδος: *Capra hircus*



2.3.2. Πρόβατα

Ταξινόμηση

Κλάση: Mammalia (Θηλαστικά)

Τάξη: Artiodactyla (Αρτιοδάκτυλα)

Οικογένεια: Bovidae (Βοοειδή)

Υποοικογένεια: Caprinae (Καπρίνοι)

Είδος: *Ovis ammon aries*



2.3.3. Αγελάδες

Ταξινόμηση

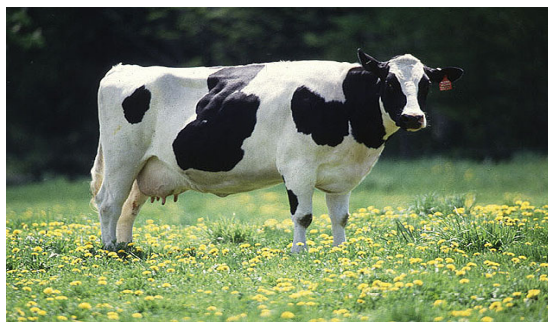
Κλάση: Mammalia (Θηλαστικά)

Τάξη: Artiodactyla (Αρτιοδάκτυλα)

Οικογένεια: Bovidae (Βοοειδή)

Υποοικογένεια: Bovinae

Είδος: *Bos taurus europaeus*



Ο συνολικός αριθμός των αιγοπροβάτων στην Κύπρο σύμφωνα με τα επίσημα δεδομένα από το μητρώο των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών για το έτος 2004 ήταν, 465,767 ζώα κατανεμημένα σε 4,325 εκτροφές.

Αναλυτικά ο πληθυσμός αυτός ακολουθούσε την εξής διασπορά στις πέντε επαρχίες

Επαρχία Λευκωσίας: 89,683 ζώα σε 837 εκμεταλεύσεις,

Επαρχία Λεμεσού: 92,921 ζώα σε 1,091 εκμεταλεύσεις,

Επαρχία Λάρνακας: 116,870 ζώα σε 849 εκμεταλεύσεις,

Επαρχία Αμμοχώστου: 61,129 ζώα σε 618 εκμεταλεύσεις,

Επαρχία Πάφου: 105,164 ζώα σε 930 εκμεταλεύσεις.

Στις αίγες επικρατεί η φυλή Δαμασκού και ακολουθούν διασταυρώσεις αυτής με την εγχώρια κυπριακή φυλή Μαχαιρά, καθαρόαιμα ζώα της οποίας έχουν απομείνει ελάχιστα. Τα τελευταία χρόνια έχουν εισαχθεί από την Ευρώπη και εκτρέφονται μικροί αριθμοί αιγών των φυλών Zaanen και Alpin.

Όσον αφορά τα πρόβατα, επικρατέστερη είναι η φυλή Χίου και οι διασταυρώσεις αυτής με ζώα τύπου Φροισλανδίας ή ακόμη και με ζώα της εγχώριας φυλής (Κυπριακό παχύουρο πρόβατο) αλλά και με ζώα της φυλής Awassi. Καθαρόαιμα ζώα των τριών τελευταίων φυλών, τείνουν να εκλείψουν.

Επιπλέον ο πληθυσμός των βοοειδών για την ίδια περίοδο ήταν 60,639 ζώα κατανεμημένα σε 371 εκτροφές, ακολουθώντας την εξής διασπορά

Επαρχία Λευκωσίας: 21,694 ζώα σε 118 εκμεταλεύσεις,

Επαρχία Λεμεσού: 4,011 ζώα σε 41 εκμεταλεύσεις,

Επαρχία Λάρνακας: 24,033 ζώα σε 103 εκμεταλεύσεις,

Επαρχία Αμμοχώστου: 9,982 ζώα σε 59 εκμεταλεύσεις,

Επαρχία Πάφου: 919 ζώα σε 50 εκμεταλεύσεις,

Στην απόλυτη πλειοψηφία τους τα βοοειδή της Κύπρου ανήκουν στη γαλακτοφόρα φυλή αγελάδων, Holstein Fresian. Ένας μόνο πολύ μικρός αριθμός ζώων ανήκει στην εγχώρια κυπριακή φυλή και είναι διάσπαρτος σε πολύ μικρές εκτροφές ιδιαίτερα στην επαρχία Πάφου.

2.3.4. Σκύλοι

Ταξινόμηση

Βασίλειο : Animalia (Ζώα)

Κλάση : Mammalia (Θηλαστικά)

Τάξη : Carnivora (Σαρκοφάγα)

Οικογένεια : Canidae (Κανίδες ή Κυνίδες)

Γένος : Canis

Είδος : Canis lupus

Υποείδος : *Canis lupus familiaris* (Σκύλος ο κατοικίδιος)



Ο αριθμός των σκύλων στην Κύπρο σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών αριθμεί περίπου 24,000 ζώα.

Παρόλα ταύτα και παρά το γεγονός ότι με βάση νομοθεσία είναι υποχρεωτική η σήμανση και η καταγραφή τους στο επίσημο μητρώο των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, οι περισσότεροι παραμένουν μέχρι σήμερα αδήλωτοι έτσι με διασταύρωση πληροφοριών υπολογίζεται ο αριθμός τους να κυμαίνεται γύρω στις 500,000.

Οι μεγαλύτεροι αριθμοί αντιπροσωπεύουν κυνηγετικούς σκύλους και ακολουθούν διάφορες φυλές ποιμενικών αλλά και διασταυρώσεις αυτών.

Τα τελευταία χρόνια και με τη ραγδαία άνοδο του βιοτικού επιπέδου αυξήθηκαν σημαντικά και οι αριθμοί των σκύλων συντροφιάς καθιστώντας το σκύλο ως το δημοφιλέστερο είδος «pet».

Τέλος, ένα σημαντικό μέρος στον πληθυσμό των σκύλων αποτελούν και οι αδέσποτοι σκύλοι οι οποίοι ζουν και κινούνται κατά μήκος της νεκρής ζώνης, γύρω από σκουπιδότοπους, κοντά σε κτηνοτροφικές περιοχές, αλλά και στα μεγάλα αστικά κέντρα. Τα ζώα αυτά ιδιαίτερα, φιλοξενούν συνήθως ένα μεγάλο αριθμό εκτοπαρασίτων και αποτελούν σημαντικότερο κρίκο στην αλυσίδα μετάδοσης πολλών ζωνοσόων.

Σύμφωνα με αναφορές ιδιωτών κτηνιάτρων αρκετά ζώα προσβάλλονται από Ερλίχιες σε όλες τις Επαρχίες του νησιού, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης περιστατικών στις Επαρχίες Πάφου και Λεμεσού.

2.3.5. Αγρινά

Ταξινόμηση

Κλάση: Mammalia (Θηλαστικά)

Τάξη: Artiodactyla

(Αρτιοδάκτυλα)

Οικογένεια: Bovidae (Βοοειδή)

Υποοικογένεια: Caprinae

(Καπρίναι)

Είδος: *Ovis orientalis ophion*



Το κυπριακό αγρινό είναι ενδημικό υποείδος άγριου προβάτου και είναι το μεγαλύτερο άγριο, χερσαίο θηλαστικό της Κύπρου. Είναι ασιατικής προέλευσης και όπως αποκάλυψε η αρχαιολογική σκαπάνη βρίσκεται στο νησί για τουλάχιστον 8000-10000 χρόνια. Είναι το μικρότερο είδος άγριου προβάτου στον κόσμο και το αρσενικό φέρει μεγάλα δρεπανοειδή κέρατα που γυρίζουν προς τα πίσω, ενώ το θηλυκό στερείται κεράτων.

Τα αγρινά κατοικούν στη περιοχή του δάσους Πάφου, σε μια έκταση 620.000 εκταρίων, που βρίσκεται στο βορειοδυτικό μέρος της οροσειράς του Τροόδου. Ο αριθμός των αγρινών στην Κύπρο, σύμφωνα με τις τελευταίες εκτιμήσεις, ανέρχεται σήμερα στις 3000 ζώα περίπου. Οι υψηλότερες πυκνότητες των αγρινών εμφανίζονται περιμετρικά του δάσους, όπου η βλάστηση είναι ανοικτότερη και ποικίλη και τα λιβάδια είναι πίο εκτενή. Σε μερικά μέρη της δασικής περιφέρειας, η βοσκή αιγών και προβάτων είναι εντατική, ειδικά στα βόρεια σημεία του δάσους όπου τα κατοικίδια ζώα και τα αγρινά μοιράζονται τα ίδια λιβάδια. Η κατάσταση της υγείας των αγρινών ελέγχεται με τη στενή συνεργασία με τις κτηνιατρικές υπηρεσίες με τη μεταφορά όλων των νεκρών και άρρωστων ζώων για εξετάσεις και με τη λήψη δειγμάτων αίματος από ζωντανά-παγιδευμένα ζώα. Τα αγρινά απειλούνται από πιθανή μετάδοση ασθενειών από παραγωγικά ζώα με τα οποία μοιράζονται τα ίδια λιβάδια, και τα οποία μπορεί να είναι φορείς παθογόνων, όπως τα αναπλάσματα, οι ρικέτσιες, η *Coxiella burnetii* κ.α. Τα παραγωγικά ζώα μπορεί να έχουν προσαρμοστεί στην ύπαρξη των

παθογόνων αυτών, ή μπορεί τα στελέχη που κυκλοφορούν ανάμεσα τους να μην είναι μολυσματικά για τα ζώα αυτά, κάτι το οποίο μπορεί να μη συμβαίνει με τα αγρινά.

2.3.6. Αλεπού

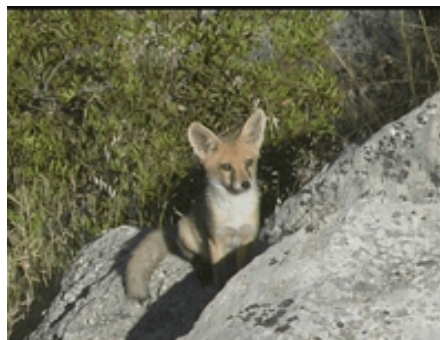
Ταξινόμηση

Κλάση: Mammalia (Θηλαστικά)

Τάξη: Carnivora (Σαρκοφάγα)

Οικογένεια: Canidae (Κανίδες)

Είδος: *Vulpes vulpes indutus*



Είναι το μόνο άγριο αρπακτικό θηλαστικό στην Κύπρο και είναι συγγενικό είδος με τον σκύλο.

Η αλεπού είναι ενδημικό είδος και τη συναντούμε σε όλο το νησί, σε διάφορα υψόμετρα. Προσαρμόζεται εύκολα σε διάφορες συνθήκες και συχνάζει σχεδόν παντού. Προτιμά περιοχές με ποικιλία βιοτόπων (π.χ. ανοιχτά λιβάδια κοντά σε δασώδεις περιοχές, πυκνούς θάμνους, βοσκές, μικρούς υγροτόπους). Απαντά επίσης κοντά σε αγροτικές, κτηνοτροφικές και κατοικημένες περιοχές. Τόσο στην Κύπρο όσο κι σε άλλες χώρες, θεωρήθηκε επιβλαβές είδος και πολεμήθηκε έντονα. Πολλές επιστημονικές μελέτες καταδεικνύουν ότι έχει πολύ μικρή επίδραση στους πληθυσμούς των θηρεύσιμων ζώων και την πτηνοτροφία, ενώ είναι ωφέλιμο είδος για τη γεωργία αφού συμβάλλει στη μείωση των πληθυσμών των επιβλαβών τρωκτικών και των ακρίδων. Τα τελευταία χρόνια, και λόγω του ότι έχει ενταχθεί στα προστατευόμενα είδη, ο αριθμός τους έχει αυξηθεί υπερβολικά και υπάρχουν υπόνοιες ότι προκαλεί μείωση στους αριθμούς των θηραμάτων, αφού αποτελεί την κορυφή της διατροφικής πυραμίδας.

2.3.7. Λαγός

Ταξινόμηση

Κλάση: Mammalia (Θηλαστικά)

Τάξη: Lagomorpha

Οικογένεια: Leporidae

Είδος: *Lepus europaeus*



Ο λαγός είναι θηλαστικό μεσαίου μεγέθους (μήκος 50 – 60 εκ. και βάρος 3 – 4 kg). Παρουσιάζει έντονες διαφορές στο μέγεθος και το χρώμα του ανάλογα με την περιοχή εξάπλωσής του. Απαντά σε όλη την Ευρώπη, τη Μ. Ασία, την Αραβία, τη Β. Αφρική, ενώ έχει απελευθερωθεί στη Β. Αμερική, την Αυστραλία και τη Ν. Ζηλανδία. Απαντά σε όλη την Κύπρο, από τις παράλιες περιοχές μέχρι και την κορυφή του Ολύμπου παρόλο που οι περισσότεροι λαγοί ζουν σε θαμνώδεις, ημιορεινές περιοχές κοντά σε καλλιέργειες ή αραιά δάση κοντά σε γεωργικές εκτάσεις. Ζει όλη τη ζωή του σε μια περιοχή περίπου ενός τετραγωνικού χιλιομέτρου.

2.3.8. Επιδημικά – Αποδημικά πτηνά

Η Κύπρος λόγω της γεωγραφικής της θέσης αποτελεί μια σημαντική ενδιάμεση στάση μετανάστευσης στην ανατολική Μεσόγειο. Οι ευνοϊκές καιρικές συνθήκες (ήρεμοι άνεμοι, ελαφριά σύννεφα, καλή διαφάνεια) κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης το φθινόπωρο και την άνοιξη, καθώς και οι ήπιοι και υγροί χειμώνες κάνουν την Κύπρο ένα ελκυστικό μέρος για σταθμό και πολλές φορές διαχείμαση των μεταναστευτικών πουλιών. Τριακόσια εξήντα οκτώ (368) είδη έχουν καταγραφεί. Το γεγονός ότι το νησί βρίσκεται σε μια από τις σημαντικότερες διαδρομές μετανάστευσης πουλιών στη Μεσόγειο, οδηγεί περισσότερα από 200 αποδημικά είδη σε μεταβάσεις τακτικής εμφάνισης. Οι χειμερινοί επισκέπτες αριθμούν 62 είδη, ενώ συνήθως 25 είδη έρχονται ως επισκέπτες για αναπαραγωγή και φωλιάζουν τακτικά προστιθέμενοι στα ήδη 53 είδη-μόνιμους κατοίκους κατά τους θερινούς μήνες.

Μια συντηρητική εκτίμηση ότι περίπου ένα τέταρτο του δισεκατομμυρίου μεταναστευτικών περνούν μέσω του νησιού κατά τη διάρκεια και των δύο περιόδων μετανάστευσης (η πλειοψηφία είναι κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου), ενισχύει τη σημασία του νησιού ως κύρια ενδιάμεση στάση μετανάστευσης.

Αν και ο ρόλος των μεταναστευτικών πτηνών στη διάδοση των παθογόνων οργανισμών από τις ενδημικές εστίσεις τους στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές της Αφρικής στην Ευρώπη έχει αναγνωριστεί, η σύνδεση μεταξύ των «ξεσπασμάτων» ορισμένων ζωνοσών στις προηγούμενες δεκαετίες και των μεταναστευτικών πτηνών παραμένει ακόμα υποθετική.

Η γρήγορη ανάπτυξη των διαγνωστικών εργαλείων μαζί με το αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη διασπορά των ζωνοσών από τα μεταναστευτικά πτηνά έχει επιστήσει την προσοχή στις ασθένειες εκτός από τον πυρετό WN (West Nile Fever) που μπορεί να έχει εισαχθεί ήδη στην Ευρώπη από τις ενζωοτικές περιοχές στην Αφρική. Μερικές από αυτές, όπως οι επιδημίες ιών Sidbis στη Σκανδιναβία το 1982 αποδείχθηκαν ότι εισήχθησαν από τα

πτηνά που έφθαναν από την Αφρική. Επιπλέον, στη βόρεια Αφρική σχεδόν αποκλειστικά ανιχνεύεται στους σχετικά άνοσους ανθρώπινους πληθυσμούς στις περιοχές όπου οι μετανάστες συναθροίζονται σε μεγάλους αριθμούς, κατά τη διάρκεια ετήσιων μεταναστευτικών μετακινήσεων των πτηνών. Άλλοι, όπως ο αιμορραγικός πυρετός της Κριμαίας-Κογκό (CCHF), η tick-borne εγκεφαλίτιδα (TBE) και ο αιμορραγικός πυρετός με το νεφρικό σύνδρομο (HFRS), καθιερώνονται ήδη σε διάφορες ενδημικές εστιάσεις στην Ευρώπη, και είναι μια σοβαρή ανησυχία δημόσιας υγείας σε αυτές τις περιοχές. Εκτός από τους ιούς, τα μεταναστευτικά πτηνά έχουν επίσης έναν σημαντικό ρόλο στη διάδοση των βακτηριακών παθογόνων, όπως το *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Ehrlichia sp.*, *Rickettsia sp.* και διάφορους άλλους αιτιολογικούς παράγοντες ασθενειών που αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία στην Ευρώπη.



2.4. Μεθοδολογία

2.4.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση-καταρτισμός πρωτοκόλλων

Αρχικά έγινε αναζήτηση και ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας: Καταγράφηκε η σχετική με το θέμα υφιστάμενη γνώση διεθνώς. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην αναζήτηση βιβλιογραφίας από χώρες στην περιοχή της Μεσογείου. Αναζητήθηκαν και καταγράφηκαν στοιχεία και υπάρχοντα δεδομένα στην Κύπρο, που αφορούν τους κρότωνες και τα είδη που ενδημούν, τα παθογόνα που μεταφέρουν, τα είδη των μεταναστευτικών πτηνών που συναντούνται στην Κύπρο, κρούσματα για τις υπό μελέτη ζωνόσους που έχουν αναφερθεί σε ανθρώπους και ζώα. Ακολούθως έγινε σχεδιασμός, καταρτισμός και επεξεργασία αναλυτικών πρωτοκόλλων στα οποία γινόταν λεπτομερής αναφορά όλων μεθόδων που θα χρησιμοποιούνταν κατά τη διεξαγωγή της μελέτης. Προετοιμάστηκε δελτίο με επιδημιολογικά στοιχεία για κάθε ζώο και πρωτόκολλο δειγματοληψίας (συλλογής των κροτώνων, συλλογής δειγμάτων αίματος κλπ) καθώς και εργαστηριακά πρωτόκολλα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ). Τέθηκαν δηλαδή οι βάσεις για την οργάνωση όλων των επιμέρους τμημάτων-εργασιών της παρούσας μελέτης.

2.4.2. Δημιουργία βάσης δεδομένων και εγκατάσταση GIS

A. Δημιουργήθηκε βάση δεδομένων για την καταχώρηση των αποτελεσμάτων (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ).

B. Έγινε εγκατάσταση του GIS και εισαγωγή του χάρτη της Κύπρου σε Η/Υ για την χαρτογράφηση των αποτελεσμάτων που θα προέκυπταν από την έρευνα. Η ελεύθερη Κύπρος στο χάρτη χωρίστηκε σε διοικητικές επαρχίες και περιέλαβε όλα τα χωριά και τις κτηνοτροφικές μονάδες.

Γ. Προσδιορίστηκε αντιπροσωπευτικό δείγμα παραγωγικών ζώων, από τα οποία θα γινόταν αιμοληψία για ορολογικό έλεγχο. Το δείγμα είναι στατιστικά σημαντικό και προσδιορίστηκε με stratified random sampling method. Συγκεκριμένα λήφθηκαν υπόψη α) οι αριθμοί των ζωικών πληθυσμών κατά είδος ζώου, όπως αυτοί είναι καταχωρημένοι και καταγεγραμμένοι στο επίσημο μητρώο καταγραφής ζώων των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Κύπρου και β) η διασπορά- συγκέντρωση αυτών των ζώων στις πέντε επαρχίες της Κύπρου.

Η επιλογή των εκτροφών καθώς και των ατόμων (ζώων), μεμονωμένα από τα οποία θα λαμβάνετο δείγμα, έγινε τυχαία. Συγκεκριμένα από τον κατάλογο-μητρώο εκτροφών που τηρούν οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, με κλήρωση επιλέγηκαν πρώτα οι περιοχές δειγματοληψίας και στη συνέχεια με δεύτερη κλήρωση οι συγκεκριμένες εκτροφές ζώων από

τις οποίες θα λαμβάνονταν τα δείγματα (64 εκτροφές αιγοπροβάτων από αντίστοιχες περιοχές και 34 εκτροφές βοοειδών από 28 περιοχές, κατανεμημένες στις 5 επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου, σύμφωνα με την κατανομή του ζωικού πληθυσμού σ' αυτές και σύμφωνα πάντα με το εξαγχθέν στατιστικό δείγμα).

2.4.3. Δειγματοληψίες

2.4.3.1. Δειγματοληψία κροτώνων από παραγωγικά και κατοικίδια ζώα

Συλλέχθηκαν κρότωναes από παραγωγικά ζώα σε όλη την Κύπρο. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από το καλοκαίρι του 2004 μέχρι και το χειμώνα του 2006, έτσι ώστε να συμπεριληφθούν όλες οι εποχές του χρόνου (άνοιξη-καλοκαίρι-φθινόπωρο-χειμώνας) για δύο χρόνια.

Από κάθε εκτροφή σε κάθε μια από τις επισκέψεις ελέγχου, εξετάζονταν 10 ζώα ανεξαρτήτως του είδους για τυχόν παρασιτισμό τους από κρότωναes. Επίσης εάν η εκτροφή διέθετε και σκύλο υποβαλλόταν και αυτός στον έλεγχο. Στην περίπτωση που δεν υπήρχε, ελεγχόταν σκύλος από τα πλησιέστερα υποστατικά ή την πλησιέστερη κοινότητα. Συνολικά σε κάθε εκτροφή έγιναν οκτώ έλεγχοι, ένας δηλαδή σε κάθε εποχή (Άνοιξη, Καλοκαίρι, Φθινόπωρο, Χειμώνας) και για δύο συνεχόμενα χρόνια.

Για κάθε ζώο συμπληρώθηκε επιδημιολογικό δελτίο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ) με τα παρακάτω στοιχεία: ημερομηνία συλλογής, κτηνοτροφική μονάδα, περιοχή, είδος ζώου, ηλικία, κατάσταση του ζώου, τόπος διαμονής του και τυχόν μετακινήσεις του, παρασιτισμός από κρότωναes ή άλλα εκτοπαράσιτα, ποιος ο αριθμός των κροτώνων που του αφαιρέθηκαν, ποιο το είδος τους και ποιο το στάδιο του βιολογικού τους κύκλου, και από ποιες περιοχές του σώματος απομακρύνθηκαν.

Επιπρόσθετα, γινόταν με όργανο G.P.S λήψη και καταγραφή των γεωγραφικών συντεταγμένων και του υψομέτρου της κάθε περιοχής δειγματοληψίας και σε συνεργασία με την Μετεωρολογική Υπηρεσία καταγράφονταν η μέση θερμοκρασία και η μέση σχετική υγρασία που επικρατούσαν στη συγκεκριμένη περιοχή δειγματοληψίας την συγκεκριμένη εποχή.

Οι κρότωναes οι οποίοι αφαιρούνταν από τα παρασιτούμενα ζώα τοποθετούνταν σε cryotubes τα οποία κωδικοποιούνταν με μονοσήμαντο κωδικό ο οποίος καθόριζε το είδος του ζώου, το συγκεκριμένο άτομο, την εκτροφή και την περιοχή, και μεταφερόμενοι στις εγκαταστάσεις των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών διατηρούνταν στους -80° μέχρι να αποσταλούν στις

εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Κρήτης για να γίνει η ταξινόμηση - ταυτοποίηση τους και ο εργαστηριακός έλεγχος. Κάθε κρότωνας ταυτοποιήθηκε μέχρι το είδος.

Με βάση τις παραπάνω ενέργειες διαπιστώθηκαν οι διακυμάνσεις των πληθυσμών των κροτώνων ανάλογα με την εποχή, καθώς και το είδος των κροτώνων που κυριαρχούν (αυξημένοι πληθυσμοί) σ' ένα κοπάδι ή/ και σε μια ορισμένη περιοχή. Προσδιορίστηκαν τα είδη των κροτώνων που παρασιτούν παραγωγικά και κατοικίδια ζώα και ο βαθμός διασποράς τους, καθώς και ο βαθμός παρασιτισμού (infestation rate) του κάθε είδους ζώου ανά είδος κρότωνα.

2.4.3.2. Οροεπιδημιολογική μελέτη σε κτηνοτροφικής σημασίας και κατοικίδια ζώα

Μετά τον προσδιορισμό του στατιστικά σημαντικού δείγματος, προγραμματίστηκαν και πραγματοποιήθηκαν οργανωμένες δειγματοληψίες οι οποίες αφορούσαν συλλογή αντιπροσωπευτικού δείγματος αίματος από αίγες, πρόβατα, βοοειδή και σκύλους από κτηνοτροφικές μονάδες σε όλη την Κύπρο. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από το Μάρτιο του 2005 μέχρι το Δεκέμβριο του 2006 και έγιναν από 10 τυχαία επιλεγμένα ζώα από κάθε κτηνοτροφική μονάδα

Από κάθε ζώο ελήφθησαν 2 δείγματα αίματος (ένα φιαλίδιο με αντιπηκτικό και ένα δεύτερο χωρίς). Τα παραπάνω δείγματα χρησιμοποιήθηκαν, μετά και από τη σχετική επεξεργασία όπως αυτή περιγράφεται στον εργαστηριακό έλεγχο και αφορά τη λήψη των ορών και των λευκών στοιβάδων, για να γίνει ορολογικός έλεγχος και γονοτυπική ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων.

Κάθε δείγμα αίματος συνοδευόταν με τη συμπλήρωση ερωτηματολογίου με στοιχεία για το ζώο χρήσιμα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, όπως αναφέρεται παραπάνω. Τα δείγματα των ορών φυλάσσονταν στους -20° C μέχρι να ελεγχθούν, ενώ οι λευκές στοιβάδες στους -80° C. Ο ορολογικός έλεγχος έγινε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού και η γονοτυπική ανίχνευση με τη μέθοδο PCR.

2.4.3.3. Δειγματοληψία από μεταναστευτικά πτηνά και άγρια θηλαστικά.

Το δεύτερο μέρος των δειγματοληψιών αφορούσε συλλογή κροτώνων και δειγμάτων αίματος από άγρια θηλαστικά (αγρινά, λαγούς, αλεπούδες) και άγρια πτηνά (επιδημητικά και αποδημητικά).

Οι δειγματοληψίες που αφορούσαν τα είδη αυτά της άγριας ζωής, οργανώθηκαν και πραγματοποιήθηκαν με τους ακόλουθους τρόπους:

- Με σύλληψη με παγίδες αγρίων θηλαστικών και πτηνών, δειγματοληψία και απελευθέρωση τους.
- Με λήψη δειγμάτων από τραυματισμένα και νεκρά άγρια θηλαστικά και πτηνά τα οποία συλλέγονταν από το Ταμείο Θήρας Κύπρου και μεταφέρονταν στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες για δειγματοληψία.
- Με δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε κατά τις κυνηγετικές περιόδους σε «μπλόκα» ελέγχου των κυνηγών.

A) Η παγίδευση των πτηνών πραγματοποιήθηκε με τυποποιημένα νάυλον δίχτυα υδρονέφωσης (mistnets) και παγίδες τα οποία τοποθετούνταν σε επιλεγμένους εκ των προτέρων κατάλληλους βιότοπους. Έγινε προσπάθεια ώστε να καλυφθούν όλοι οι τύποι βιοτόπων που χρησιμοποιούνται από τα διαφορετικά είδη πουλιών.

Μετά την σύλληψη τους, τα πτηνά τοποθετούνταν σε υφασμάτινες τσάντες ή σε χάρτινα κουτιά του κατάλληλου μεγέθους. Αφού γινόταν η καταγραφή πληροφορίας για τα βιολογικά χαρακτηριστικά του κάθε είδους ακολουθούσε έλεγχος για την παρουσία κροτώνων (αναζήτηση τους κυρίως στη περιοχή της κεφαλής) και λαμβάνονταν δείγματα αίματος σε φίλτρο (Whatman® paper), μετά από αντισηψία της περιοχής των δακτύλων και νύξη με αποστειρωμένη βελόνα. Στη συνέχεια τα πτηνά απελευθερώνονταν.

Για τα υδρόβια (Χηνόμορφα, Γλαρόμορφα) και τα αρπακτικά, η διαδικασία της δειγματοληψίας ήταν η ίδια με την προηγούμενη με τη διαφορά ότι δε χρησιμοποιήθηκαν δίχτυα αλλά ειδικές παγίδες, ενώ για τα παρυδάτια χρησιμοποιήθηκαν και δίχτυα και παγίδες. Η παγίδευση των αγρινών πραγματοποιήθηκε με παγίδες σύλληψης μεγάλων θηλαστικών, τύπου clover mammal traps. Αφού γινόταν η καταγραφή των σχετικών πληροφοριών, ακολουθούσε έλεγχος για την παρουσία κροτώνων και συλλογή τους και λαμβάνονταν δείγματα αίματος σε ειδικά φιαλίδια αιμοληψίας τα οποία αργότερα μεταφερόταν στα ειδικά φίλτρα, για να υπάρχει ομοιομορφία με τα υπόλοιπα δείγματα. Το αίμα λαμβάνετο από την σφαγίτιδα φλέβα μετά από αντισηψία της περιοχής.

Η παγίδευση των λαγών πραγματοποιήθηκε με ειδικά δίχτυα σύλληψης μικρών θηλαστικών. Αφού γινόταν η καταγραφή των σχετικών πληροφοριών, ακολουθούσε έλεγχος για την παρουσία κροτώνων και συλλογή τους και λαμβάνονταν δείγματα αίματος στα ειδικά φίλτρα αιμοληψίας(Whatman® paper) . Το αίμα λαμβανόταν από τις ωτικές φλέβες μετά από νύξη τους με αποστειρωμένη βελόνα, αφού προηγείτο αντισηψία της περιοχής.

Το κομμάτι αυτό της δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με προσωπικό του Ταμείου Θήρας που εκπαιδεύτηκε ειδικά για το συγκεκριμένο σκοπό.

Τα δείγματα μεταφέρονταν στις εγκαταστάσεις των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών όπου διατηρούνταν και φυλάσσονταν στις κατάλληλες συνθήκες μέχρι την αποστολή τους για εργαστηριακή ανάλυση στο Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Β) Τα νεκρά θηλαστικά και πτηνά που μεταφέρονταν στις εγκαταστάσεις των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, καταγράφονταν, κωδικοποιούνταν και υπόκειντο σε δειγματοληψία, αφού παίρνονταν όλα τα ενδεικνύμενα μέτρα προστασίας των ερευνητών (ένδυση με προστατευτικές ποδιές μιας χρήσης, μάσκες που εμποδίζουν την εισπνοή επικίνδυνων σωματιδίων, γάντια μιας χρήσης). Τα δείγματα που λαμβάνονταν φυλάσσονταν στις κατάλληλες συνθήκες μέχρι την αποστολή τους στο Πανεπιστήμιο Κρήτης για τις περαιτέρω εξετάσεις.

Πιο συγκεκριμένα, κάθε νεκρό θηλαστικό και πτηνό που παραδιδόταν, αφού τύχανε καταγραφής και κωδικοποίησης υποβαλλόταν σε έλεγχο για παρουσία κροτώνων και νεκροψία-νεκροτομή. Χρησιμοποιούνταν αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία (ένα set για κάθε ζώο ξεχωριστά) και καταγράφονταν πιθανά παθολογικά ευρήματα. Λαμβάνονταν δείγματα ενδοκαρδιακού αίματος σε φίλτρο τα οποία τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα cryotubes και φυλάγονταν σε καταψύκτες σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την αποστολή τους στην Κρήτη για τις περαιτέρω εξετάσεις

Σε θηλαστικά και πτηνά που έφταναν στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες ασθενή ή τραυματισμένα και μη έχοντας πιθανότητες ίασης, των πιο πάνω προηγείτο εφαρμογή ευθανασίας.

Από θηλαστικά και πτηνά τα οποία ήταν τραυματισμένα και είχαν αυξημένες πιθανότητες αποθεραπείας, λαμβάνονταν δείγματα αίματος κατά τους ίδιους τρόπους που αναφέρθηκαν και στη δειγματοληψία μετά από παγίδευση και προωθούνταν για εφαρμογή της αναγκαίας κατά περίπτωση θεραπείας.

Γ) Κατά τη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε τις κυνηγετικές περιόδους σε μπλόκα ελέγχου των κυνηγών, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Αν κατά τον έλεγχο βρισκόταν θήραμα, τότε καταγράφονταν οι απαιτούμενες για την έρευνα πληροφορίες (είδος θηράματος, περιοχή θήρευσης) και έλεγχος και συλλογή κροτώνων καθώς και λήψη αίματος σε φίλτρο. Το είδος αυτό δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε από το Ταμείο Θήρας σε συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες.

Κάθε δείγμα συνοδευόταν με ερωτηματολόγιο με στοιχεία για το ζώο χρήσιμα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα αίματος διατηρήθηκαν στους -80°C , μέχρι να ελεγχθούν. Ο έλεγχος έγινε με τη μέθοδο της PCR.

2.4.4. Εργαστηριακός έλεγχος δειγμάτων

2.4.4.1. Επεξεργασία φίλτρων

Τα φίλτρα κόβονταν στις διαστάσεις 1x1 εκατ. και αποθηκεύονταν σε χωριστά αποστειρωμένα σωληνάρια για κάθε είδος ζώου. Για την αφαίρεση του αίματος, τα φίλτρα ετοποθετούνταν σε σωληνάριο με PBS και 2% FBS (490μl PBS + 10μl FBS). Το FBS χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή των αναστολεων της PCR οι οποίοι υπάρχουν στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Μετά από ολονύκτια επώαση στους 4°C, τα φίλτρα φυγοκεντρώνταν στις 2800 g στροφές για 5 λεπτά για να διαχωριστεί το αίμα από το φίλτρο. Διακόσια (200) μl αφαιρούνταν, μεταφέρονταν σε νέα αποστειρωμένα σωληνάρια και αποθηκεύονταν στους -20°C μέχρι την εξαγωγή του DNA. Τα σωληνάρια με την υπόλοιπη ποσότητα αίματος αποθηκεύονταν στους -80°C.

Το αίμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση DNA των υπό μελέτη παθογόνων, με τη μέθοδο της PCR. Συγκεκριμένα έγινε εξαγωγή του DNA με τη χρήση του blood QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) και ακολούθησε γενωμικός πολλαπλασιασμός (PCR).

2.4.4.2. Επεξεργασία εκτοπαρασίτων

Πριν από την επεξεργασία, τα εκτοπαρασίτα ταυτοποιούνταν μέχρι το είδος χρησιμοποιώντας τα υπάρχοντα ταξονομικά κλειδιά και χωρίζονταν σε διαφορετικά αποστειρωμένα σωληνάρια σύμφωνα με τα είδη, το γένος τους και το ζώο-ξενιστής συλλογής. Κατόπιν, απολυμνούνταν χρησιμοποιώντας αιθανόλη 70% και ddH₂O και τεμαχίζονταν σε μικρά κομμάτια μέσα σε διάλυμα 200μl PBS. Ποσότητα από τα τεμαχισμένα εκτοπαρασίτα χρησιμοποιήθηκε για να φτιαχθούν pools (200μl τελικός όγκος) βάση του είδους, γένους και ζώου-ξενιστή προέλευσης. Τα pools αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την εξαγωγή DNA. Τα σωληνάρια με την υπόλοιπη ποσότητα εκτοπαρασίτων αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.4.4.3. Ορολογικός έλεγχος

Οι οροί που συλλέχθηκαν από τα παραγωγικά ζώα, τους σκύλους και τους ανθρώπους, ελέγχθηκαν για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *R. Conoru*, *Coxiella burnetii*, και *Anaplasma phagocytophilum*. Ο ορολογικός έλεγχος των δειγμάτων για όλα τα ανωτέρω παθογόνα έγινε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (προσδιορισμός IgG αντισωμάτων) ως εξής: Σε αντικειμενοφόρους πλάκες με στρωμένο το αντιγόνο του συγκεκριμένου παθογόνου μικροοργανισμού προστέθηκε ο ορός του ζώου σε διαφορετικές-

διαδοχικές αραιώσεις και μαρκαρίστηκε με fluorescein-labeled anti-sheep /or goat /or bovine/or dog conjugate για να διαβαστεί στο μικροσκόπιο του ανοσοφθορισμού. Για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι της *R. Conorii* και της *Coxiella burnetii* χρησιμοποιήθηκε το kit της biomerieux (France), ενώ για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του *Anaplasma phagocytophilum* χρησιμοποιήθηκε το kit της VMRD (USA). Όσον αφορά τα παθογόνα *R. Conorii* και *Coxiella burnetii*, με αρχική αραιώση του εξεταστέου ορού 1/60 (με PBS) και διαδοχικές αραιώσεις υποδιπλασιασμού, θετικό θεωρήθηκε το δείγμα με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/120$. Αντίθετα για το παθογόνο *Anaplasma phagocytophilum*, με αρχική αραιώση του εξεταστέου ορού 1/50 (με PBS) και διαδοχικές αραιώσεις υποδιπλασιασμού, θετικό θεωρήθηκε το δείγμα με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/100$.

2.4.4.4. Εργαστηριακός έλεγχος των κροτώνων, των φίλτρων αίματος από άγρια ζώα και των λευκών στοιβάδων από τα αίματα παραγωγικών ζώων για την ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων.

A. Εξαγωγή DNA

Όλες οι εξαγωγές του DNA πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN, Hilden, Γερμανία) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ). Τα εκχυλίσματα του DNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί ο γονιδικός πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), όπως περιγράφεται παρακάτω.

B. Γενωμικός πολλαπλασιασμός (PCR)

Ο εργαστηριακός έλεγχος για την γονοτυπική ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων από τους κρότωνες, έγινε με τη μέθοδο της PCR και η ταυτοποίηση με τη μέθοδο RFLP, ή με sequencing analysis του DNA.

Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιήθηκε για την άμεση ανίχνευση στους κρότωνες των παρακάτω: *Coxiella burnetii*, *Rickettsiae*, *Ehrlichiae*. Για την ανίχνευση του DNA του κάθε παθογόνου χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι εναρκτές (primers).

- Για την ανίχνευση του DNA των *Rickettsiae* χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές **RpCS 877p** : 5'-GGG-GAC-CTG-CTC-ACG-GCG-G-3' και **RpCS 1258n** : 5'-ATT-GCA-AAA-AGT-ACA-GTG-AAC-A-3' οι οποίοι κωδικοποιούν μία αλληλουχία του γονιδίου της κιτρικής συνθετάσης (citrate synthase *gltA*) [Roux V. και άλλοι, 1997],

καθώς επίσης και οι εναρκτές **Rr19070p** 5'-ATG-GCG-AAT-ATT-TCT-CCA-AAA-3' και **Rr190602n** : 5'-AGT-GCA-GCA-TTC-GCT-CCC-CCT-3' οι οποίοι κωδικοποιούν μία αλληλουχία της πρωτεΐνης A της εξωτερικής μεμβράνης του παθογόνου (outer membrane protein *ompA*) [Regnery R. και άλλοι, 1991].

- Για την ανίχνευση του DNA της *Coxiella burnetii* χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές **CB1**: 5'-ACT-CAA-CGC-ACT-GGA-ACC-GC-3' και **CB2**: 5'-TAG-CTG-AAG-CCA-ATT-CGC-C-3' οι οποίοι κωδικοποιούν μία αλληλουχία του γονιδίου υπεροξειδίου της δισμουτάσης (superoxide dismutase gene) [Spyridaki I. και άλλοι, 1998].
- Για την ανίχνευση του DNA των *Ehrlichiae* χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές **EHR16SD**:5'-GGT-ACC-YAC-AGA-AGA-AGT-CC-3' και **EHR16SR**: 5'-TAG-CAC-TCA-TCG-TTT-ACA-GC-3' οι οποίοι κωδικοποιούν μία αλληλουχία του γονιδίου 16s rRNA [Inokuma H. και άλλοι, 2001].

Σε κάθε περίπτωση, τα προϊόντα των PCR χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και στη συνέχεια ελέγχθηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο σε φως UV.

Η μέθοδος RFLP (ανάλυση του πολυμορφισμού των κλασμάτων του DNA- restriction fragment length polymorphism), βασίζεται στο «κόψιμο» των προϊόντων πολλαπλασιασμού του PCR με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Τα τμήματα του DNA που προέκυπταν ηλεκτροφορούνταν σε αγαρόζη 2%. Το προφίλ κατατομής των κλασμάτων (ειδικό για κάθε παθογόνο) συγκρινόταν μ' εκείνο γνωστών στελεχών, προκειμένου να γίνει η τυποποίηση. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι με κατάλληλη επιλογή και χρήση συνδυασμού περισσότερων του ενός περιοριστικών ενζύμων, προσφέρει μία μεγάλη δυνατότητα στη διερεύνηση διαφορών μεταξύ βακτηρίων, παρασίτων φυλογενετικής εγγύτητας, ή στελεχών του ίδιου είδους.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (sequencing) του DNA είναι η απόλυτη μέθοδος αναγνώρισης των διαφορών που παρουσιάζονται μεταξύ των στελεχών ενός μικροοργανισμού, και της σύμφωνα με αυτές, φυλογενετικής ταξινόμησής τους. Τα προϊόντα των PCR καθαρίζονταν με τη χρήση του QIAquick PCR product purification kit (QIAGEN, Germany) και εστέλοντο στην εταιρεία GENOTYΠΟΣ (Αθήνα) προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός της αλληλουχίας τους σε συσκευή προσδιορισμού αλληλουχιών (sequencer). Με τον τρόπο αυτό, κατέστη δυνατή η ακριβής τυποποίηση και ταυτοποίηση των στελεχών και η επακόλουθη ταξινόμησή τους.

2.5. Ορολογική διερεύνηση σε ανθρώπινο πληθυσμό.

Οι κάτοχοι των ζώων έλαβαν μέρος στην μελέτη. Για τον κάθε κάτοχο των μελετώμενων ζώων, συμπληρώθηκε επιδημιολογικό δελτίο με επιδημιολογικά στοιχεία (ημερομηνία, φύλο, ηλικία, τόπο κύριας και δευτερεύουσας κατοικίας, εργασία κύρια και δευτερεύουσα, σχέση με ζώα, επαφή με κρότωνες, ύπαρξη προηγούμενης νόσου). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε τυποποιημένο επιδημιολογικό δελτίο για τον πυρετό Q το οποίο επισυνάπτεται στα ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.

Όλα τα δείγματα φυλλάσσονταν στους -20oC μέχρι να ελεγχθούν. Ο έλεγχος των ορών για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των υπό μελέτη παθογόνων και τα PCR για γονοτυπική ανίχνευση στο ολικό αίμα, πραγματοποιήθηκαν με τις μεθόδους που περιγράφηκαν αναλυτικά παραπάνω. Τα δείγματα θεωρήθηκαν θετικά με cut-off $\geq 1/100$ για IgG αντισώματα.

2.6. Στατιστική ανάλυση και Γεωγραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων.

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα PASW (SPSS 18). Τα αποτελέσματα βασίζονται στην Ανάλυση της Διακύμανσης (ANOVA – Analysis of Variance) των δειγμάτων, ενώ για τον έλεγχο των διαφορών μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος LSD (Least Significant Difference).

Για τη γεωγραφική αποτύπωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα χαρτογράφησης MapInfo v.6.5.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΠΑΡΑΣΙΤΙΣΜΟΣ

Συνολικά και κατά τη διάρκεια των ελέγχων που πραγματοποιήθηκαν από τα είδη ζώων τα οποία μελετήθηκαν, έγινε κατορθωτή η συλλογή 3076 κροτώνων, οι οποίοι χρησιμοποιώντας τις ειδικές ταξινομικές κλείδες, ταυτοποιήθηκαν μέχρι και το είδος (Πίνακας 1).

ΕΙΔΟΣ ΖΩΟΥ	ΕΙΔΟΣ ΕΚΤΟΠΑΡΑΣΙΤΟΥ											ΣΥΝΟΛΟ ΚΡΟΤΩΝΩΝ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ ΖΩΟΥ
	<i>H. sulcata</i>	<i>H. anatolicum excavatum</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>R. bursa</i>	<i>R. turanicus</i>	<i>H. marginatum marginatum</i>	<i>I. ventrali</i>	<i>H. marginatum rufipes</i>	<i>I. gibbosus</i>	<i>H. punctata</i>	<i>R. pusillus</i>	
ΑΙΓΕΣ		17		323	42				1			383
ΠΡΟΒΑΤΑ		140	41	5	34	7						227
ΒΟΟΕΙΔΗ		37		2	4			1				44
ΣΚΥΛΟΙ		1	1023		83							1107
ΑΓΡΙΝΑ	276	83		216	46	1			23	15		660
ΑΛΕΠΟΥ			4		175		6		19			204
ΛΑΓΟΣ			106	4	265		45		1		15	436
ΠΤΗΝΑ							15					15
ΟΛΙΚΟ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ ΚΡΟΤΩΝΑ	276	278	1174	550	649	8	66	1	44	15	15	3076

Πίνακας 1: Παρασιτισμός ανά είδος ζώου.

Οι περιοχές του σώματος όπου εντοπίζονταν οι κρότωνες στα διάφορα είδη των ζώων διέφεραν ανάλογα με το είδος του ζώου και το είδος του κρότωνα. Στα βοοειδή εντοπίζονταν κυρίως στην περινεϊκή χώρα, στην περιοχή των μαστών για τα θηλυκά και στους όρχεις και στην ακροποσθία για τα αρσενικά. Στα πρόβατα, τα παράσιτα εντοπίζονταν κυρίως στη ραχιαία επιφάνεια της ουράς, στο μαστό, στους όρχεις, στην ακροποσθία και σπάνια στα πτερύγια των αυτιών, ενώ στις αίγες κυρίως στο μαστό, στην περινεϊκή χώρα και γύρω από το αιδοίο και σπάνια στα πτερύγια των αυτιών. Στους σκύλους, εντοπίζονταν κυρίως στα πτερύγια των αυτιών, τον τράχηλο, τους ώμους, τη ράχη, τις μασχάλες, τους βουβώνες, το πρόσωπο και τα φρύδια καθώς και τα μεσοδακτύλια διαστήματα. Στα αγρινά είχαν την ίδια εντόπιση όπως και στα πρόβατα, όχι όμως στην ουρά αλλά επιπλέον και στον τράχηλο και τον κορμό του σώματος. Στους λαγούς, κυρίως στον τράχηλο και στα πτερύγια των αυτιών. Στις αλεπούδες, οι κρότωνες εντοπίζονταν στα πτερύγια των αυτιών, στο λαιμό, στην περινεϊκή χώρα και στα μεσοδακτύλια διαστήματα.

Πιο συγκεκριμένα, από τα παραγωγικά ζώα και τα κατοικίδια ζώα έχουν συλλεχθεί 1761 κρότνες. Αναλυτικότερα έχουν συλλεχθεί 654 κρότνες από αιγοπρόβατα και βοοειδή καθώς και 1107 κρότνες από σκύλους (Πίνακας 2).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από το καλοκαίρι του 2004 μέχρι και το χειμώνα του 2006, έτσι ώστε να συμπεριληφθούν όλες οι εποχές του χρόνου (άνοιξη-καλοκαίρι-φθινόπωρο-χειμώνας) για δύο χρόνια.

Από κάθε εκτροφή σε κάθε μια από τις επισκέψεις ελέγχου, εξετάζονταν 10 ζώα ανεξαρτήτως του είδους για τυχόν παρασιτισμό τους από κρότνες. Επίσης εάν η εκτροφή διέθετε και σκύλο υποβαλλόταν και αυτός στον έλεγχο. Στην περίπτωση που δεν υπήρχε, ελεγχόταν σκύλος από τα πλησιέστερα υποστατικά ή την πλησιέστερη κοινότητα. Συνολικά σε κάθε εκτροφή έγιναν οκτώ έλεγχοι, ένας δηλαδή σε κάθε εποχή (Άνοιξη, Καλοκαίρι, Φθινόπωρο, Χειμώνας) και για δύο συνεχόμενα χρόνια.

Η ταυτοποίηση των κροτώνων αυτών, τους κατέταξε στα ακόλουθα 7 είδη σκληρών κροτώνων: *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma marginatum rufipes*, *Ixodes gibbosus*.

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα είδη των κροτώνων ανά είδος ζώου που έχουν συλλεχθεί από παραγωγικά ζώα και σε χάρτες που ακολουθούν παρακάτω, γίνεται αποτύπωση της γεωγραφικής κατανομής αυτών των συλλογών.

Είδος κρότνα	Αριθμός κροτώνων ανά είδος ζώου				Ολικό	%
	αγελάδα	αίγα	πρόβατο	σκύλος		
<i>Rh. turanicus</i>	4	42	34	83	163	9.25
<i>Rh. sanguineus</i>			41	1023	1064	60.42
<i>Rh. bursa</i>	2	323	5		330	18.73
<i>Hy. a. excavatum</i>	37	17	140	1	195	11.07
<i>Hy. m. rufipes</i>	1				1	0.05
<i>Hy. m. marginatum</i>			7		7	0.39
<i>I. gibbosus</i>		1			1	0.05
	44	383	227	1107	1761	

Πίνακας 2: Κρότνες από παραγωγικά ζώα

Από τα άγρια ζώα (θηλαστικά και πτηνά), έγινε συλλογή 1315 κροτώνων των οποίων η ταυτοποίηση κατέταξε στα ακόλουθα 10 είδη σκληρών κροτώνων :

Haemaphysalis sulcata, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus pusillus*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Ixodes gibossus*, *Ixodes ventalloi*.

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα είδη των κροτώνων ανά είδος ζώου που έχουν συλλεχθεί από άγρια θηλαστικά και πτηνά.

Είδος κρότωνα	Αριθμός κροτώνων ανά είδος ζώου					%
	αγρινό	λαγός	αλεπού	πέρδικα	Ολικό	
<i>Ha. sulcata</i>	276				276	20.98
<i>Ha. punctata</i>	15				15	1.14
<i>Hy. a. excavatum</i>	83				83	6.31
<i>Hy. m. marginatum</i>	1				1	0.07
<i>Rh. bursa</i>	216	4			220	16.73
<i>Rh. turanicus</i>	46	265	175		486	36.95
<i>Rh. pusillus</i>		15			15	1.14
<i>Rh. sanguineus</i>		106	4		110	8.36
<i>I. gibossus</i>	23	1	19		43	3.26
<i>I. ventalloi</i>		45	6	15	66	5.01
	660	436	204	15	1315	

Πίνακας 3: Κρότωναες από άγρια θηλαστικά και πτηνά

Στα διαγράμματα και στους χάρτες που ακολουθούν γίνεται περεταίρω ανάλυση της εποχιακής και γεωγραφικής κατανομής των κροτώνων για τις δύο ομάδες ζώων, κτηνοτροφικά/ άγρια και ανά είδος ζώου ξεχωριστά.

1.1. Παρασιτισμός των παραγωγικών ζώων.

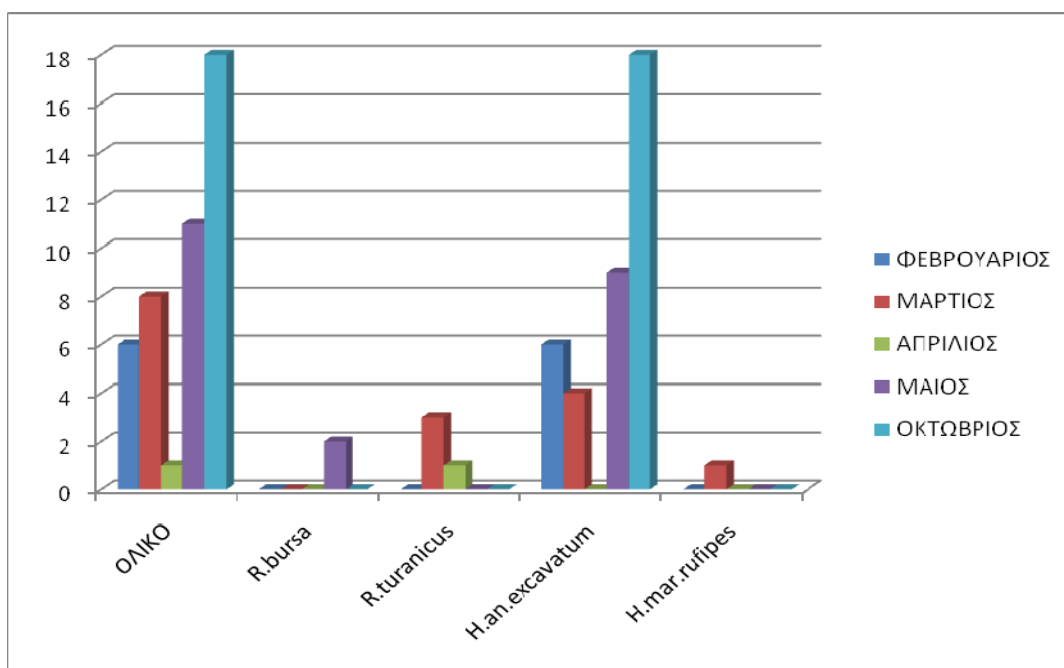
1.1.1. Παρασιτισμός των βοοειδών.

Τα βοοειδή στην παρούσα έρευνα αποτέλεσαν το είδος ζώου με το χαμηλότερο βαθμό παρασιτισμού.

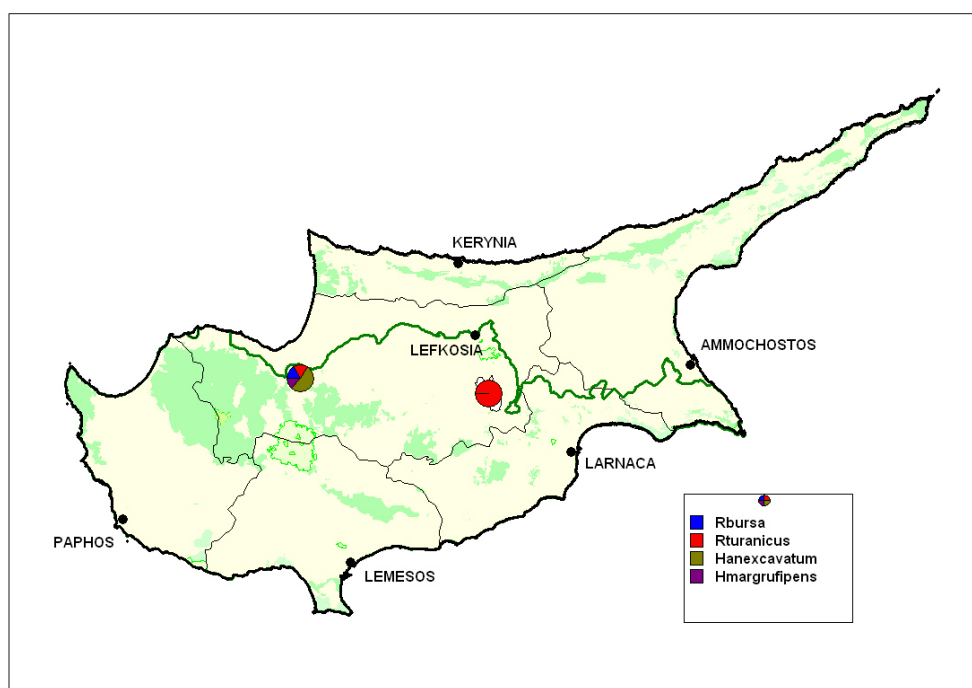
Συγκεκριμένα όλες σχεδόν οι συλλογές κροτώνων από αυτό το είδος ζώου, προέρχονταν από μία μόνο εκμετάλλευση, η οποία εκτρέφει την εντόπια φυλή βοοειδών χρησιμοποιώντας τις παραδοσιακές μεθόδους εκτροφής (εκτατική εκτροφή). Συλλέχτηκαν 37 κρότωναες *Hyalomma*

anatolicum excavatum, 4 *Rhipicephalus. turanicus*, 2 *Rhipicephalus. bursa* και 1 *Hyalomma marginatum rufipes*.

Στο Γράφημα 1 και στο χάρτη 1 φαίνεται η εποχιακή και γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που συλλέχθηκαν από βοοειδή.



Γράφημα 1: Εποχιακή κατανομή των κροτώνων που συλλέχθηκαν από βοοειδή.



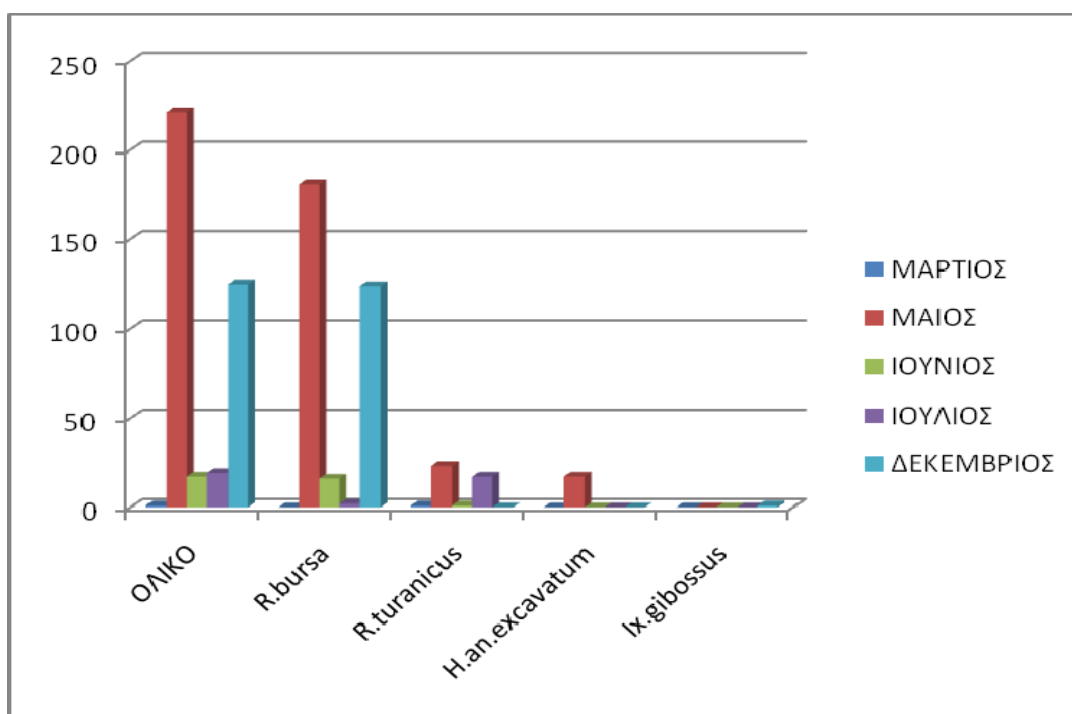
Χάρτης 1: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που συλλέχθηκαν από βοοειδή.

1.1.2. Παρασιτισμός των αιγών και των προβάτων.

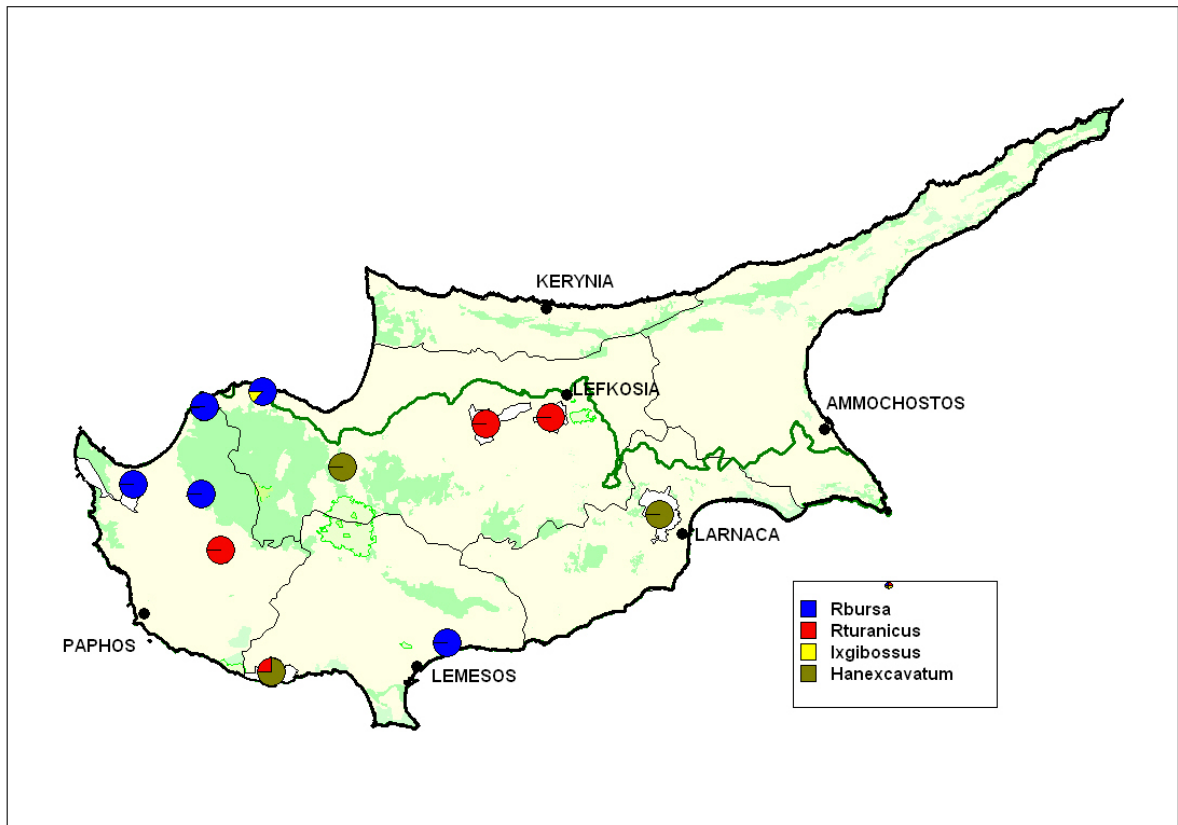
Και στα δύο αυτά είδη παραγωγικών ζώων ο παρασιτισμός διατηρήθηκε επίσης σε χαμηλά επίπεδα. Από τις αίγες συλλέχτηκαν συνολικά 383 κρότνες, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ως ακολούθως: 323 *Rhipicephalus bursa*, 42 *Rhipicephalus turanicus*, 17 *Hyalomma anatolicum excavatum*, και 1 *Ixodes gibbosus*.

Από τα πρόβατα συλλέχτηκαν συνολικά 227 κρότνες οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ως ακολούθως: 41 *Rhipicephalus sanguineus*, 5 *Rhipicephalus bursa*, 34 *Rhipicephalus turanicus*, 140 *Hyalomma anatolicum excavatum* και 7 *Hyalomma marginatum marginatum*.

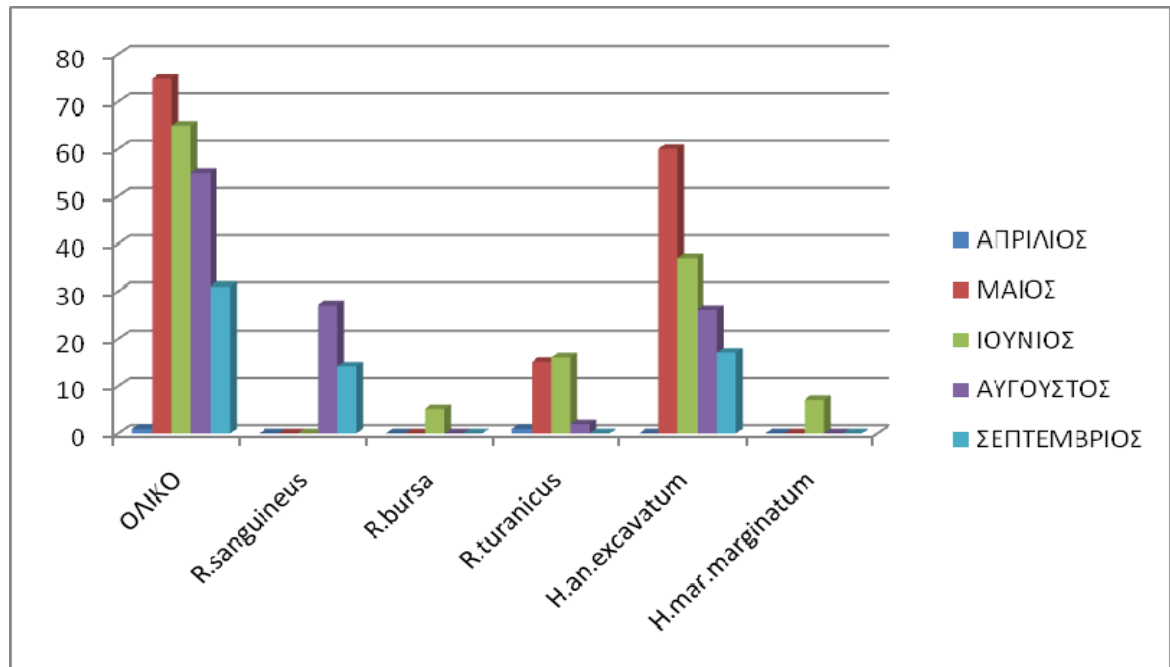
Στα Γραφήματα 2 και 3 δίδεται η εποχιακή κατανομή των κροτώνων στις αίγες και τα πρόβατα αντίστοιχα, ενώ στους χάρτες 2 και 3 δίδεται η γεωγραφική κατανομή των κροτώνων στα δύο αυτά είδη ζώων.



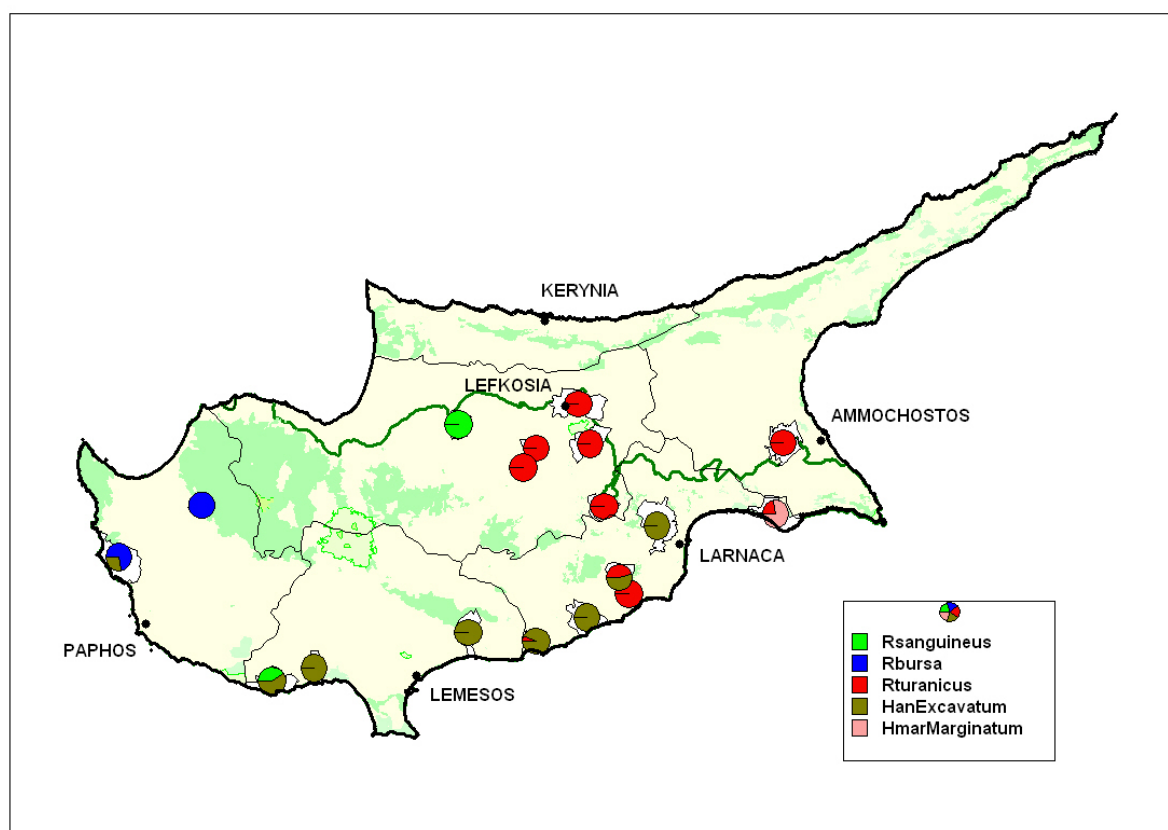
Γράφημα 2: Εποχιακή κατανομή των κροτώνων που συλλέχθηκαν από τις αίγες



Χάρτης 2: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που συλλέχθηκαν από αίγες.



Γράφημα 3: Εποχιακή κατανομή των κροτώνων που συλλέχθηκαν από πρόβατα

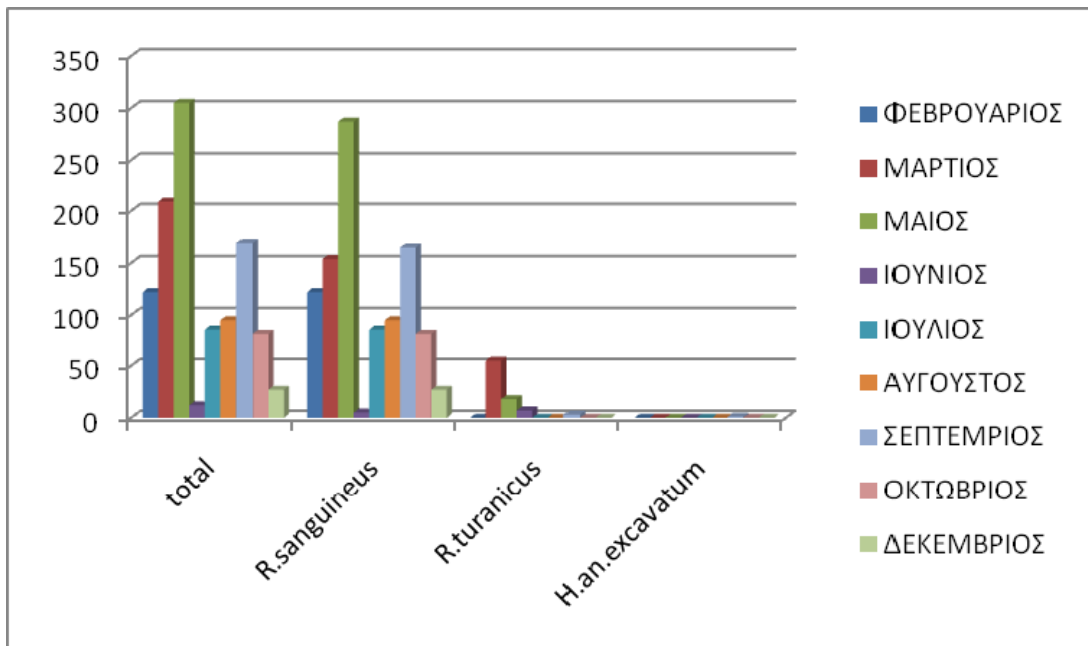


Χάρτης 3: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που συλλέχθηκαν από πρόβατα.

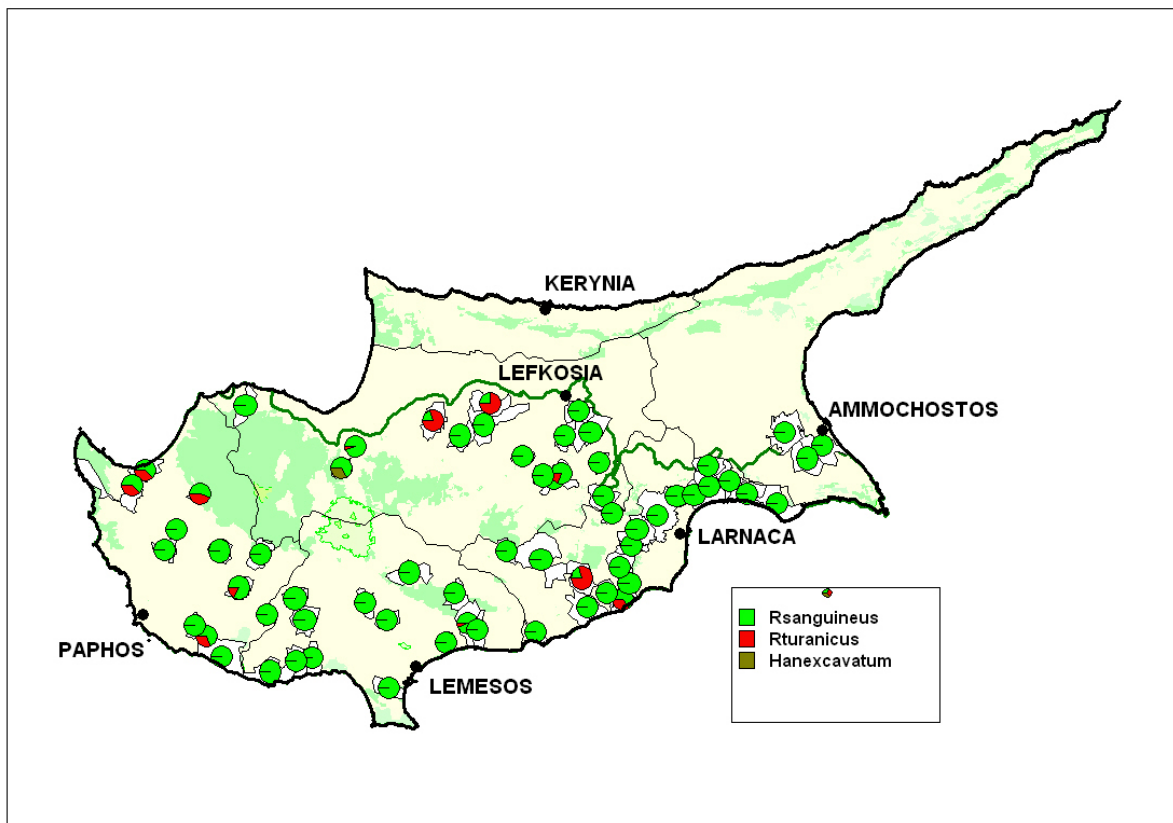
1.1.3. Παρασιτισμός στους σκύλους

Οι σκύλοι, ήταν το είδος ζώου το οποίο παρουσίασε το ψηλότερο βαθμό παρασιτισμού αφού από αυτούς συλλέχτηκαν 1107 κρότωναes ταυτοποιούμενοι σε 1023 *Rhipicephalus sanguineus*, 83 *Rhipicephalus turanicus* και 1 *Hyalomma anatolicum excavatum*.

Στο Γράφημα 4 δίδεται η εποχιακή κατανομή των κροτώνων στους σκύλους και στο χάρτη 4 η γεωγραφική κατανομή τους



Γράφημα 4: Εποχιακή κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν τους σκύλους

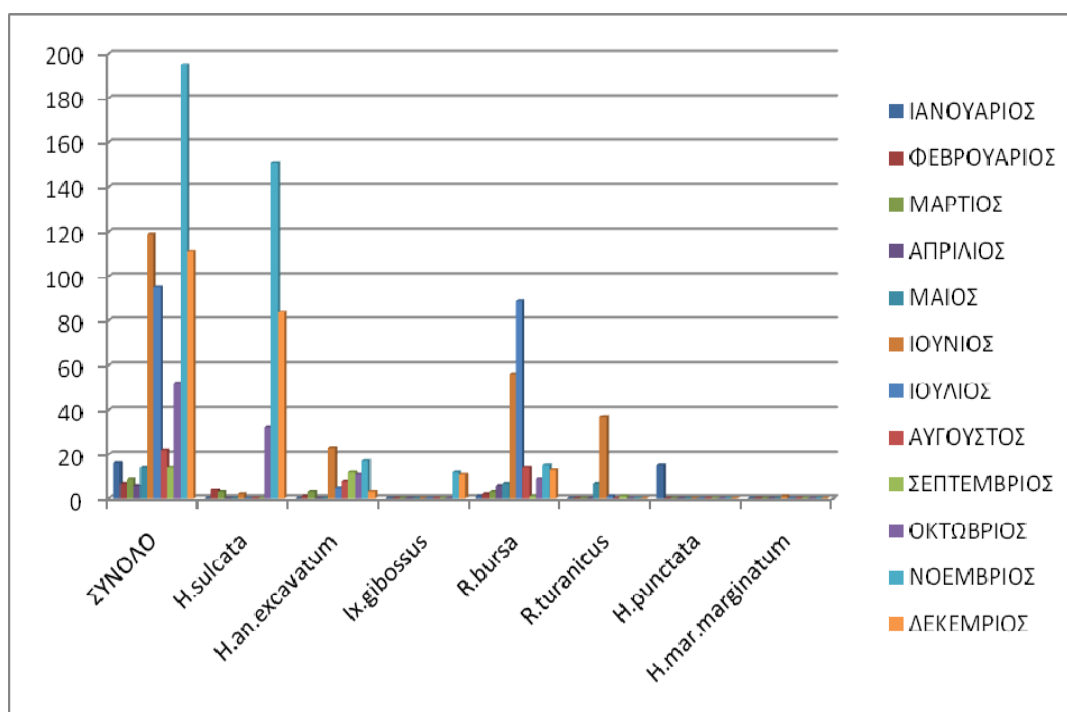


Χάρτης 4: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν τους σκύλους

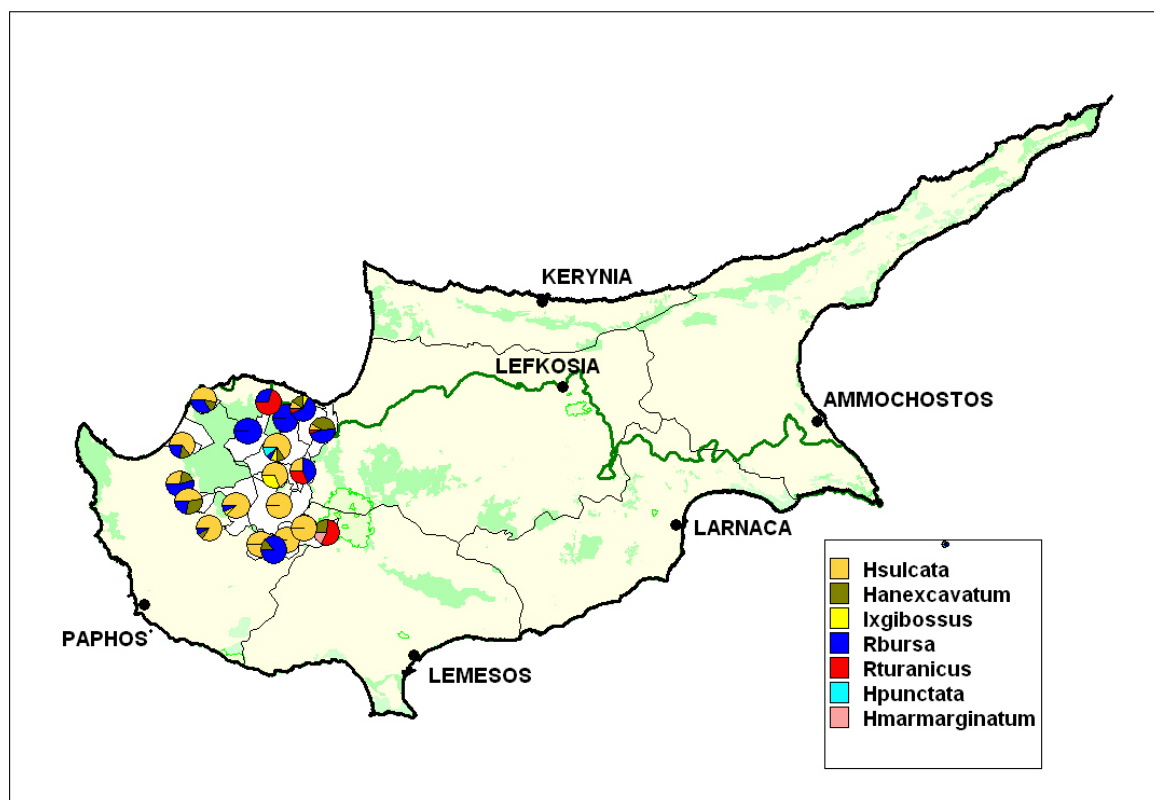
1.2. Παρασιτισμός από κρότωνες σε άγρια θηλαστικά και πτηνά

1.2.1. Παρασιτισμός στα αγρινά.

Από τα άγρια ζώα, τα αγρινά παρουσίασαν το ψηλότερο βαθμό παρασιτισμού. Σε σύνολο 660 κροτώνων που συλλέχθηκαν από αυτό το είδος ζώου, 276 ήσαν *Haemaphysalis sulcata*, 15 *Haemaphysalis punctata*, 216 *Rhipicephalus bursa*, 46 *Rhipicephalus turanicus*, 83 *Hyalomma anatolicum excavatum*, 1 *Hyalomma marginatum marginatum* και 23 *Ixodes gibossus*. Στο Γράφημα 5 δίδεται η εποχιακή κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν στα αγρινά και στο χάρτη 5 η γεωγραφική κατανομή τους.



Γράφημα 5: Εποχιακή κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν στα αγρινά

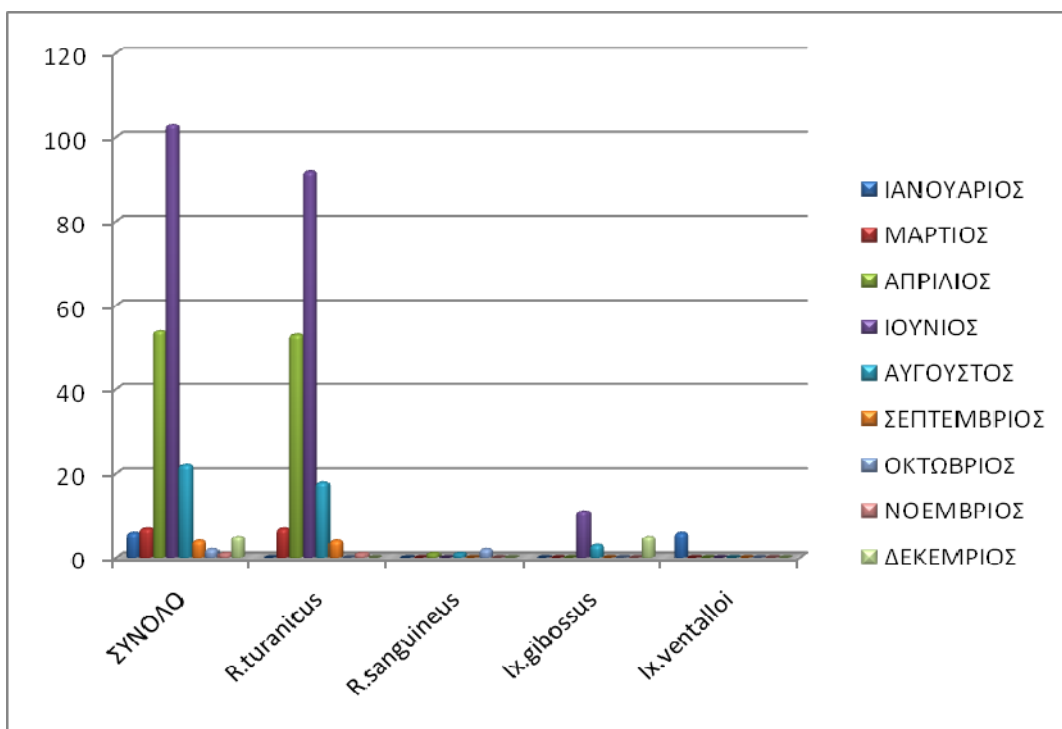


Χάρτης 5: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν στα αγρινά

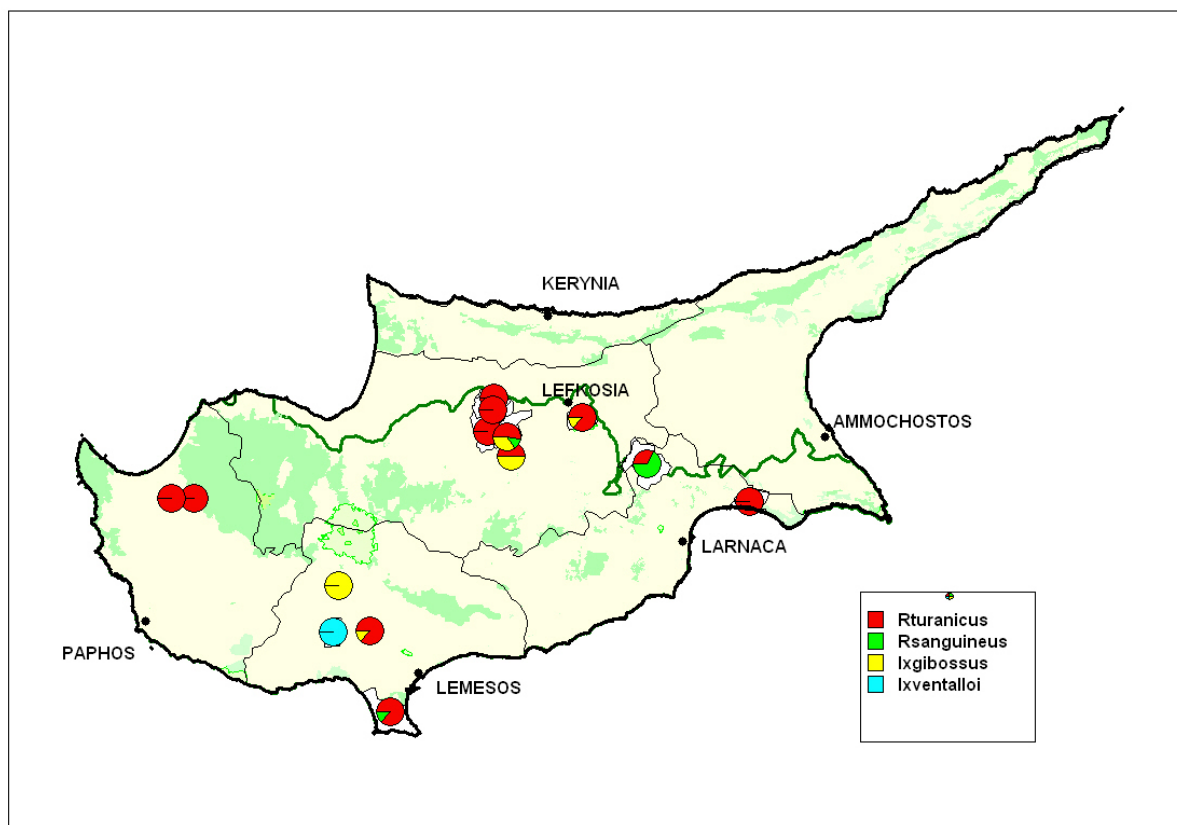
1.2.2. Παρασιτισμός των αλεπούδων.

Από τις αλεπούδες συλλέχτηκαν 204 κρότωνες οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ως ακολούθως: 4 *Rhipicephalus sanguineus*, 175 *Rhipicephalus turanicus*, 19 *Ixodes gibossus* και 6 *Ixodes ventalloi*.

Στο Γράφημα 6 δίδεται η εποχιακή κατανομή των κροτώνων στις αλεπούδες και στο χάρτη 6 η γεωγραφική κατανομή τους.



Γράφημα 6: Εποχιακή κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν στις αλεπούδες

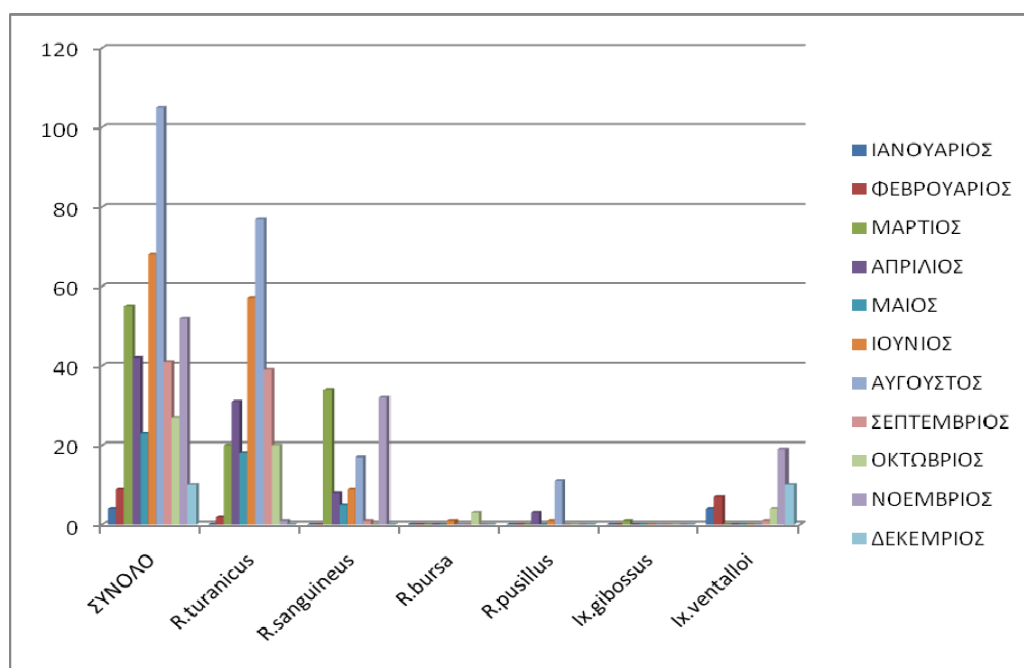


Χάρτης 6: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν στις αλεπούδες.

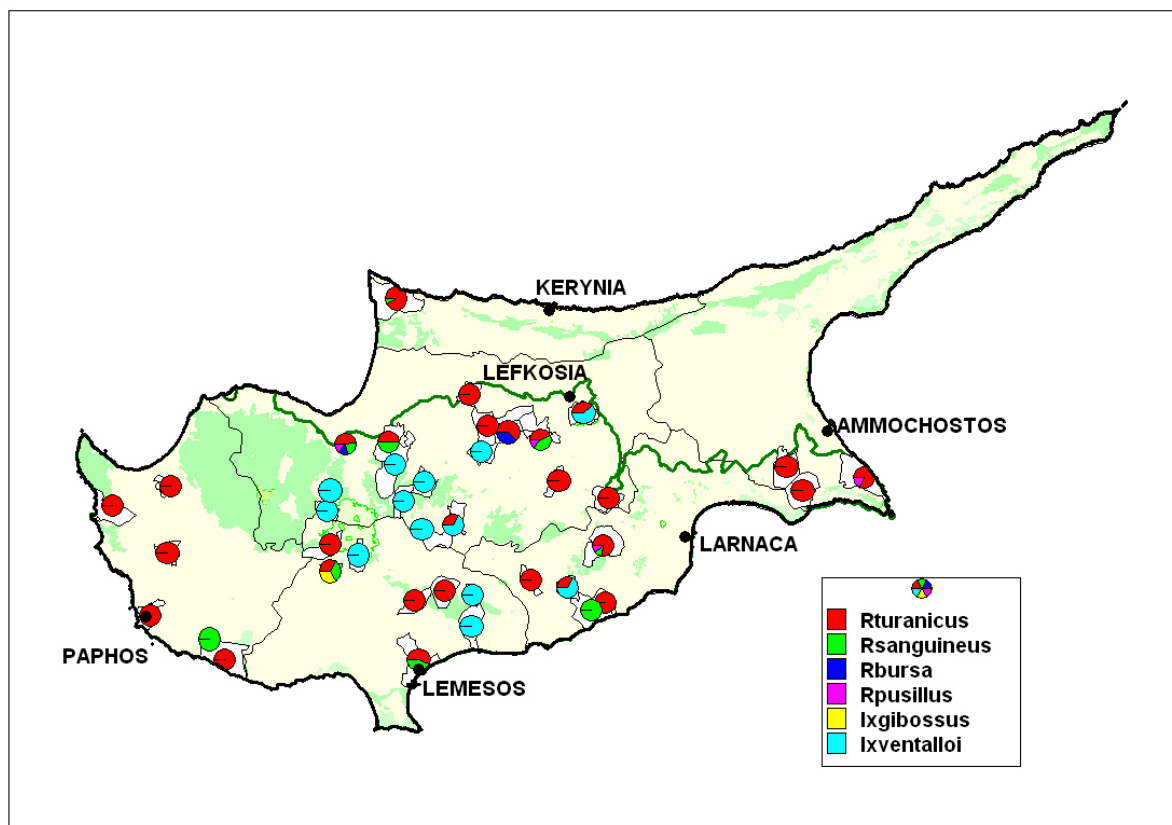
1.2.3. Παρασιτισμός των λαγών.

Από τους λαγούς συλλέχθηκαν 436 κρότρες οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ως ακολούθως: 106 *Rhipicephalus sanguineus*, 4 *Rhipicephalus bursa*, 265 *Rhipicephalus turanicus*, 15 *Rhipicephalus pusillus*, 1 *Ixodes gibbosus* και 45 *Ixodes ventraloi*.

Στο Γράφημα 7 δίδεται η εποχιακή κατανομή των κροτώνων στις αλεπούδες και στο χάρτη 7 η γεωγραφική κατανομή τους.



Γράφημα 7: Εποχιακή κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν στους λαγούς



Χάρτης 7: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν στους λαγούς.

1.2.4. Παρασιτισμός των πτηνών.

Από τα πτηνά, συλλέχτηκαν μόνο 15 κρότωνα από πέρδικες και ανήκαν όλοι στο είδος *Ixodes ventalloi*. Οι κρότωνα αυτοί συλλέχτηκαν τους μήνες Φεβρουάριο από την επαρχία Λεμεσού και Νοέμβριο από την επαρχία Πάφου.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Μετά τον προσδιορισμό του στατιστικά σημαντικού δείγματος, προγραμματίστηκαν και πραγματοποιήθηκαν οργανωμένες δειγματοληψίες οι οποίες αφορούσαν συλλογή αντιπροσωπευτικού τυχαίου δείγματος ορών αιγών, προβάτων, βοοειδών και σκύλων από κτηνοτροφικές μονάδες σε όλη την Κύπρο.

Η επιλογή των εκτροφών καθώς και των ατόμων (ζώων), μεμονωμένα από τα οποία θα λαμβάνετο δείγμα, έγινε τυχαία. Συγκεκριμένα από τον κατάλογο-μητρώο εκτροφών που τηρούν οι Κτηνιατρικές Υπηρεσίες, με κλήρωση επιλέγηκαν πρώτα οι περιοχές δειγματοληψίας και στη συνέχεια με δεύτερη κλήρωση οι συγκεκριμένες εκτροφές ζώων από τις οποίες θα λαμβάνονταν τα δείγματα (64 εκτροφές αιγοπροβάτων από αντίστοιχο αριθμό περιοχών και 34 εκτροφές βοοειδών από 28 περιοχές, κατανεμημένες στις 5 επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου σύμφωνα με την κατανομή του ζωικού πληθυσμού σε αυτές και σύμφωνα πάντα με το εξαγχθέν στατιστικό δείγμα).

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από το Μάρτιο του 2005 μέχρι το Δεκέμβριο του 2006 και έγιναν από 10 τυχαία επιλεγμένα ζώα από κάθε κτηνοτροφική μονάδα, αποδίδοντας συνολικά ένα αντιπροσωπευτικό τυχαίο δείγμα ορών από 1017 παραγωγικά ζώα. Συγκεκριμένα λήφθηκαν δείγματα από 346 αίγες, 333 πρόβατα και 338 βοοειδή (πίνακας Α, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ).

Έγινε επίσης αιμοληψία από 139 σκύλους.

Τέλος ο ορολογικός έλεγχος αφορούσε και τη λήψη δειγμάτων από τους ιδιοκτήτες ή/και μέλη των οικογενειών τους, τα οποία εργάζονταν στις φάρμες από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα από τα ζώα.

Τα αποτελέσματα του ορολογικού ελέγχου έναντι των υπό μελέτη παθογόνων και για κάθε είδος ζώου ξεχωριστά καθώς και για τους ιδιοκτήτες των ζώων, φαίνονται στους πίνακες 4-8 και στους χάρτες 8-21.

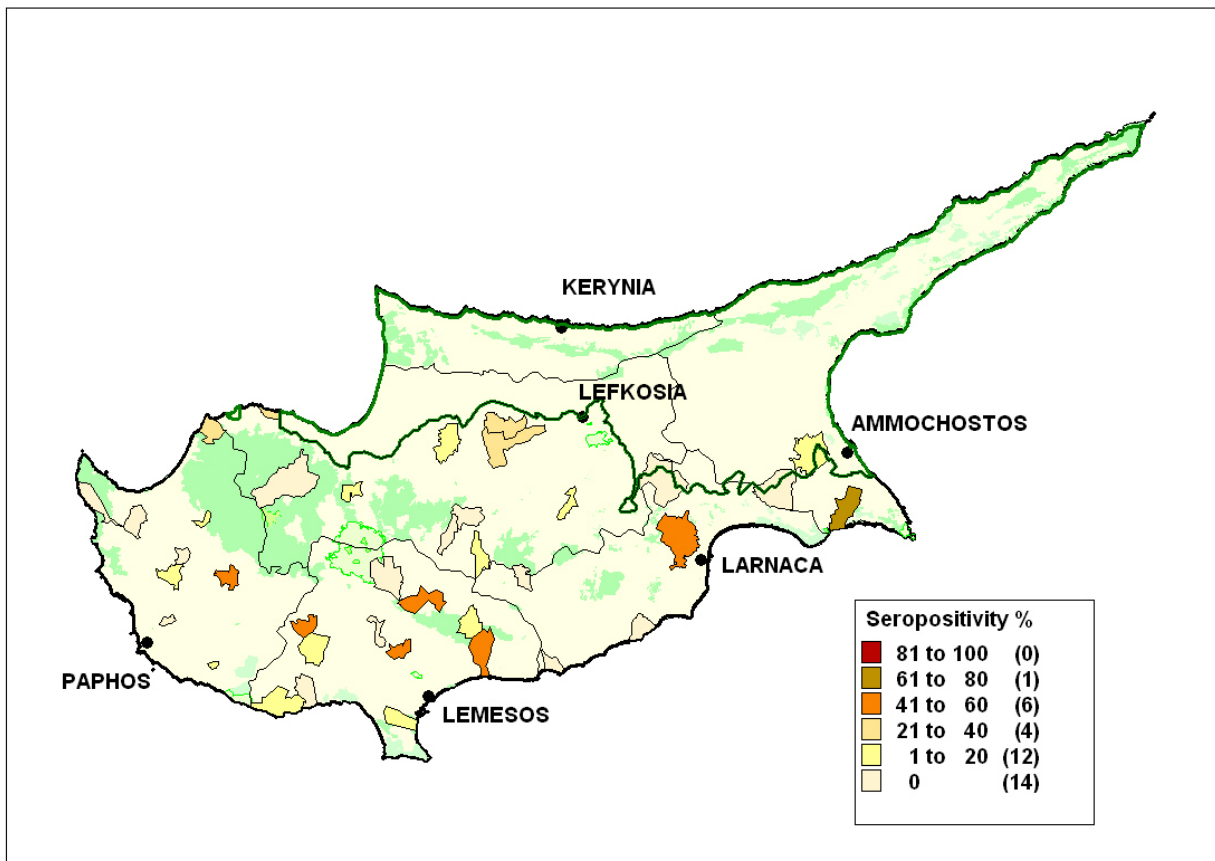
2.1. Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων έναντι του *A. phagocytophilum*

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4, σε σύνολο δείγματος 1017 ζώων που ελέγχθηκαν, 357 (35%) βρέθηκαν θετικά στα IgG αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum*. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων ειδών ζώων ($p < 0,001$), με τα βοοειδή να έχουν υψηλότερη οροθετικότητα (57%) σε σχέση με τα πρόβατα (30%) και τις αίγες (18%).

	Είδος ζώου											
	Σύνολο			Αίγες			Πρόβατα			Βοοειδή		
Επαρχία	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%
Λευκωσία	310	89	29	107	18	17	75	14	19	128	57	45
Λεμεσός	158	59	37	97	25	26	41	16	39	20	18	90
Λάρνακα	301	121	40	42	3	7	109	27	25	150	91	61
Αμμόχωστος	102	53	52	16	8	50	56	21	38	30	24	80
Πάφος	146	35	24	84	10	12	52	21	40	10	4	40
Σύνολο	1017	357	35	346	64	18	333	99	30	338	194	57

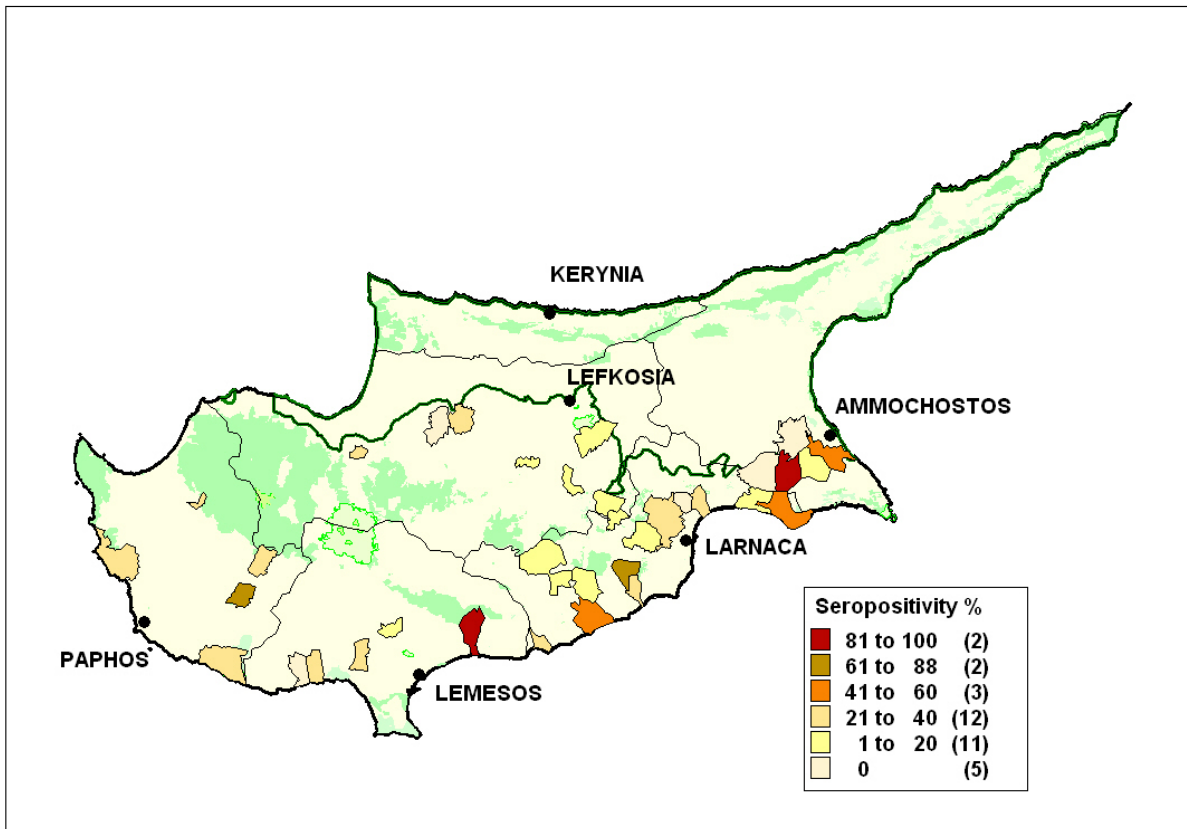
Πίνακας 4: Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων στις 5 επαρχίες της Κύπρου για αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* (cut-off: IgG \geq 1/100).

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά τις αίγες, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0,001$) στην οροθετικότητα μεταξύ των επαρχιών. Στην Αμμόχωστο, η οροθετικότητα είναι υψηλότερη (50%) από όλες τις άλλες επαρχίες, ενώ επιπλέον ο επιπολασμός είναι υψηλότερος στη Λεμεσό σε σχέση με τη Λάρνακα και την Πάφο. Στο χάρτη 8 γίνεται αναλυτική παρουσίαση της γεωγραφικής κατανομής της οροθετικότητας έναντι του *A. phagocytophilum* των περιοχών από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα από αίγες.



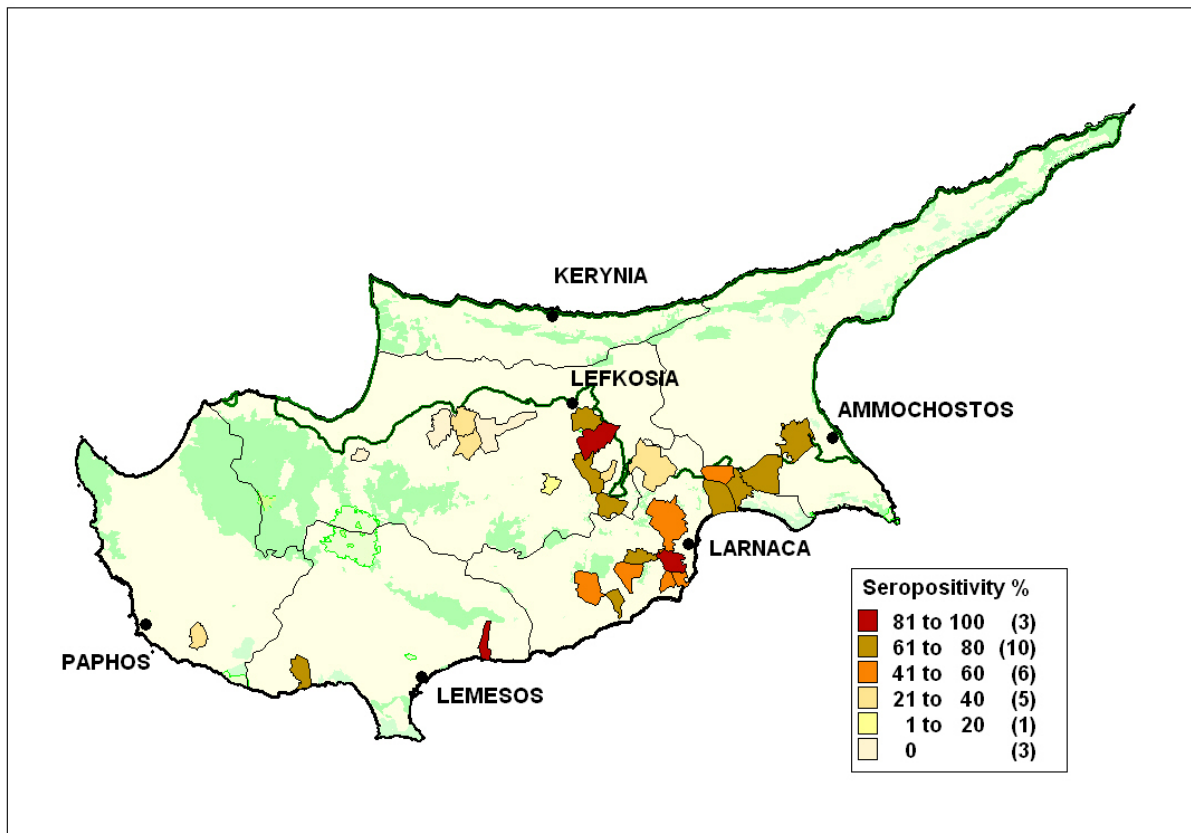
Χάρτης 8: Οροθετικότητα στις αίγες έναντι του *Anaplasma phagocytophilum*

Αναφορικά με τα δείγματα των προβάτων που ελέγχθηκαν, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επαρχιών σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p=0,018$) στα IgG αντισώματα έναντι του *Anaplasma phagocytophilum*. Οι διαφορές εντοπίζονται μεταξύ της Λευκωσίας με όλες τις επαρχίες της Κύπρου πλην της Λάρνακας. Αυτό δείχνει ότι η Λευκωσία έχει στατιστικά χαμηλότερη οροθετικότητα (19%) στα πρόβατα σε σχέση με τις άλλες τρεις επαρχίες (38%-40%). Η Λάρνακα από την άλλη έχει, σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%, χαμηλότερη οροθετικότητα σε σύγκριση με την Πάφο. Να σημειωθεί όμως ότι σε επίπεδο εμπιστοσύνης 99% δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα των προβάτων μεταξύ των πέντε επαρχιών της Κύπρου. Στο χάρτη 9 γίνεται αναλυτική παρουσίαση της γεωγραφικής κατανομής της οροθετικότητας έναντι του *A. phagocytophilum* των περιοχών από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα από πρόβατα.



Χάρτης 9: Οροθετικότητα στα πρόβατα έναντι του *Anaplasma phagocytophilum*.

Στην περίπτωση των βοοειδών υπάρχει και πάλι στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επαρχιών σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0,001$). Στα μεγάλα αυτά μηρυκαστικά υπάρχει διαφορά στην οροθετικότητα μεταξύ όλων σχεδόν των επαρχιών της Κύπρου. Οι μόνες επαρχίες που δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά (σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%), είναι η Πάφος με τη Λευκωσία και τη Λάρνακα, καθώς και η Λεμεσός με την Αμμόχωστο. Οι δύο τελευταίες έχουν στατιστικά τον υψηλότερο επιπολασμό του *Anaplasma phagocytophilum* στα βοοειδή (90% η Λεμεσός και 80% η Αμμόχωστος). Στο χάρτη 10 γίνεται αναλυτική παρουσίαση της γεωγραφικής κατανομής της οροθετικότητας έναντι του *A. phagocytophilum* των περιοχών από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα από βοοειδή.



Χάρτης 10: Οροθετικότητα στα Βοοειδή έναντι του *Anaplasma phagocytophilum*

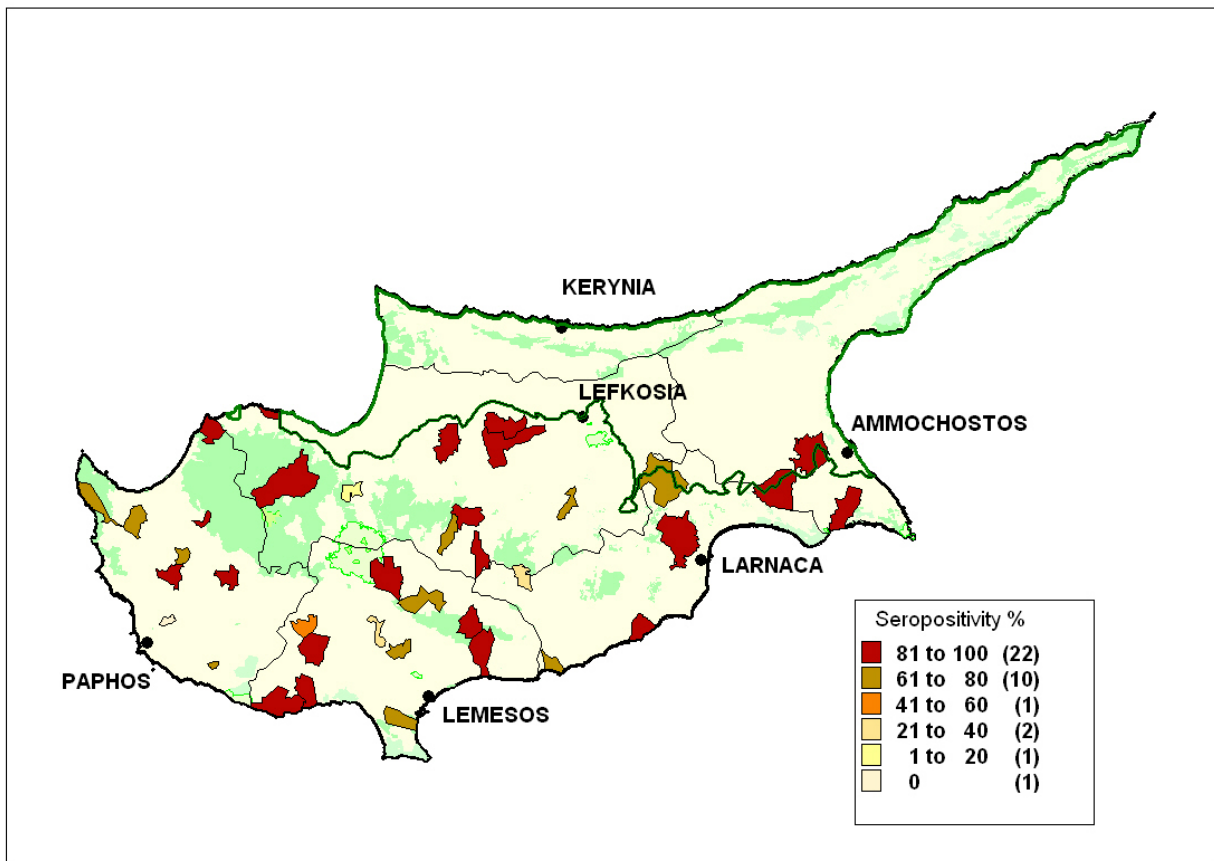
2.2. Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων έναντι της *R. conorii*

Από τον Πίνακα 5, φαίνεται ότι σε σύνολο δείγματος 1017 ζώων που ελέγχθηκαν, 689 (68%) βρέθηκαν θετικά στα IgG αντισώματα έναντι της *R. conorii*. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% μεταξύ των τριών ειδών ζώων ($p < 0,001$), με τις αίγες (82%) και τα πρόβατα (75%) να έχουν υψηλότερη οροθετικότητα σε σχέση με τα βοοειδή (46%). Να σημειωθεί όμως ότι οι αίγες με τα πρόβατα έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα αντισώματα έναντι της *R. conorii* σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και όχι σε επίπεδο εμπιστοσύνης 99% ($p = 0,025$).

	Είδος ζώου											
	Σύνολο			Αίγες			Πρόβατα			Βοοειδή		
Επαρχία	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%
Λευκωσία	310	211	68	107	96	90	75	45	60	128	70	55
Λεμεσός	158	121	77	97	76	78	41	34	83	20	11	55
Λάρνακα	301	183	61	42	32	76	109	92	84	150	59	39
Αμμόχωστος	102	54	53	16	16	100	56	33	59	30	5	17
Πάφος	146	120	82	84	65	77	52	45	87	10	10	100
Σύνολο	1017	689	68	346	285	82	333	249	75	338	155	46

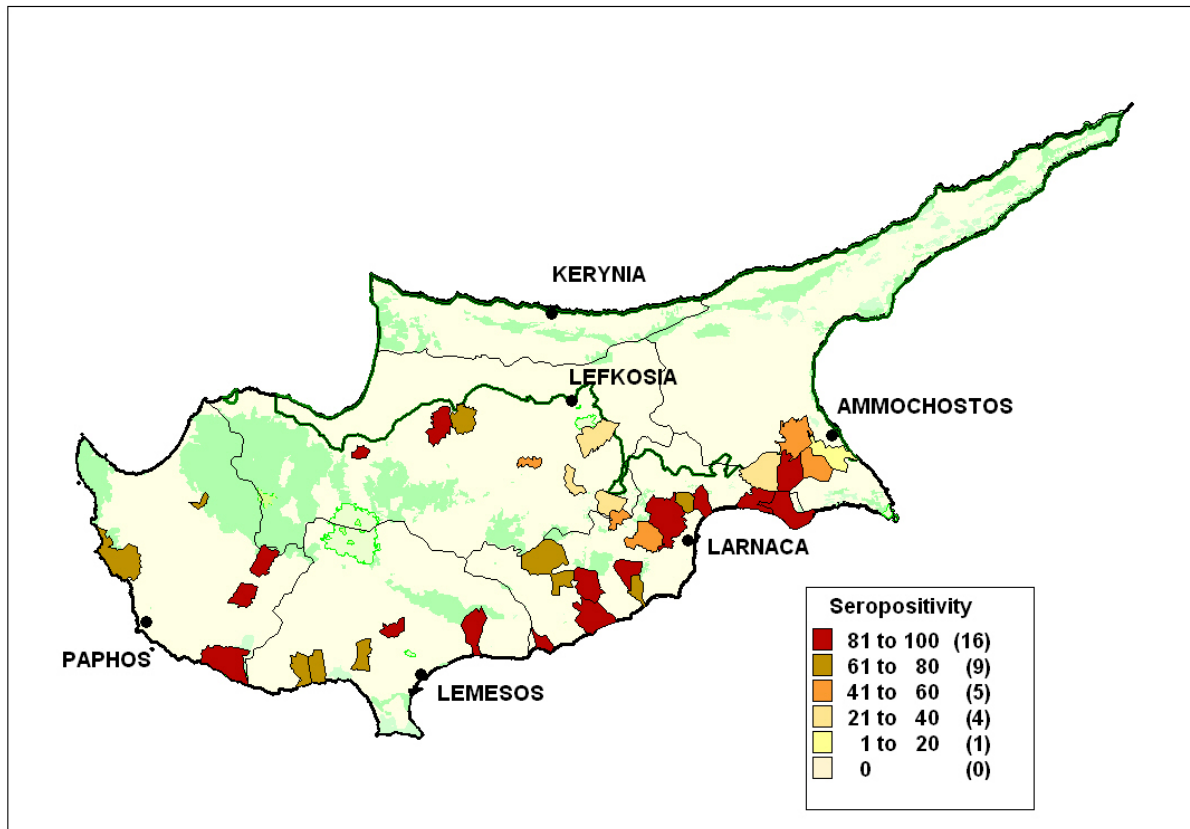
Πίνακας 5: Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων στις 5 επαρχίες της Κύπρου για αντισώματα έναντι της *R. conorii* (cut-off: IgG \geq 1/120).

Συνεχίζοντας την ανάλυση ανά είδος ζώου, παρατηρούμε ότι στις αίγες υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p=0,026$) στην οροθετικότητα μεταξύ των επαρχιών. Συγκεκριμένα, η Λευκωσία και η Αμμόχωστος έχουν στατιστικά υψηλότερο επιπολασμό σε σύγκριση με τις άλλες τρεις επαρχίες, οι οποίες δεν έχουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά. Να σημειωθεί όμως ότι σε επίπεδο εμπιστοσύνης 99% δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πέντε επαρχιών της Κύπρου. Στο χάρτη 11 γίνεται αναλυτική παρουσίαση της γεωγραφικής κατανομής της οροθετικότητας έναντι της *R. conorii* των περιοχών από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα από αίγες.



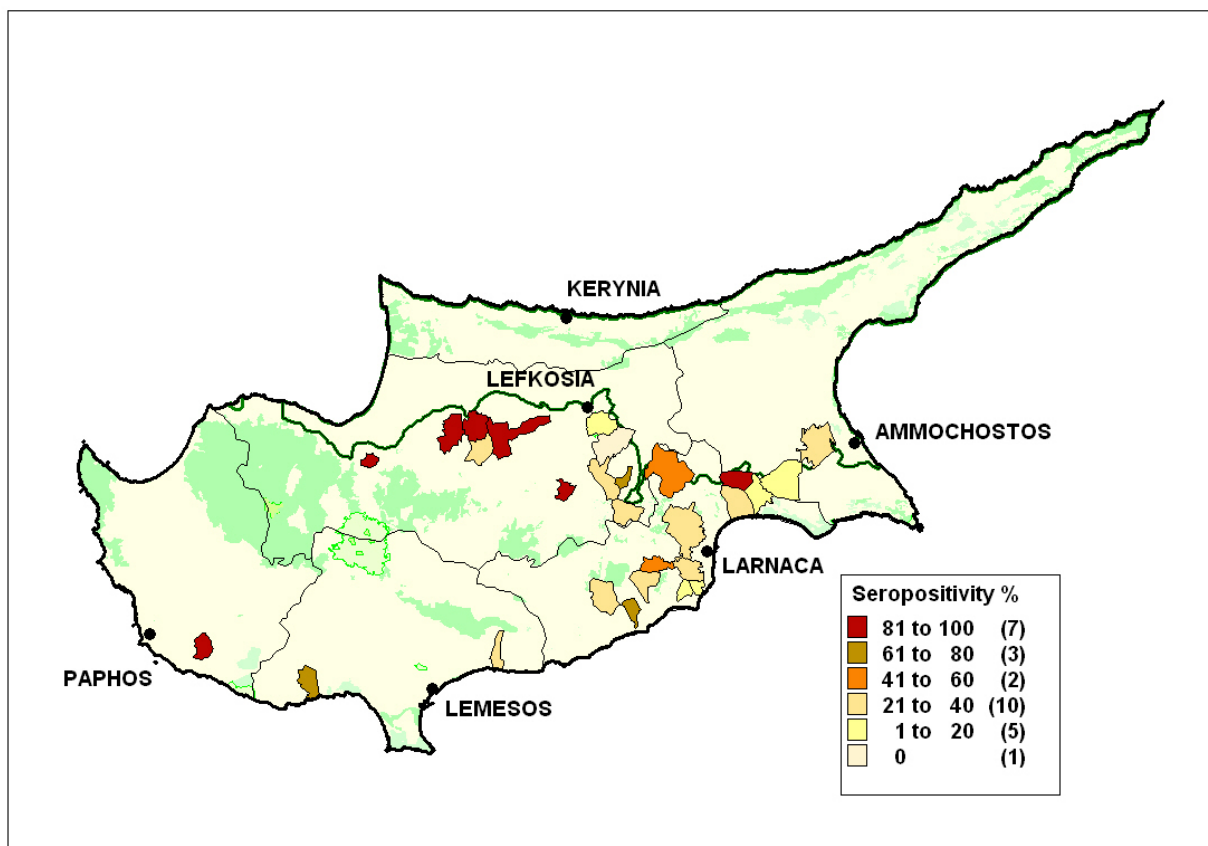
Χάρτης 11: Οροθετικότητα στις αίγες έναντι της *R. conorii*

Όσον αφορά τα δείγματα των προβάτων που ελέγχθηκαν, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επαρχιών σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0,001$) στα IgG αντισώματα έναντι της *R. conorii*. Οι διαφορές που εντοπίζονται είναι, όπως και στην περίπτωση των αιγών, μεταξύ της Λευκωσίας και της Αμμοχώστου με τις τρεις άλλες επαρχίες της Κύπρου. Έχει ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι ενώ στις αίγες η οροθετικότητα ήταν στατιστικά υψηλότερη στη Λευκωσία και στην Αμμόχωστο, στα πρόβατα η οροθετικότητα είναι στατιστικά χαμηλότερη σε αυτές τις δύο επαρχίες. Η Λεμεσός, η Λάρνακα και η Πάφος δεν έχουν και πάλι στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Στο χάρτη 12 γίνεται αναλυτική παρουσίαση της γεωγραφικής κατανομής της οροθετικότητας έναντι της *R. conorii* των περιοχών από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα από πρόβατα.



Χάρτης 12: Οροθετικότητα στα πρόβατα έναντι της *R. conorii*

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επαρχιών υπάρχει και στα βοοειδή σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0,001$). Πιο συγκεκριμένα η Αμμόχωστος και η Πάφος έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ τους όσο και με τις άλλες τρεις επαρχίες στα αντισώματα έναντι της *R. conorii* (σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%). Η μεν Αμμόχωστος έχει στατιστικά τη χαμηλότερη οροθετικότητα, η δε Πάφος έχει στατιστικά την υψηλότερη οροθετικότητα. Επιπλέον, ο επιπολασμός της *R. conorii* είναι στατιστικά διαφορετικός μεταξύ της Λάρνακας και της Λευκωσίας. Στο χάρτη 13 γίνεται αναλυτική παρουσίαση της γεωγραφικής κατανομής της οροθετικότητας έναντι της *R. conorii* των περιοχών από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα από βοοειδή.



Χάρτης 13: Οροθετικότητα στα βοοειδή έναντι της *R. conorii*.

2.3. Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων έναντι της *C. burnetii*

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 6, σε σύνολο δείγματος 1017 ζώων που ελέγχθηκαν, 697 (69%) βρέθηκαν θετικά στα IgG αντισώματα έναντι της *C. burnetii*.

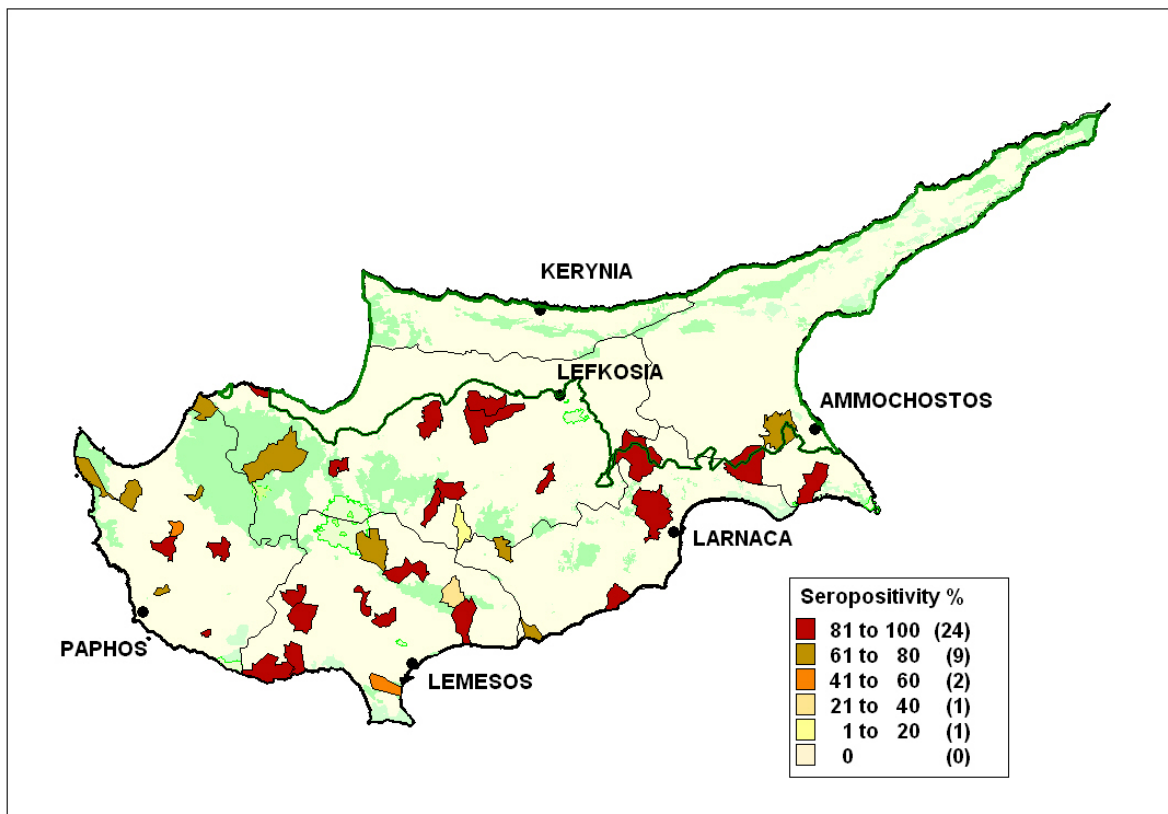
Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μικρών μηρυκαστικών (αίγες και πρόβατα) με τα βοοειδή ($p < 0,001$) και όπως προκύπτει από το δείγμα τα μεγάλα μηρυκαστικά έχουν χαμηλότερη οροθετικότητα (40%) σε σχέση με τις αίγες (84%) και τα πρόβατα (81%). Τα μικρά μηρυκαστικά δεν έχουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα ($p = 0,262$).

	Είδος ζώου											
	Σύνολο			Αίγες			Πρόβατα			Βοοειδή		
Επαρχία	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%	Δείγμα	Θετικά	%
Λευκωσία	310	208	67	107	91	85	75	66	88	128	51	40
Λεμεσός	158	123	78	97	81	84	41	35	85	20	7	35
Λάρνακα	301	192	64	42	38	90	109	92	84	150	62	41
Αμμόχωστος	102	71	70	16	14	88	56	46	82	30	11	37
Πάφος	146	103	71	84	68	81	52	30	58	10	5	50
Σύνολο	1017	697	69	346	292	84	333	269	81	338	136	40

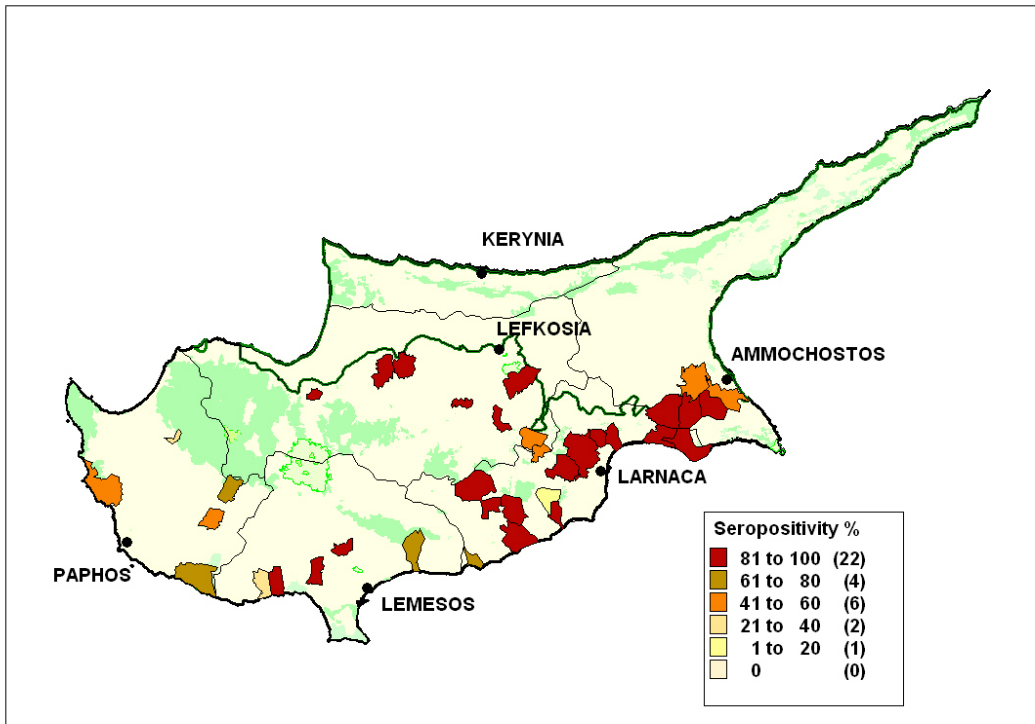
Πίνακας 6: Ορολογικός έλεγχος των παραγωγικών ζώων στις 5 επαρχίες της Κύπρου για αντισώματα έναντι της *C. burnetii* (cut-off: IgG \geq 1/120).

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά στις αίγες, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,712$) στον επιπολασμό μεταξύ των επαρχιών. Το ίδιο ισχύει και για τα βοοειδή ($p=0,931$). Το μόνο από τα τρία είδη ζώων που έχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επαρχιών είναι τα πρόβατα ($p<0,001$). Βέβαια, αν επεξεργαστούμε το δείγμα των προβάτων παρατηρούμε ότι η διαφορά οφείλεται μόνο στην στατιστικά χαμηλή οροθετικότητα που έχουν τα πρόβατα στην Πάφο (58%) σε σχέση με τις άλλες επαρχίες της Κύπρου (82%-88%). Στις υπόλοιπες τέσσερις επαρχίες δεν υπάρχει μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά στον επιπολασμό.

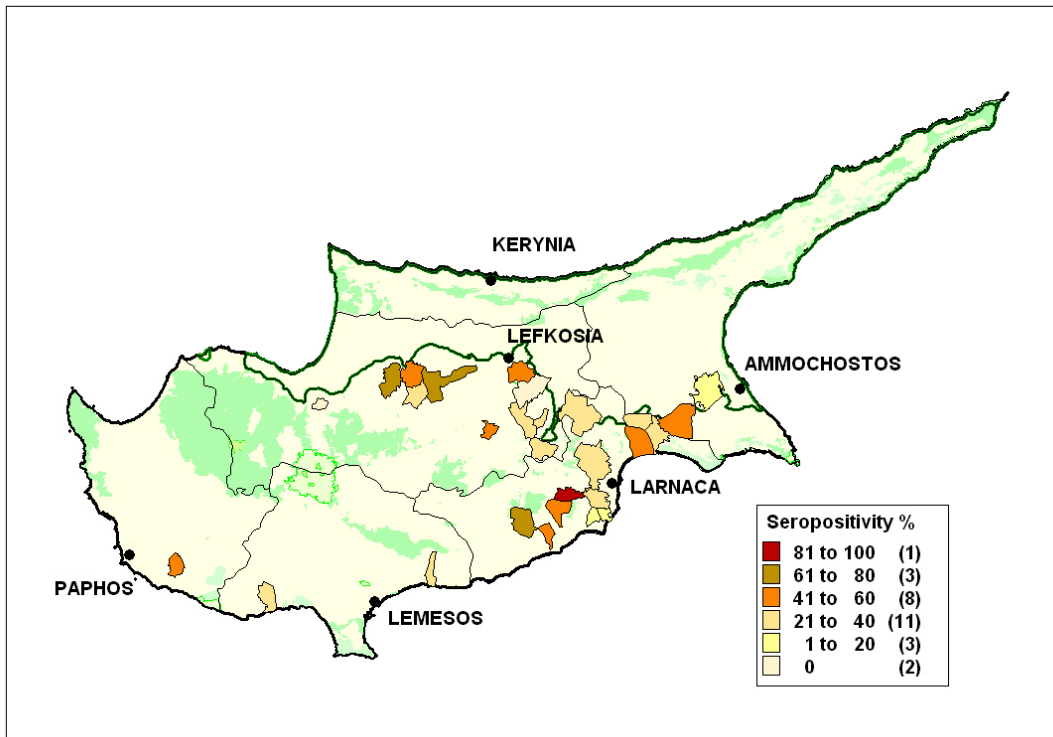
Στους χάρτες 14-16 γίνεται αναλυτική παρουσίαση της γεωγραφικής κατανομής της οροθετικότητας έναντι της *R. conorii* των περιοχών από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα από τις αίγες, τα πρόβατα και τα βοοειδή αντίστοιχα.



Χάρτης 14: Οροθετικότητα στις αίγες έναντι της *C. burnetii*



Χάρτης 15: Οροθετικότητα στα πρόβατα έναντι της *C. burnetii*



Χάρτης 16: Οροθετικότητα στα βοειδή έναντι της *C. burnetii*.

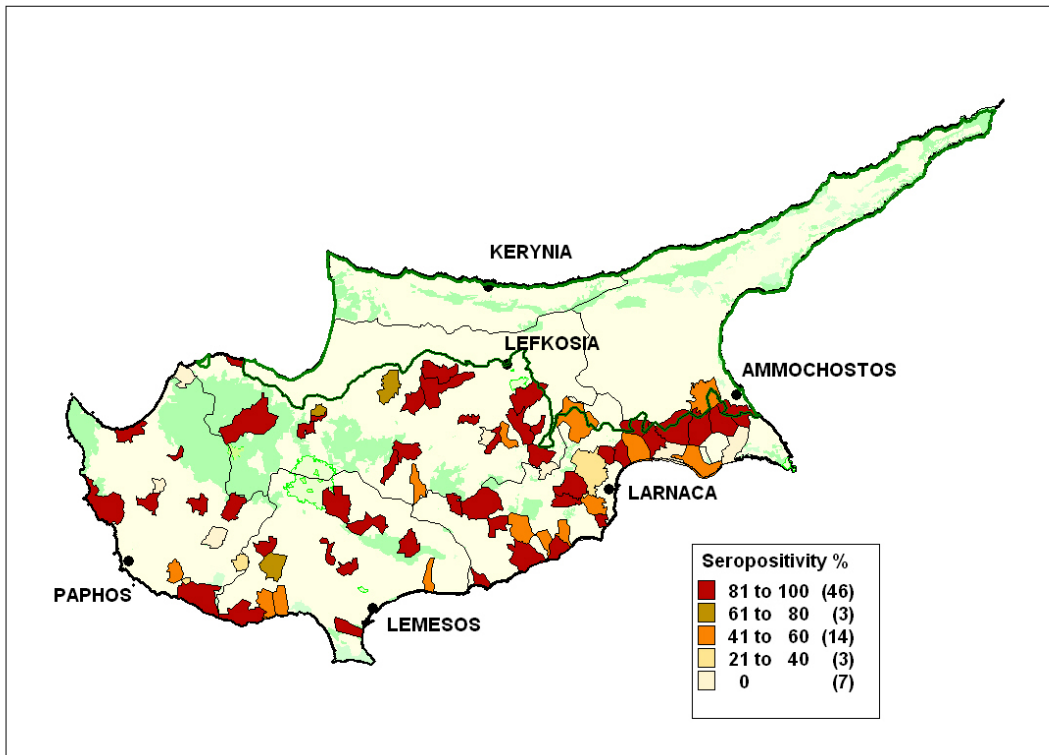
2.4. Ορολογικός έλεγχος των σκύλων

Από τα 139 δείγματα σκύλων που ελέχθηκαν, τα 105 (75,5%) βρέθηκαν θετικά για IgG αντισώματα έναντι της *R. conorii* με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Λευκωσίας (87%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Πάφου (62,5%).

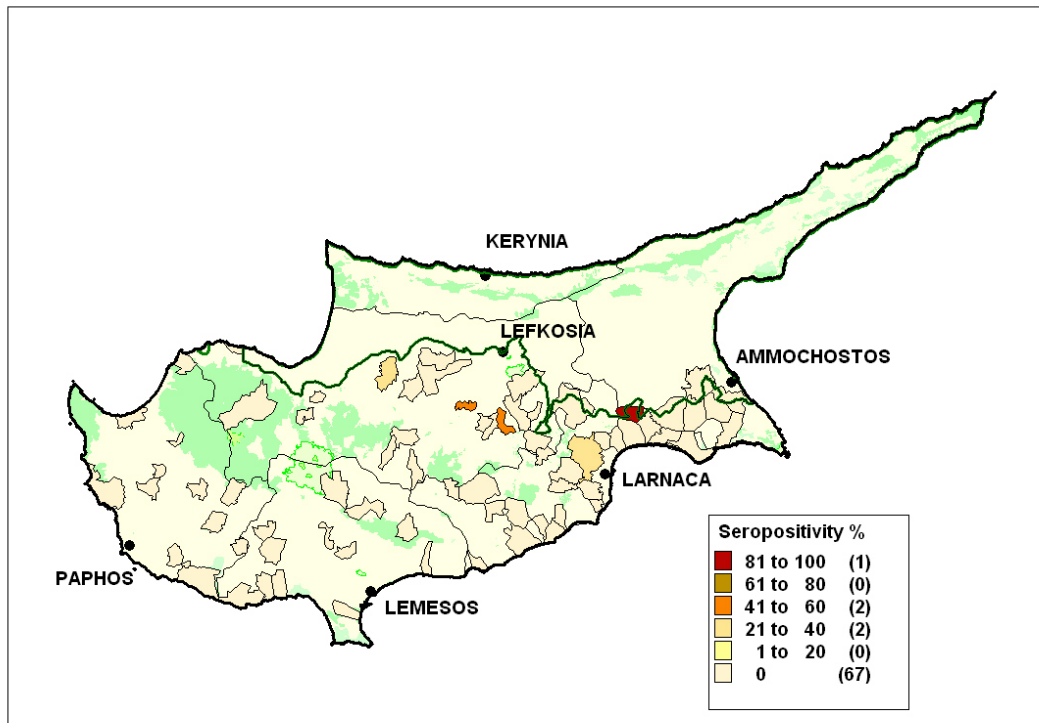
Η ορολογική διερεύνηση έναντι της *C. burnetii* ανέδειξε μόνο 5 θετικά δείγματα (3,59%), με τις επαρχίες Λεμεσού, Αμμοχώστου και Πάφου να εμφανίζουν μηδενικό επιπολασμό (πίνακας 7).

Περιοχή	Αρ. δειγμάτων	<i>Rickettsia conorii</i>		<i>Coxiella burnetii</i>	
		θετικά	%	θετικά	%
Αμμόχωστος	12	9	75	0	0
Λάρνακα	40	28	70	2	5
Λεμεσός	24	19	79	0	0
Λευκωσία	39	34	87	3	7.5
Πάφος	24	15	62.5	0	0
Σύνολο	139	105	75.5	5	3.5

Πίνακας 7: Ορολογικός έλεγχος των σκύλων στις 5 επαρχίες για αντισώματα έναντι της *Rickettsia conorii* και της *Coxiella burnetii*.



Χάρτης 17: Οροθετικότητα των σκύλων έναντι της *R. conorii*



Χάρτης 18: Οροθετικότητα των σκύλων έναντι της *C. burnetii*

2.5. Ορολογικός έλεγχος στους κτηνοτρόφους.

Από τα 187 δείγματα που ελέχθηκαν, τα 127 (68%) βρέθηκαν θετικά για IgG αντισώματα έναντι της *C. burnetii* με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Αμμοχώστου (89%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Λευκωσίας (53%).

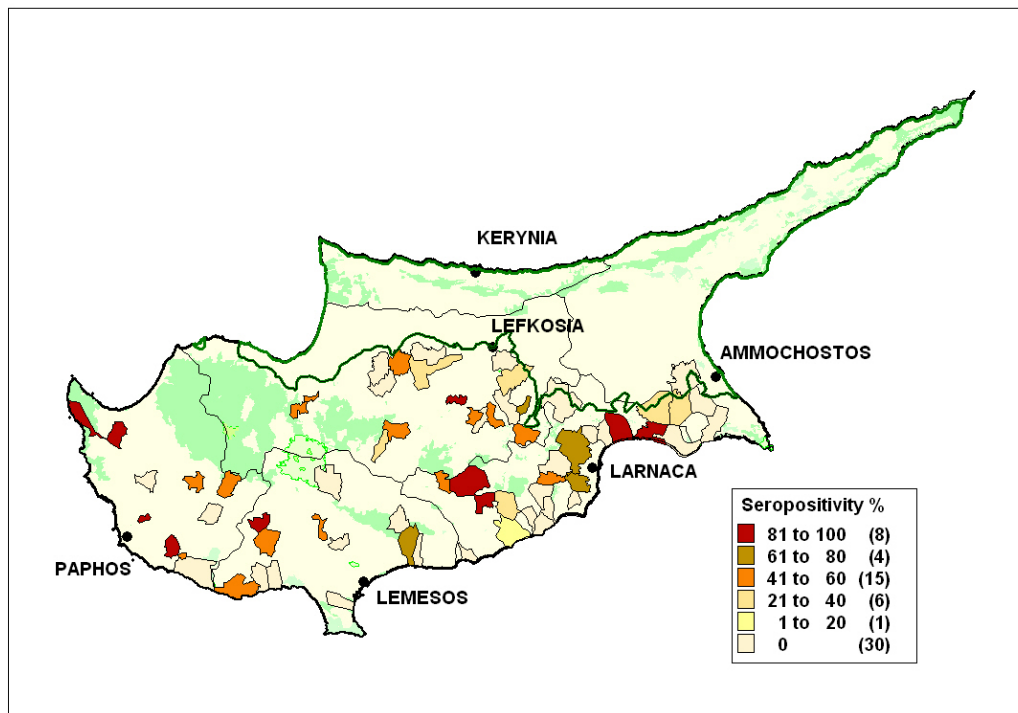
Η ορολογική διερεύνηση έναντι της *R. conorii* ανέδειξε από τα 187 δείγματα που εξετάστηκαν, 62 θετικά, δηλαδή οροθετικότητα της τάξης του 33%, με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Λάρνακας (51%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Πάφου (16%).

Τέλος, από τα 187 δείγματα που ελέχθηκαν, τα 58 (31%) βρέθηκαν θετικά για IgG αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Πάφου (58%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Λάρνακας (24%).

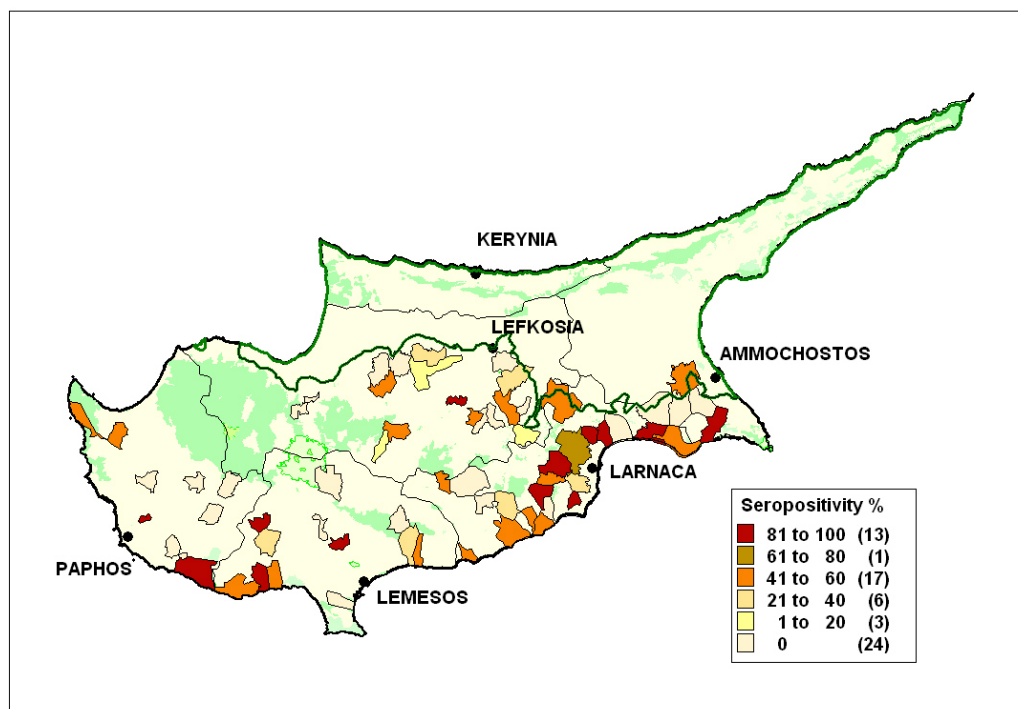
Τα αποτελέσματα του ορολογικού ελέγχου στον ανθρώπινο πληθυσμό, παρουσιάζονται στον πίνακα 8 και στους χάρτες 19-21.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	<i>C. burnetii</i>		<i>R. conorii</i>		<i>A. phagocytophilum</i>	
		Θετικά	%	Θετικά	%	Θετικά	%
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	57	30	53	13	23	15	26
ΛΕΜΕΣΟΣ	26	16	62	9	35	10	38
ΛΑΡΝΑΚΑ	67	49	73	34	51	16	24
ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΣ	18	16	89	3	17	6	33
ΠΑΦΟΣ	19	16	84	3	16	11	58
ΣΥΝΟΛΟ	187	127	68	62	33	58	31

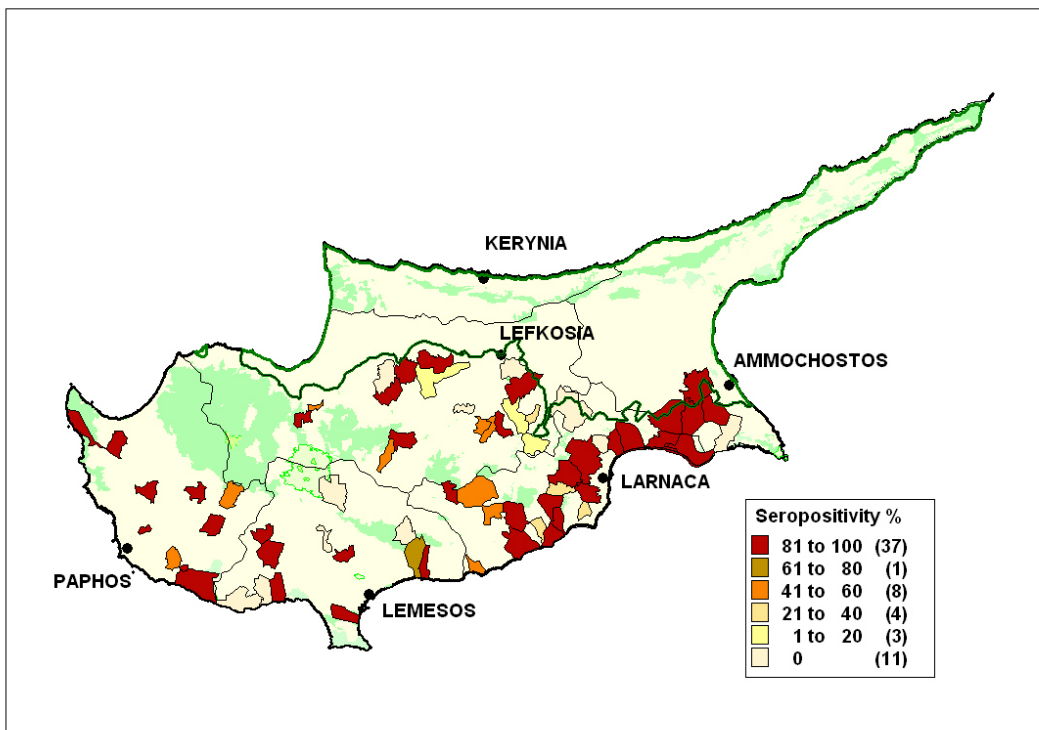
Πίνακας 8: Ορολογικός έλεγχος ανθρώπινου πληθυσμού.



Χάρτης 19: Οροθετικότητα έναντι του *Anaplasma Phagocytophilum* σε δείγμα ανθρώπινου πληθυσμού



Χάρτης 20: Οροθετικότητα έναντι της *R. conorii* σε δείγμα ανθρώπινου πληθυσμού



Χάρτης 21: Οροθετικότητα έναντι της *C. burnetii* σε δείγμα ανθρώπινου πληθυσμού

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

Ο εργαστηριακός έλεγχος των κροτώνων έγινε κατεξοχήν με τη μέθοδο της PCR. Με την ίδια τεχνική εξετάστηκαν επίσης τα δείγματα ολικού αίματος (Λευκές Στοιβάδες), που λήφθηκαν από τα παραγωγικά και κατοικίδια ζώα καθώς και τα 910 δείγματα αίματος σε φίλτρο τα οποία λήφθηκαν από άγρια ζώα και τα οποία προέρχονταν από 3 είδη θηλαστικών (αγρινό, αλεπού, λαγός) και 51 είδη πτηνών (πίνακας Β ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ).

Θα πρέπει να επαναλάβουμε εδώ ότι ενώ η αρχική πρόβλεψη ήταν να ελεγχθούν τα φίλτρα με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού, τελικά ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR και τούτο γιατί δεν βρέθηκαν τα σεσημασμένα αντι-αντισώματα (Fluorescein conjugated), έναντι των άγριων ζώων, αφού δεν κυκλοφορούν στο εμπόριο. Το γεγονός αυτό μάλλον απέβη προς όφελος της έρευνας, γιατί με αυτό τον τρόπο εξέτασης των δειγμάτων έχουν ανιχνευτεί νέα είδη Ρικετσιών, κάτι το οποίο ίσως να μην ήταν εφικτό με τον ορολογικό έλεγχο.

Στους πίνακες 9-13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου των πιο πάνω δειγμάτων με την τεχνική της PCR, ανά είδος δείγματος, ανά είδος ζώου και ανά παθογόνο.

3.1. Γονοτυπική ανίχνευση των παθογόνων σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές.

3.1.1. Δείγματα παραγωγικών ζώων .

Τα 1017 δείγματα ολικού αίματος, μετά από τη σχετική επεξεργασία όπως αυτή αναφέρθηκε στο κεφ. Μεθοδολογία, ανάλογα με την προέλευση και το είδος ζώου, ομαδοποιήθηκαν σε 78 pools.

Από τα 78 pools που εξετάστηκαν, τα 38 (49%) ήταν θετικά για τα αναπλάσματα, με τη θετικότητα να υπολογίζεται σε 56% στις αίγες και 51% στα πρόβατα (Πίνακας 9). Παρά την υψηλή οροθετικότητα στα βοοειδή, κανένα θετικό PCR δεν ανιχνεύθηκε σε αυτό το είδος.

Από όλα τα pools και για όλα τα είδη παραγωγικών ζώων δεν ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό τόσο των ρικετσιών, όσο και της *C. burnetii*.

Επαρχία	Είδος ζώου								
	Πρόβατα			Αίγες			Βοοειδή		
	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%
Λευκωσία	8	2	25	9	4	44	5	0	0
Λεμεσός	7	0	0	11	4	36	1	0	0
Λάρνακα	12	9	75	6	5	83	0	0	0
Πάφος	6	4	67	7	5	71	1	0	0
Αμμόχωστος	4	4	100	1	1	100	0	0	0
Σύνολο	37	19	51	34	19	56	7	0	0

Πίνακας 9: Ανίχνευση με PCR των Αναπλασμάτων στα δείγματα αίματος των παραγωγικών ζώων στις 5 επαρχίες της Κύπρου.

Η ανάλυση των αλληλουχιών των προϊόντων (amplicons) της PCR έδειξε ότι υπάρχουν έξι γενότυποι στην Κύπρο, για τους οποίους ορίστηκαν έξι κωδικοί (accession numbers) από την Genbank οι οποίοι ήταν: EU090186, EU090182, EU090181, EU090183, EU090184 και EU090185.

Ο γενότυπος 6 (EU090186) ταυτοποιήθηκε σαν *A. phagocytophilum* με ομοιότητα 100% (311/311) στα στελέχη (strains) DQ458808 (*A. phagocytophilum* strain ZJ-HGA) (Zhan και λοιποί), DQ449948 (*A. phagocytophilum* strain Jilin), DQ471287 (*A. phagocytophilum* strain-3) (Reeves) κι ανιχνεύθηκε μόνο στη Λεμεσό.

Ο γενότυπος 2 (EU090182) ταυτοποιήθηκε σαν *A. platys*, με ομοιότητα 100% (312/312) στα στελέχη (strains) EF139459 (*A. platys* 16s rRNA γονίδιο), AY530806 (*A. platys* 16s rRNA γονίδιο), AF303467 (*A. platys* 16s rRNA γονίδιο) κι ανιχνεύθηκε μόνο στη Λευκωσία.

Οι γενότυποι 1 (EU090181), 3 (EU090183), 4 (EU090184) 5 (EU090185) ταυτοποιήθηκαν σαν είδη των αναπλασμάτων (*Anaplasma* species) με 100% ομοιότητα στα στελέχη AJ633052 (*A. onis*, απομόνωση Chende), AJ633051 (*A. onis*, απομόνωση Zhangjiachuan), AJ633048 (*A. marginale*, απομόνωση Lushi), AF414869 (*A. centrale* από τη Νότια Αφρική) και AF414875 (*A. marginale* από το Ισραήλ).

Τα *A. phagocytophilum* και *A. platys* ανιχνεύθηκαν μόνο στις αίγες. Η κατανομή των γενοτύπων στις 5 επαρχίες και στα 3 είδη ζώων συνοψίζονται στον Πίνακα 9^α.

Γενοτύπος	Genbank accession number	Αλληλουχία	Λευκοσία	Λάρνακα	Λεμεσός	Πάφος	Αμμόχωστος	Αίγες	Πρόβατα
1	EU090181	A. sp.	√	√		√	√		√
2	EU090182	A. platys	√					√	
3	EU090183	A. sp.		√		√			√
4	EU090184	A. sp.		√		√	√	√	√
5	EU090185	A. sp.	√	√		√	√	√	√
6	EU090186	A. p.			√			√	

Πίνακας 9α: Κατανομή των γενοτύπων στις 5 επαρχίες και στα 2 είδη ζώων. A. sp: Anaplasma species, A. platys: Anaplasma platys, A. p.: Anaplasma phagocytophilum.

3.1.2. Δείγματα σκύλων.

Όσον αφορά τα δείγματα από σκύλους, συνολικά ελέγχθηκαν 139 δείγματα τα οποία προέρχονταν κυρίως από τις εκτροφές από τις οποίες πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από παραγωγικά ζώα και τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 13 pools.

Σε κανένα από αυτά τα δείγματα, δεν ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό κανενός από τα τρία υπό διερεύνηση παθογόνα.

3.1.3. Δείγματα άγριων θηλαστικών και πτηνών

Συνολικά ελέγχθηκαν 910 δείγματα αίματος (φίλτρα) από άγρια θηλαστικά και πτηνά. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR για την ανίχνευση των τριών παθογόνων, 247 δείγματα από λαγούς (ομαδοποιημένα σε 31 pools), 32 δείγματα από αλεπούδες (ομαδοποιημένα σε 10 pools), 557 δείγματα από φίλτρα συγκεντρωμένα από 51 είδη πτηνών (ομαδοποιημένα σε 131 pools) και 74 δείγματα από αγρινά τα οποία ελέγχθηκαν ατομικά το καθένα.

Στους λαγούς (πίνακας 10), το 10% των pools ήταν θετικό για ρικετσιακό γενετικό υλικό, το 48% ήταν θετικό για *C. burnetii* και ένα άλλο 48% ήταν θετικό για αναπλάσματα.

Περιοχή	Αριθμός pools	<i>Rickettsiae</i>		<i>C. burnetii</i>		<i>Anaplasma spp.</i>	
		Θετικά	%	Θετικά	%	Θετικά	%
Λευκωσία	8	0	0	4	50	7	87,5
Λεμεσός	7	0	0	1	14	2	28,5
Λάρνακα	7	0	0	4	57	6	86
Πάφος	6	3	50	6	100	0	0
Αμμόχωστος	3	0	0	0	0	0	0
Σύνολο	31	3	10	15	48	15	48

Πίνακας 10: Ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων με PCR στους λαγούς.

Στις αλεπούδες (πίνακας 11), το 30% των pools ήταν θετικό για *C. burnetii*, το 70% ήταν θετικό για αναπλάσματα, ενώ σε κανένα pool δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό γενετικό υλικό.

Περιοχή	Αριθμός pools	<i>Rickettsiae</i>		<i>C. burnetii</i>		<i>Anaplasma spp.</i>	
		Θετικά	%	Θετικά	%	Θετικά	%
Λευκωσία	3	0	0	0	0	3	100
Λεμεσός	2	0	0	2	100	2	100
Λάρνακα	2	0	0	0	0	2	100
Πάφος	2	0	0	1	50	0	0
Αμμόχωστος	1	0	0	0	0	0	0
Σύνολο	10	0	0	3	30	7	70

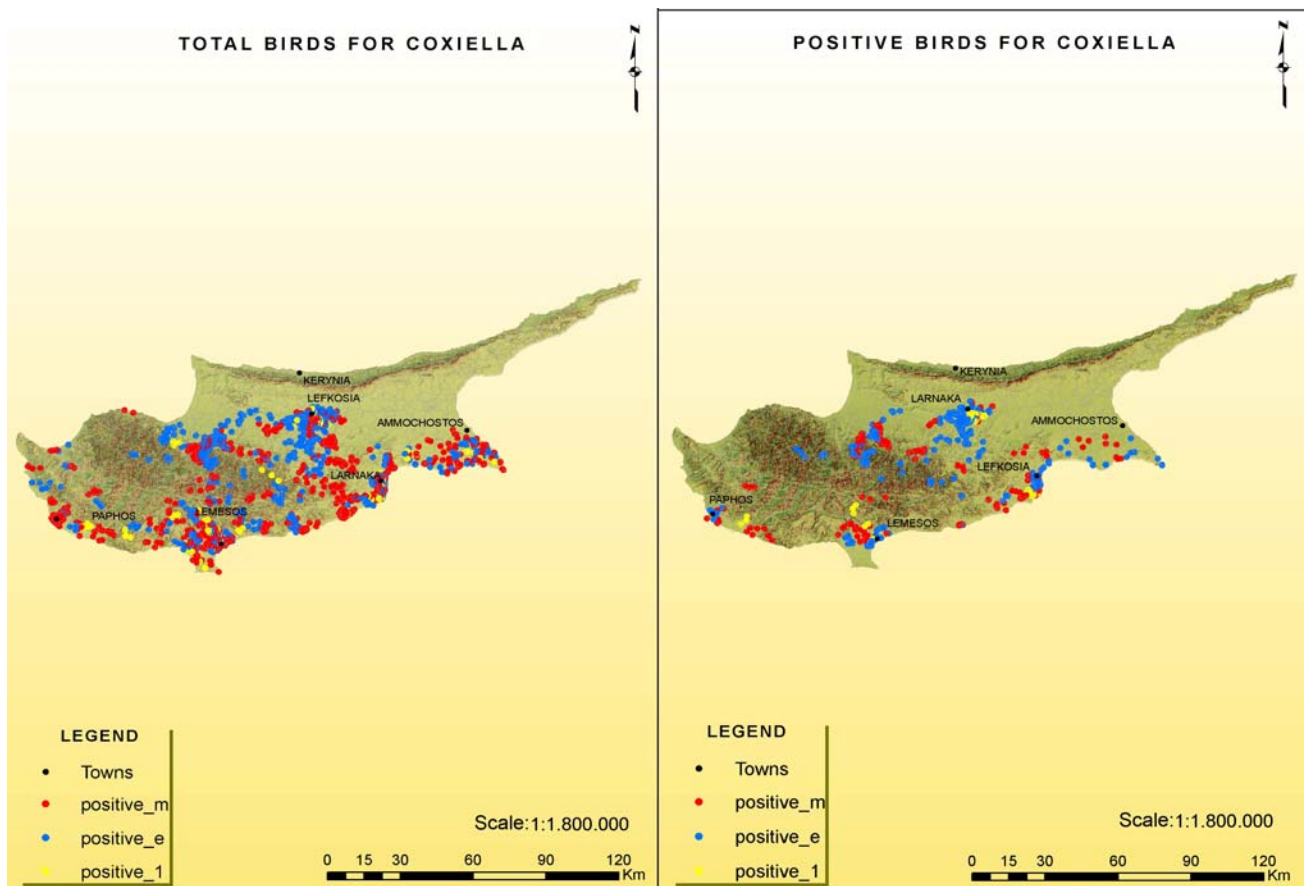
Πίνακας 11: Ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων με PCR στις αλεπούδες.

Στα πτηνά (πίνακας 12), το ποσοστό θετικότητας για το *Anaplasma spp.* και την *C. burnetii* ήταν αρκετά υψηλό, 37% και 31% αντίστοιχα, αναδεικνύοντας ίσως τη σημαντικότητα των επιδημικών, αποδημικών κι' ενδημικών πτηνών στη διασπορά των αναπλασμάτων και της *C. burnetii*. Αντίθετα το ποσοστό θετικότητας για *Rickettsiae* περιορίστηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα και συγκεκριμένα στο 2%.

Περιοχή	Αριθμός pools	<i>Rickettsiae</i>		<i>C. burnetii</i>		<i>Anaplasma spp.</i>	
		Θετικά	%	Θετικά	%	Θετικά	%
Λευκωσία	60	0	0	16	27	20	30
Λεμεσός	30	0	0	8	27	11	37
Λάρνακα	30	0	0	8	27	11	37
Πάφος	6	3	50	4	67	4	67
Αμμόχωστος	5	0	0	5	100	3	60
Σύνολο	131	3	2	41	31	49	37

Πίνακας 12: Ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων με PCR στα άγρια πτηνά.

Στο χάρτη 22 γίνεται γεωγραφική αποτύπωση των περιοχών δειγματοληψίας των πτηνών καθώς και οι περιοχές στις οποίες είχαμε θετικά για *C. burnetii* με τη μέθοδο της PCR.



Χάρτης 22: Γεωγραφική κατανομή των πτηνών που ελέγχθηκαν και των θετικών για *C. burnetii* με τη μέθοδο της PCR

Στον πίνακα 12^α γίνεται παρουσίαση των ειδών των πτηνών από τα οποία έγινε μοριακή ανίχνευση γενετικού υλικού για τα τρία υπό μελέτη παθογόνα.

Bird species	No of samples	<i>C. burnetii</i> positive PCR	<i>Rickettsia sp.</i> positive PCR	<i>Ehrlichia sp.</i> positive PCR
Falco peregrinus	6	√		√
Ixobrychus minutus	6	√		√
Columba palumbus	67	√		√
Streptopelia turtur	41	√		√
Tyto alba	22	√		√
Pernis apivorus	18	√		√
Coturnix coturnix	12			√
Crex crex	5			√
Asio otus	17	√		√
Merops apiaster	9			√
Phoenicopterus ruber	11	√	√	√
Ardea cinerea	10	√		√
Burhinus oedicephalus	3			√
Falco tinnunculus	80	√		√
Circus aeruginosus	23			
Buteo buteo	12	√		√
Buteo rufinus	11	√		√
Lanius minor	2			√
Gallinula chloropus	30	√	√	√
Larus cachinnans	17	√		√
Grus grus	2	√		√
Accipiter nisus	6			√
Accipiter gentilis	6	√		√
Alectoris chukar	2			√
Caprimulgus europaeus	3	√		√
Hieraaetus fasciatus	2	√		√
Fulica atra	20	√		
Tachybaptus ruficollis	3			√
Anas platyrhynchos	7	√		
Nycticorax nycticorax	1	√		
Circus cyaneus	6	√		√
Ciconia ciconia	4	√		
Larus fuscus	3	√		

Πίνακας 12^α: Είδη πτηνών από τα οποία έγινε μοριακή ανίχνευση των παθογόνων

Τέλος, στα αγρινά (πίνακας 13), τα οποία αποτελούν μοναδικό και προστατευόμενο ενδημικό είδος στην Κύπρο, το 9% (7/74) των δειγμάτων ήταν θετικά για αναπλάσματα, το 26% (19/74) ήταν θετικά για ρικετσιακό γενετικό υλικό, ενώ ένα άλλο 26% (19/74) ήταν θετικά για *C. burnetii*.

Περιοχή	Αρ.δειγμάτων	<i>Rickettsiae</i>		<i>C. burnetii</i>		<i>Anaplasma spp.</i>	
		Θετικά	%	Θετικά	%	Θετικά	%
ΑΓΙΑ ΒΑΡΒΑΡΑ	1	1	100	1	100	0	0
ΑΓ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΦΟΥ	2	0	0	1	50	0	0
ΑΓΙΑ	1	0	0	0	0	0	0
ΑΜΠΕΛΙΚΟΥ	10	0	0	0	0	0	0
ΑΝΑΔΙΟΥ	2	0	0	0	0	0	0
ΑΡΓΑΚΑ	1	0	0	1	100	0	0
ΒΡΟΙΣΙΑ	1	0	0	0	0	0	0
ΒΡΥΣΙ ΚΥΚΚΟΥ	1	1	100	0	0	0	0
ΓΑΛΗΝΗ	1	1	100	1	100	0	0
ΓΕΡΑΚΙΕΣ	1	0	0	0	0	0	0
ΓΙΑΛΙΑ	3	0	0	3	100	0	0
ΚΑΜΙΝΑΡΙΑ	1	0	0	1	100	0	0
ΚΑΜΠΟΣ	8	5	63	3	38	0	0
ΚΑΝΝΑΒΙΟΥ	1	1	100	0	0	0	0
ΛΕΥΚΑ	1	0	0	0	0	0	0
ΛΙΜΝΙΤΗΣ	1	1	100	1	100	0	0
ΛΥΣΟΣ	2	0	0	0	0	0	0
ΜΗΛΙΚΟΥΡΙ	1	1	100	0	0	0	0
ΝΕΑ ΔΥΜΜΑΤΑ	1	0	0	0	0	0	0
ΟΡΚΟΝΤΑΣ	1	0	0	0	0	0	0
ΠΑΝΑΓΙΑ ΠΑΦΟΥ	2	0	0	1	50	1	50
ΠΕΡΑ ΒΑΣΑ	1	0	0	1	100	0	0
ΠΛΑΤΑΝΙΑ	4	2	50	1	25	0	0
ΠΛΑΤΑΝΙΑ ΠΑΦΟΥ	1	0	0	0	0	0	0
ΠΟΤΑΜΟΣ ΚΑΜΠΟΥ	8	4	50	2	25	2	25
ΠΩΜΟΣ	3	1	33	0	0	0	0
ΣΑΡΑΜΑΣ	1	0	0	0	0	0	0
ΣΕΛΕΜΑΝΙ	1	0	0	0	0	1	100
ΣΕΛΛΑΙ ΒΟΥΥΠΠΟΥ	1	0	0	0	0	0	0
ΣΕΛΛΑΙ ΜΑΡΟΥΛΙΟΥ	1	1	100	0	0	0	0
ΣΤΑΥΡΟΣ ΨΩΚΑΣ	7	0	0	0	0	2	29
ΤΡΕΙΣ ΕΛΙΕΣ	1	0	0	1	100	0	0
ΦΟΙΝΙ	1	0	0	1	100	0	0
ΦΡΑΚΤΗΣ ΛΕΥΚΑΣ	1	0	0	0	0	1	100
Σύνολο	74	19	26	19	26	7	9

Πίνακας 13: Ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων με PCR στα Αγρινά

3.2. Γονοτυπική ανίχνευση στους κρότωνες.

Οι κρότωνες εξετάστηκαν όπως και τα φίλτρα αίματος των άγριων ζώων αλλά και τα δείγματα των Λευκών Στοιβάδων από τα παραγωγικά ζώα, αφού πρώτα ομαδοποιήθηκαν σε pools, ανάλογα με το είδος τους, αλλά και το είδος του ζώου από το οποίο αφαιρέθηκαν.

Το παθογόνο *Anaplasma spp.* ανιχνεύτηκε σε pools κροτώνων *H. sulcata* που προέρχονταν από αγρινά, σε pools κροτώνων *R. turanicus* που προέρχονταν από αλεπούδες και λαγούς, σε pools κροτώνων *R. sanguineus* που προέρχονταν από λαγούς και σκύλους και σε pools κροτώνων *I. ventalloi* που προέρχονταν από λαγούς.

Παθογόνα του γένους *Rickettsiae* ανιχνεύτηκαν σε pools κροτώνων *H. anatolicum excavatum* που προέρχονταν από πρόβατα, σε pools κροτώνων *R. sanguineus* που προέρχονταν από πρόβατα, σκύλους και λαγούς, σε pools κροτώνων *R. bursa* που προέρχονταν από πρόβατα, αίγες και αγρινά, σε pools κροτώνων *R. turanicus* που προέρχονταν από πρόβατα, αίγες, σκύλους, αγρινά, λαγούς και αλεπούδες, σε pools κροτώνων *R. pusillus* που προέρχονταν από λαγούς, σε pools κροτώνων *H. sulcata* και *H. punctata* που προέρχονταν από αγρινά και τέλος σε pools κροτώνων *I. ventalloi* που προέρχονταν από πέρδικες.

Το παθογόνο *C. burnetii* ανιχνεύτηκε σε pools κροτώνων *R. turanicus* που προέρχονταν από αίγες, πρόβατα, αγελάδες, σκύλους, αλεπούδες και λαγούς, σε pools κροτώνων *R. bursa* που προέρχονταν από αίγες και πρόβατα, σε pools κροτώνων *H. anatolicum excavatum* που προέρχονταν από πρόβατα και αγελάδες, σε pools κροτώνων *H. marginatum marginatum* που προέρχονταν από πρόβατα, σε pools κροτώνων *R. sanguineus* που προέρχονταν από σκύλους και λαγούς και σε pools κροτώνων *I. ventalloi* που προέρχονταν από λαγούς και πέρδικες. Στα αγρινά το παθογόνο ανιχνεύτηκε σε όλα τα είδη των κροτώνων που συνελέγησαν από αυτό το είδος ζώου, πλην εκείνους των ειδών *I. gibosus* και *H. marginatum marginatum*.

Τα αποτελέσματα αυτού του ελέγχου έναντι των τριών παθογόνων παρουσιάζεται αναλυτικά στους πίνακες 14 και 15.

Στον πίνακα 16, γίνεται παρουσίαση των ειδών των γενοτύπων που προέκυψαν, μετά την ανάλυση των αλληλουχιών των προϊόντων (amplicons) της PCR..

Συγκεκριμένα, γίνεται παρουσίαση των γενοτύπων αυτών, αναλόγως της προέλευσης τους, δηλαδή το είδος του ζώου ή/και του κρότωνα απ' όπου ανιχνεύτηκαν, καθώς και οι κωδικοί «accession numbers» που δόθηκαν από την Genbank και βαθμός ομοιότητας με ήδη δημοσιευμένα στελέχη

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	Είδος ζώου	ΕΙΔΟΣ ΕΚΤΟΠΑΡΑΣΙΤΟΥ																				
		<i>H.anatolicum excavatum</i>			<i>R.sanguineus</i>			<i>R.bursa</i>			<i>R.turanicus</i>			<i>H.marginatum marginatum</i>			<i>H.marginatum rufipes</i>			<i>I. gibbosus</i>		
		Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%
<i>C. burnetii</i>	Βοοειδές	3	1	33	0		1	0		4	2	50	0			1	0		0			
	Αίγα	3	0		0		37	7	19	9	9	100	0			0			1	0		
	Πρόβατο	11	9	82	5	0	3	1	33	5	2	40	7	1	14	0			0			
	Σκύλος	1	0		110	19	17	0		10	3	30	0			0			0			
<i>Rickettsia spp.</i>	Βοοειδές	3	0		0		1	0		4	0		0			1	0		0			
	Αίγα	3	0		0		37	5	14	9	5	56	0			0			1	0		
	Πρόβατο	11	4	36	5	3	60	3	3	100	5	3	60	7	0	0			0			
	Σκύλος	1	0		110	30	27	0		10	8	80	0			0			0			
<i>Anaplasma spp.</i>	Βοοειδές	3	0		0		1	0		4	0		0			1	0		0			
	Αίγα	3	0		0		37	0		9	0		0			0			1	0		
	Πρόβατο	11	0		5	0	0	3	0	5	0		7	0		0			0			
	Σκύλος	1	0		110	12	11	0		10	0		0			0			0			

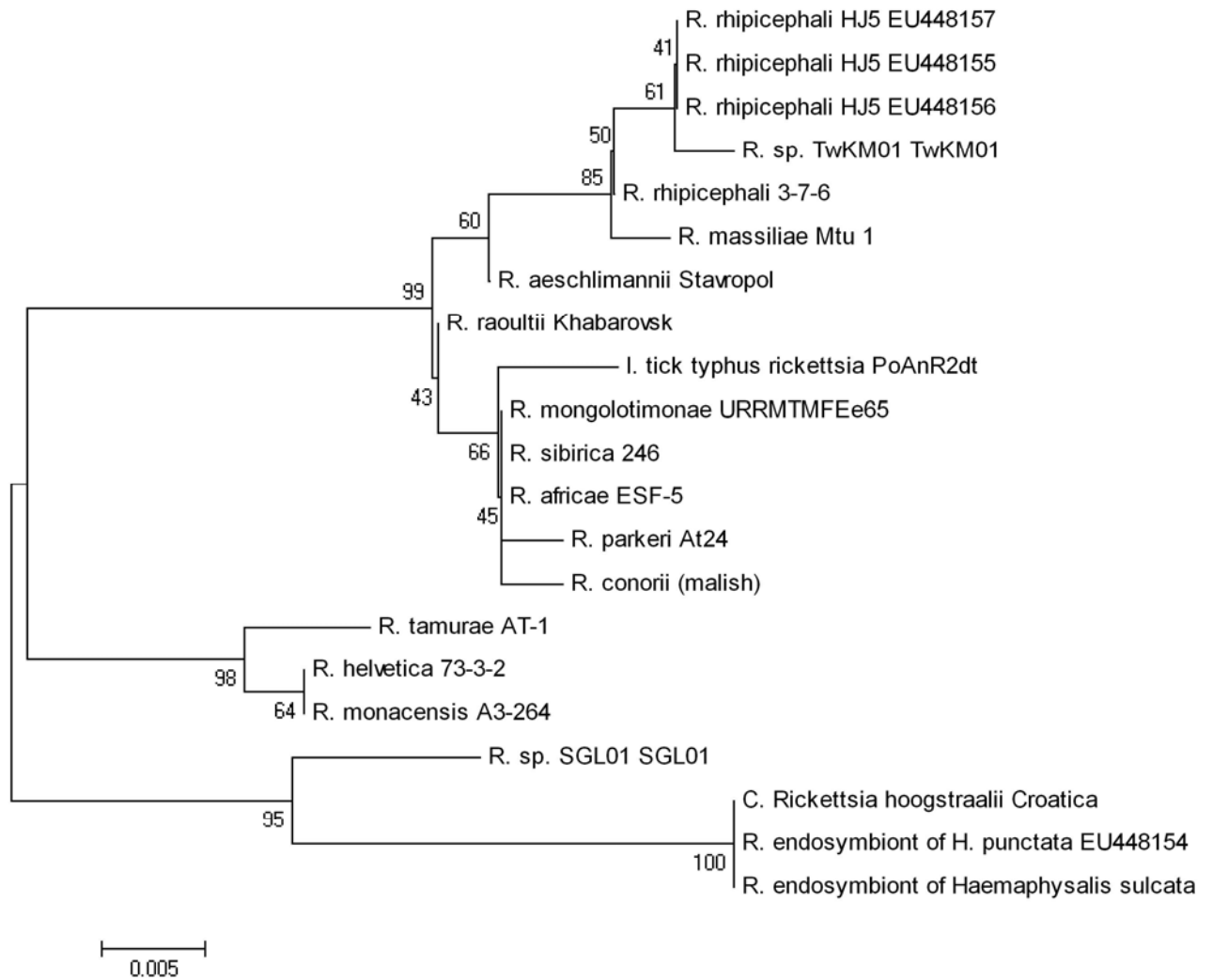
Πίνακας 14: Ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων με PCR στα pools των κροτώνων που συλλέχθηκαν από παραγωγικά ζώα.

ΖΩΟΥ		<i>H.sulcata</i>			<i>H. a. excav.</i>			<i>R.sanguineus</i>			<i>R.bursa</i>			<i>R.turanicus</i>			<i>H. m. marg.</i>			<i>I.ventalloi</i>			<i>I. gibbosus</i>			<i>H. punctata</i>			<i>R. pusillus</i>		
		Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%	Αρ. pools	Θετικά	%			
<i>C. burnetii</i>	Αγρινό	41	5	12	15	2	13	0			35	14	40	10	4	40	1	0	0			3	0	2	2	100	0				
	Λαγός	0			0			14	9	64	1	0		32	10	31	0		9	5	56	1	0	0		3	0				
	Αλεπού	0			0			1	0		0			19	3	16	0		3	0		3	0	0		0					
	Πέρδικα	0			0			0			0			0			0		2	2	100	0		0		0					
<i>Rickettsia spp</i>	Αγρινό	41	23	56	15	0		0			35	8	23	10	2	20	1	0	0			3	0	2	2	100	0				
	Λαγός	0			0			14	1	7	1	0		32	12	37	0		9	0		1	0	0		3	1	33			
	Αλεπού	0			0			1	0		0			19	7	37	0		3	0		3	0	0		0					
	Πέρδικα	0			0			0			0			0			0		2	2	100	0		0		0					
<i>Anaplasma spp.</i>	Αγρινό	41	10	24	15	0		0			35	0		10	0		1	0	0			3	0	2	0		0				
	Λαγός	0			0			14	1	7	1	0		32	3	9	0		9	1	11	1	0	0		3	0				
	Αλεπού	0			0			1	0		0			19	1	5	0		3	0		3	0	0		0					
	Πέρδικα	0			0			0			0			0			0		2	0		0		0		0					

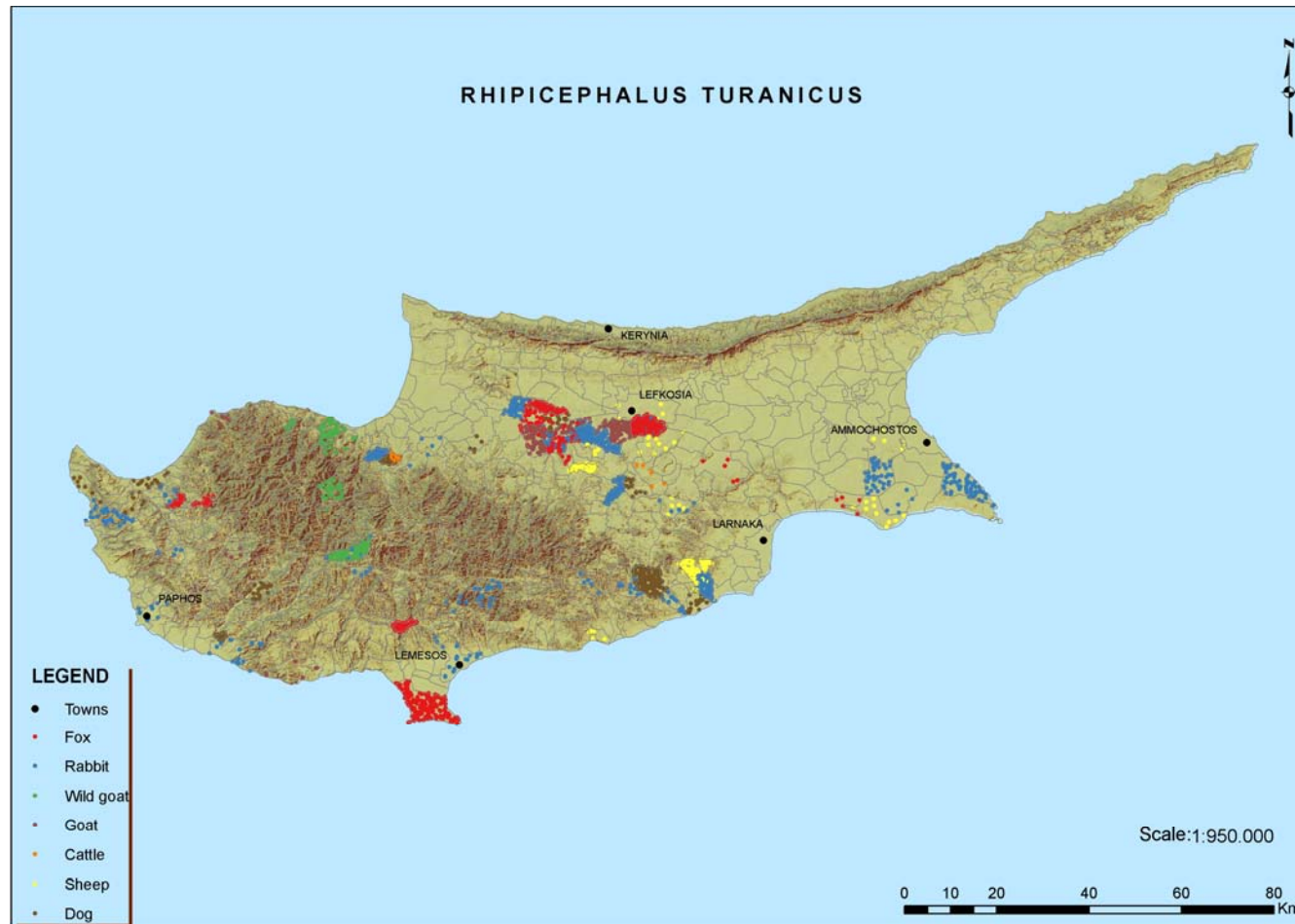
Πίνακας 15: Ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων με PCR στα pools των κροτώνων που συλλέχθηκαν από άγρια θηλαστικά και πτηνά.

Ectoparasites ^a		Animal of origin / No of ticks collected ^b	Tick pools: PCR results ^c			Sequencing analysis ^d		
Species	No		<i>C. burnetii</i> No of pools / positive	<i>Rickettsia</i> sp. No of pools / positive	<i>Anaplasma</i> sp. No of pools / positive	Pathogen detected (% similarity)	Genbank accession No	Animal origin ^e
<i>H. punc</i>	30	Mouflon / 15 Hare / 15	2 / 2	2 / 2	2 / 0	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis punctata</i> (98)	EU448154	Mouflon
<i>R. burs</i>	567	Mouflon / 216 Hare / 4 Sheep / 22 Goat / 323 Bovine / 2	56 / 11	56 / 1	56 / 0	<i>Coxiella burnetii</i> strain RSA 331 (100)	EU448143 EU448144	Mouflon Goat
						<i>Rickettsia massiliae</i> MTU5 (100)	EU448161	Goat
<i>R. tur</i>	648	Mouflon / 46 Hare / 265 Fox / 175 Dog / 82 Sheep / 34 Goat / 42 Bovine / 4	49 / 19	49 / 19	49 / 1	<i>Coxiella burnetii</i> strain RSA 331 (100)	EU448145 EU448146 EU448147 EU448148 EU448149	Goat Bovine Dog Sheep Hare
						<i>Rickettsia massiliae</i> MTU5 (100)	EU448162 EU448163 EU448164	Dog Fox Hare
						<i>Rickettsia</i> sp. ZJ43/2007 (100)	EU448158 EU448159 EU448160	Dog Sheep Goat
						<i>Rickettsia rhipicephali</i> strain HJ5 (100)	EU448155 EU448156	Sheep Hare
<i>H.a.exc</i>	261	Mouflon / 83 Dog / 1 Sheep / 123 Goat / 17 Bovine / 37	35 / 9	35 / 2	35 / 0	<i>Coxiella burnetii</i> strain RSA 331 (100)	EU448150 EU448151	Bovine Sheep
						<i>Rickettsia rhipicephali</i> strain HJ5 (100)	EU448157	Sheep
<i>R. sang</i>	1188	Hare / 106 Fox / 4 Dog / 1037 Sheep / 41	119 / 14	119 / 18	119 / 7	<i>Rickettsia massiliae</i> MTU5 (100)	EU448165	Dog
<i>H. marg</i>	8	Mouflon / 1 Sheep / 7	1 / 1	1 / 0	1 / 0	<i>Coxiella burnetii</i> strain RSA 331 (100)	EU448152	Sheep
<i>H. sulc</i>	276	Mouflon / 276	21 / 7	21 / 14	21 / 3			
<i>I. gib</i>	44	Mouflon / 23 Hare / 1 Fox / 19 Goat / 1	4 / 0	4 / 0	4 / 0			
<i>H. marg. ruf</i>	1	Bovine / 1	1 / 0	1 / 0	1 / 0			
<i>Ix. vent</i>	51	Hare / 45 Fox / 6	10 / 4	10 / 2	10 / 1	<i>Coxiella burnetii</i> strain RSA 331 (100)	EU448153	Hare

Πίνακας 16: Προέλευση των ειδών των γενοτύπων για τα τρία είδη παθογόνων που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη, ανά είδος ζώου ή/και κρότωνα. Accession numbers και βαθμός ομοιότητας με ήδη δημοσιευμένα στελέχη



Διάγραμμα 8: Φυλογενετικό δέντρο ανιχνευθέντων ρικετσιακών στελεχών



Χάρτης 23: Γεωγραφική κατανομή και Πιθανός ρόλος του κρότωνα *R. turanicus* σαν γέφυρα διασποράς παθογόνων μεταξύ διαφόρων ειδών ζώων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Παρασιτισμός

Οι αναδύομενες κροτωνογενείς (tick-borne) νόσοι αποτελούν μια αυξανόμενη απειλή για τον άνθρωπο και την υγεία των ζώων παγκοσμίως και ειδικότερα στην Ευρώπη [Parola P., 2004], επομένως, ο χαρακτηρισμός της διασποράς των παθογόνων στα είδη κροτώνων που παρασιτούν άγρια ζώα και παραγωγικά ζώα μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αξιολόγηση του κινδύνου εκδηλώσεων ασθενειών από αναδύομενα παθογόνα.

Οι κρότωνες λειτουργούν σαν μεταβιβαστές, ξενιστές ή υπόδοχα πολλών παθογόνων μικροοργανισμών. Είδη που παρασιτούν τον άνθρωπο και τα ζώα είναι σημαντικοί μεταβιβαστές ιών, βακτηρίων, πρωτοζώων. Με ελάχιστες εξαιρέσεις, η σχέση των βακτηρίων με τον κρότωνα είναι ισορροπημένη ως αποτέλεσμα μακρόχρονης εξελικτικής συμβίωσης. Συνήθως τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται στο μέσο έντερο του κρότωνα ή/και στην αιμόλεμφο του, χωρίς να προκαλούν εμφανείς παρενέργειες στις ζωτικές λειτουργίες του. Σε κάποια είδη βακτηρίων έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει κάθετη (transovarial:διαωθητική) μετάδοση βακτηρίων (π.χ ρικέτσιες). Σ' αυτές τις περιπτώσεις ο κρότωνα, εκτός από μεταβιβαστής λειτουργεί και σαν υπόδοχο (reservoir) του παθογόνου, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στη διατήρηση του στη φύση.

Η γεωγραφική κατανομή των κροτώνων-μεταβιβαστών συνήθως ακολουθεί τη γεωγραφική κατανομή των παθογόνων που μεταφέρουν και επομένως η διασπορά τους αποτελεί δείκτη για την διασπορά των παθογόνων που μεταφέρουν. Ο έλεγχος επομένως των αρthropόδων-μεταβιβαστών και ο προσδιορισμός των παθογόνων που μεταφέρουν, μπορεί να καθορίσει "high risk" περιοχές για τα παθογόνα. Το παραπάνω έχει ιδιαίτερη αξία στις περιπτώσεις που λειτουργούν ταυτόχρονα σαν μεταβιβαστές και σαν reservoirs.

Γενικά, ο κίνδυνος (risk) για τη μετάδοση μικροοργανισμών που έχουν μεταβιβαστές αρthropόδα, όπως οι ζωνόσοι που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη και συνεπώς ο επιπολασμός τους, εξαρτάται από παραμέτρους όπως: (1) τον επιπολασμό των μολυσμένων με το παθογόνο αρthropόδων-μεταβιβαστών, ο οποίος μπορεί να διαφέρει σε διάφορες περιοχές (2) τη «συγγένεια» (affinity) ενός συγκεκριμένου αρthropόδου με τον άνθρωπο (3) την παρουσία-αφθονία (abundance) των πληθυσμών του συγκεκριμένου σε κάθε περίπτωση αρthropόδου, που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που έχουν σχέση με κλιματολογικές οικολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες και την οικογεωγραφία της κάθε περιοχής και (4) την παρουσία επιδεκτικών θηλαστικών-ξενιστών.

Η παρούσα εργασία είναι μια οικογεωγραφική μελέτη των κρωτονο-μεταδιδόμενων ρικετσιώσεων, των αναπλασμών και της κοξιέλλωσης στην Κύπρο.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, αναζητήθηκαν και προσδιορίστηκαν αρθρόποδα-μεταβιβαστές που παρασιτούν παραγωγικά, καθώς και άγρια ζώα στην Κύπρο. Διερευνήθηκε η παρουσία και προσδιορίστηκε η διασπορά και ο επιπολασμός των υπεύθυνων αιτιολογικών παραγόντων (*Rickettsia conori*, *Coxiella burnetti* και *Anaplasma sp.*) για τις παραπάνω ζωνοδούς στα θηλαστικά-ξενιστές και τους μεταβιβαστές.

Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε ο ορο-επιπολασμός των IgG αντισωμάτων των *Rickettsia conori*, *Coxiella burnetti* και *Anaplasma sp* σε παραγωγικά ζώα (αίγες, πρόβατα, βοοειδή). *Rickettsia sp.*, *Anaplasma sp.* και *Coxiella burnetti* ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε θηλαστικά- ξενιστές και στα εκτοπαράσιτά τους. Τα εκτοπαράσιτα χρησιμοποιήθηκαν σαν δείκτες (indicators) της παρουσίας και της διασποράς παθογόνων βακτηρίων που ανήκουν στα παραπάνω βακτηριακά γένη.

Ο βαθμός μόλυνσης και η γεωγραφική κατανομή των μολυσμένων θηλαστικών και των εκτοπαρασίτων τους λειτούργησαν σαν δείκτης για να εντοπιστεί και να αναδειχτεί το κάθε παθογόνο και να υποδειχτούν συγκεκριμένες περιοχές κινδύνου. Από τη μελέτη προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα για την επιδημιολογική αλυσίδα, και παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση των παραπάνω παθογόνων.

Οι κρότωνες είναι ακάρεα που παρασιτούν κάθε κατηγορία σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων των αμφιβίων, των ερπετών, των πουλιών, των θηλαστικών και των άγριων ζώων [Jensenius και άλλοι, 2006], θέτοντας σε πιθανό κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία δεδομένου ότι περισσότερα από τα 850 είδη και υποείδη κροτώνων που έχουν περιγραφεί, τα 80 είναι ιατρικής σπουδαιότητας [Parola P. και Raoult D., 2001].

Κάποια είδη έχουν αποκλειστική προτίμηση (highly host specific) σε κάποιο συγκεκριμένο θηλαστικό-ξενιστή, ενώ άλλα είδη είναι περισσότερο «καθολικά» και έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται σε ένα μεγάλο αριθμό ξενιστών, ειδικά όταν απουσιάζει ο προτιμητέος ξενιστής. Έτσι παρατηρείται μετακίνηση τους σε νέους ξενιστές. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουν τα είδη που λειτουργούν σαν μεταβιβαστές παθογόνων στον άνθρωπο. Είδη που έχουν προτίμηση στον άνθρωπο ανήκουν κυρίως στα γένη *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes*. και *Rhipicephalus*.

Λειτουργούν σαν μεταβιβαστές και/ή φορείς πολλών παθογόνων μικροοργανισμών (ιοί, βακτήρια, πρωτόζωα), συμβάλλοντας στη διατήρηση, την εξάπλωσή και τη διασπορά τους στη φύση. Ο ρόλος τους στη μετάδοση νόσων (άμεσα ή έμμεσα) σε διάφορα είδη σπονδυλωτών είναι σημαντικός και αποτελούν κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Καταλαμβάνουν την πρώτη θέση ανάμεσα στα αρθρόποδα όσον αφορά τον αριθμό

των παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να μεταβιβάσουν. Εμπλέκονται στον κύκλο μετάδοσης βακτηριακών νόσων (ρικετσιώσεις-κηλιδώδεις πυρετοί, νόσος Lyme, κρωτονογενής υπόστροφος πυρετός, τουλαραιμία, πυρετός Q, ερλιχώσεις, λοιμώξεις από *Bartonella*, *Pasteurella* κλπ). Μεταφέρουν πρωτόζωα όπως η *Babesia spp* (πιροπλάσμωση). και είναι ενδιάμεσοι ξενιστές και/ή μεταβιβαστές περίπου 70 ειδών αρμοίων, εκ των οποίων τουλάχιστον 20 προσβάλλουν τον άνθρωπο (αιμορραγικοί πυρετοί, ρωσική εγκεφαλίτιδα κ.λπ.).

Νόσοι που μεταδίδονται από κρότωνα σε παραγωγικά ζώα, συνιστούν ένα σημαντικό παράγοντα που περιορίζει την παραγωγή των ζώων. Μολυσμένοι κρότωνα που παρασιτούν ενδημικά ή μεταναστευτικά πτηνά, έχουν ιδιαίτερη σημασία, αφού μεταφέρουν παθογόνα σε μεγάλες αποστάσεις, προκαλώντας έτσι επιδημίες. Ειδικά για ζωνόσους που μεταβιβάζονται μέσω αρthropόδων έχει παρατηρηθεί ότι οι κλιματολογικές και περιβαλλοντικές αλλαγές, επηρεάζουν τους κύκλους ζωής, τη βιωσιμότητά και τη δυναμική των πληθυσμών των μεταβιβαστών, με πιθανή συνέπεια τη διατάραξη ή τροποποίηση των επιδημιολογικών κύκλων και της οικογεωγραφίας των ζωνόσων. Τα παραπάνω επηρεάζουν τη διασπορά τους, με πιθανή την πρόκληση επιδημιών.

Τα τελευταία χρόνια εκδηλώνεται ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον από διεθνείς και ευρωπαϊκούς οργανισμούς για τη μελέτη, την πρόληψη και την επιτήρηση νέων ή αναδυόμενων ζωνόσων («emerging infectious diseases»), που στον κύκλο μετάδοσης τους εμπλέκονται αρthropόδα ως μεταβιβαστές.

Μόνο μετά το 1982 έχουν περιγραφεί στους κρότωνα 15 παθογόνα βακτήρια αίτια νέων αναδυόμενων νόσων (8 ρικέτσιες 3 ερλίχιες, και 4 είδη μπορέλλιας).

Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκαν τα είδη των κροτώνων που ενδημούν στην Κύπρο, και η γεωγραφική κατανομή τους. Το συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι κάποια από τα είδη των κροτώνων που εποικούν την Κύπρο παρασιτώντας τόσο τα παραγωγικά ζώα όσο και τα άγρια ζώα είναι εν δυνάμει μεταβιβαστές σημαντικών για την υγεία των ζώων και του ανθρώπου παθογόνων.

Βρέθηκαν τα ακόλουθα 11 είδη κροτώνων: *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus pusillus*, *Haemaphysalis sulcata*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum* *Hyalomma marginatum rufipes*, *Ixodes gibossus*, *Ixodes ventralloi*

Οι κρότωνα του γένους *Hyalomma sp.* (*Hyalomma marginatum rufipes*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum*) μεταδίδουν τον αιμορραγικό

πυρετό της Κριμαίας-Κονγκό [Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF)], *Babesia*, *Theileria*, *Coxiella*, ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών, *Rickettsia bovis*.

Οι κρότωνες των ειδών *Haemaphysalis* (*Haemaphysalis sulcata*, *Haemaphysalis punctata*) μεταδίδουν ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών, *Babesia spp.*, *Anaplasma centrale*, *A. marginale*.

Ο *Rhipicephalus sanguineus*, μεταδίδει *Babesia*, *Borrelia*, *Coxiella*, ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών, αναπλάσματα, και *Pasteurella spp.* Προκαλεί επίσης κροτωνική παράλυση

Ο *Rhipicephalus bursa*, μεταδίδει *Babesia*, *Theileria*, *Coxiella*, ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών και αναπλάσματα, και ο *Rhipicephalus turanicus*, μεταδίδει ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών

Ο *Rhipicephalus pusillus* και ο *Ixodes gibbosus* μεταδίδουν ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών.

Και τέλος ο *Ixodes ventralloii* μεταδίδει αναπλάσματα και *Babesia*.

Αναλυτικότερα από παραγωγικά και άγρια ζώα συνολικά συλλέχθηκαν 3076 κρότωνες οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν σε 11 είδη. Από τα άγρια ζώα, το μεγαλύτερο βαθμό παρασιτισμού εμφάνισαν τα αγρινά και οι λαγοί και το μικρότερο τα πτηνά. Από τα παραγωγικά ζώα και τα ζώα συντροφιάς το μεγαλύτερο βαθμό παρασιτισμού εμφάνισαν τα σκυλιά (κυρίως με ένα είδος κρότωνα, τον *Rhipicephalus sanguineus*), ενώ το μικρότερο τα βοοειδή.

Ένα πρώτο συμπέρασμα, από τα αρχικά στάδια της έρευνας είναι ότι ο βαθμός παρασιτισμού των παραγωγικών ζώων από κρότωνες δεν είναι υψηλός. Το παραπάνω, οφείλεται στην εφαρμογή από μέρους των κτηνοτρόφων προγραμμάτων αποπαρασιτισμού, με ψεκασμούς με εντομοκτόνα-παρασιτοκτόνα σκευάσματα, ιδιαίτερα επειδή τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε έντονος παρασιτισμός των ζώων από ψύλλους. Ειδικά όσον αφορά στα βοοειδή, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο η εφαρμογή προληπτικών αγωγών αποπαρασιτισμού, όσο και η εκτροφή του συγκεκριμένου είδους σε κλειστές εκτροφές σύγχρονου τύπου, αποτελούν συνήθεις πρακτικές για τους κτηνοτρόφους-αγελαδοτρόφους της Κύπρου και μπορεί ίσως να δικαιολογήσουν το μικρό αριθμό εκτοπαρασίτων που συλλέχθηκαν από το είδος αυτό.

Οι περισσότεροι σε αριθμό κρότωνες που συλλέχθηκαν ήταν του είδους *Rhipicephalus sanguineus* (συλλογές καθ' όλη τη διάρκεια του έτους), και *Rhipicephalus turanicus* (συλλογές κυρίως Άνοιξη-Καλοκαίρι), ενώ οι λιγότεροι σε αριθμό ήταν του είδους *Hyalomma marginatum rufipes* (ένας μόνο κρότωνας την Άνοιξη). Οι κρότωνες του είδους *Haemaphysalis sulcata* και *Haemaphysalis punctata* παρασιτούσαν μόνο αγρινά (συλλογές

κυρίως Φθινόπωρο-Χειμώνα, ελάχιστοι το Καλοκαίρι), αυτός του είδους *Hyalomma marginatum rufipes* μόνο βοοειδή, ενώ οι κρότωναες *Rhipicephalus pusillus* βρέθηκαν μόνο σε λαγούς (συλλογές κυρίως Άνοιξη-Καλοκαίρι).

Οι κρότωναες που παρασιτούσαν τα αγρινά ήταν κυρίως του είδους *Haemaphysalis sulcata* και *Rhipicephalus bursa*, για τα σκυλιά ο *Rhipicephalus sanguineus*, για τις αίγες ο *Rhipicephalus bursa* (συλλογές κυρίως Άνοιξη-Καλοκαίρι, ανώριμα στάδια το Χειμώνα), για τα πρόβατα και τα βοοειδή ο *Hyalomma anatolicum excavatum* (συλλογές καθόλη τη διάρκεια του έτους), και για τα άγρια θηλαστικά (λαγός, αλεπού) ο *Rhipicephalus turanicus*. Από τα 51 είδη πτηνών που ελέχθηκαν, κρότωναες βρέθηκαν μονάχα σε πέρδικες (*Alectoris chukar*) και ήταν όλοι του είδους *Ixodes ventalloi*.

Ο κρότωναας που φαίνεται να κυριαρχεί όσον αφορά τη ποικιλία των ξενιστών που παρασιτεί, είναι ο *Rhipicephalus turanicus*. Είναι ενδιαφέρον ότι ο κρότωναας αυτός φαίνεται να «διασχίζει» τα είδη αφού βρέθηκε σε όλα τα ζώα πλην των πτηνών (αγρινό-αλεπού-λαγός αλλά και αιγοπρόβατα, βοοειδή, σκυλιά). Επιπλέον, αυτού του είδους οι κρότωναες βρέθηκαν μολυσμένοι με διάφορα είδη ρικετσιών, *Anaplasma sp* και *Coxiella*. Το παραπάνω είναι ενδιαφέρον εύρημα για την επιδημιολογία και την οικολογία των ζωνοσόων που μελετήθηκαν αν λάβουμε υπ' όψιν την ανθρωπόφιλη συμπεριφορά του. Φαίνεται πως λειτουργεί σαν «γέφυρα» μεταφέροντας τα παθογόνα από την άγρια ζωή στο εγγύς περιβάλλον του ανθρώπου (οικόσιτα ζώα-κτηνοτροφικά) αλλά και στον άνθρωπο, λειτουργώντας σαν σημαντικός κρίκος στην αλυσίδα μετάδοσης των κροτωγενών νοσημάτων στην Κύπρο.

Ένας μολυσμένος με *Rickettsia*, *Coxiella* ή ανάπλασμα κρότωναας *R.turanicus* που παρασιτούσε ένα άγριο ζώο, είναι δυνατόν να μολύνει ένα δεύτερο ξενιστή διαφορετικού είδους πχ ένα περιοικιακό ζώο κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος κατά τον παρασιτισμό του σ' αυτό. Δίνεται με τον τρόπο αυτό η δυνατότητα αφ' ενός της διασποράς του βακτηρίου σε διαφορετικούς φυσικούς ξενιστές και άρα την εγκατάσταση του, αφ' ετέρου την ευκαιρία στο παθογόνο για «γεινίαση» με το ανθρωπογενές περιβάλλον. Το παραπάνω είναι πολύ σημαντικό για τη διασπορά της λοίμωξης αφού μεταφέρεται ο αιτιολογικός παράγοντας στο εγγύτερο περιβάλλον του ανθρώπου.

Αξιοσημείωτο είναι, ότι για πρώτη φορά στην Κύπρο βρέθηκαν κρότωναες του είδους *Ixodes ventalloi* (συλλογές κυρίως Φθινόπωρο-Χειμώνα) και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι το είδος αυτό δείχνει προτίμηση στα άγρια ζώα, αφού βρέθηκαν να παρασιτούν μόνο λαγούς, αλεπούδες και πέρδικες. Κρότωναες του είδους

Ixodes gibbosus (συλλογές καθ' όλη τη διάρκεια του έτους), βρέθηκαν επίσης να παρασιτούν κυρίως άγρια ζώα εκτός από ένα και μοναδικό που βρέθηκε να παρασιτεί αίγα. Σε σύγκριση με παλαιότερη μελέτη που διεξήγαγε το Κεντρικό Κτηνιατρικό Εργαστήριο των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών Κύπρου μεταξύ των ετών 1970-1972 και δημοσιεύτηκε το 1974 [Le Riche PD. και άλλοι, 1974], εντοπίζονται κάποιες διαφορές όσον αφορά τα είδη των κροτώνων που συνελέγησαν. Τότε είχαν ταυτοποιηθεί επιπλέον κρότονες των ειδών *Ixodes crenulatus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Hyalomma anatolicum turanicum* και *Boophilus anullatus*. Στην παρούσα μελέτη όμως, ταυτοποιήθηκαν είδη που τότε δεν βρέθηκαν στην προηγούμενη μελέτη όπως *Haemaphysallis punctata* (από αγρινά), *Ixodes ventralloii* (από αλεπούδες, λαγούς και πέρδικες), και *Rhipicephalus pusillus* (από λαγούς). Οι διαφορές αυτές ίσως να οφείλονται στο γεγονός ότι από τη μια για πρώτη φορά γίνεται συστηματικός έλεγχος εκτοπαρασίτων σε άγρια ζώα και από την άλλη το ότι το παρασιτικό φορτίο των παραγωγικών ζώων έχει μειωθεί σημαντικά στο διάστημα της τριακονταετίας, λόγω της πληθώρας των αντιπαρασιτικών/ παρασιτοκτόνων σκευασμάτων και κατά συνέπεια των αγωγών που εφαρμόζονται στα ζώα αυτά αλλά και στη βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης τους (σύγχρονες μονάδες ενσταυλισμού).

Μια δεύτερη σύγκριση της παρούσας μελέτης, με παλαιότερη που διεξήχθη στην Κύπρο μεταξύ των ετών 1967-1968 και αφορούσε το βαθμό παρασιτισμού των μεταναστευτικών πτηνών [Kaiser MN. και Hoogstraal H. ,1974], αναδεικνύει διαφορές τόσο ως προς το βαθμό παρασιτισμού των πτηνών, όσο και διαφορές ανάμεσα στα είδη των κροτώνων που ταυτοποιήθηκαν. Από τη μια, ο βαθμός παρασιτισμού, φαίνεται τότε να ήταν μεγαλύτερος και από την άλλη ταυτοποιήθηκαν τα είδη των κροτώνων που παρατίθενται και που απουσιάζουν από τη δική μας μελέτη (*Ixodes frontalis*, *Ixodes ricinus*, *Haemophysalis concinna*, *Amblyomma lepidum*, *Amblyomma nuttalli*, *Amblyomma variegatum*, *Argas streptopelia*, *Ixodes eldaricus*, *Ixodes redikorzevi*). Οι διαφορές αυτές μπορεί να εξηγηθούν από το γεγονός ότι, τότε ελέγχθηκε μεγαλύτερος αριθμός και μεγαλύτερη ποικιλία ειδών μεταναστευτικών πτηνών αφού αυτός ήταν και ο στόχος της έρευνας, σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη που αφορούσε επιπλέον έλεγχο άγριων θηλαστικών και έλεγχο παραγωγικών ζώων και κατοικίδιων ζώων. Οι μεγάλες κλιματολογικές αλλαγές μέσα στο διάστημα της τριακονταετίας που μεσολάβησε, ενδεχομένως να συνέβαλαν στις οποιεσδήποτε παρατηρούμενες διαφορές.

Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην έρευνα των Kaiser και Hoogstraal όπως επίσης και σε δύο άλλες έρευνες που έγιναν η μεν πρώτη στην Σουηδία από τον Comstedt και τους συνεργάτες του [Comstedt P. και άλλοι, 2006], και η δεύτερη στη Ρωσία από τον

Alekseen και τους συνεργάτες του [Alekseen AN. και άλλοι,2001], οι περισσότεροι κρότωνες που εντοπίστηκαν, παρασιτούσαν μικροπούλια τα οποία συμμετείχαν ελάχιστα στο δείγμα της δικής μας έρευνας.

2. Παθογόνα

2.1. *Anaplasma spp.*

Στις χώρες της Μεσογείου υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για τις αναπλαστώσεις. Ως εκ τούτου δεν είναι γνωστή η διασπορά των αναπλασμάτων. Ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν για την οικολογία και την επιδημιολογία των αναπλαστώσεων και δεν έχει μελετηθεί ο κύκλος μετάδοσης. Η νόσος δεν καταγράφεται και υποδιαγιγνώσκεται. Στην Κύπρο πριν από τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης δεν υπήρχαν καθόλου στοιχεία, ο αιτολογικός παράγοντας δεν έχει απομονωθεί ούτε από τον άνθρωπο, ούτε από φυσικά υπόδοχα, ξενιστές ή μεταβιβαστές.

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη διερεύνησης της ύπαρξης και της κυκλοφορίας των Αναπλασμάτων γενικά, καθώς και του παθογόνου της ανθρώπινης κοκκιοκυτταρικής αναπλάσμωσης (HGE) *Anaplasma phagocytophilum*, στην Κύπρο. Από τη μελέτη προέκυψαν σημαντικά στοιχεία για την επιδημιολογία και την οικολογία των αναπλασμάτων στην Κύπρο. Αναζητήθηκαν οι φυσικοί ξενιστές των αναπλασμάτων. Στελέχη αναπλασμάτων ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο της PCR, σε παραγωγικά ζώα, σε άγρια θηλαστικά και σε κρότωνες.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι το παθογόνο υπάρχει και ευδοκιμεί στην Κύπρο, τόσο σε παραγωγικά ζώα όσο και σε άγρια θηλαστικά και πτηνά, καθώς και σε εκτοπαράσιτα τα οποία εν δυνάμει μπορούν να διαδραματίζουν ρόλο μεταβιβαστών.

Ένα υψηλό ποσοστό (35%) των παραγωγικών ζώων (αίγες, πρόβατα, βοοειδή) εμφάνισαν τίτλους IgG αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε τίτλους $\geq 1/120$. Ο οροεπιπολασμός υπολογίστηκε στατιστικά σημαντικά μικρότερος στην περιοχή της Λευκωσίας. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων ειδών ζώων ($p < 0,001$), με τα βοοειδή να έχουν υψηλότερη οροθετικότητα (57%) σε σχέση με τα πρόβατα (30%) και τις αίγες (18%).

Καμία προηγούμενη μελέτη για την αναπλάσμωση στα παραγωγικά ζώα δεν είχε διεξαχθεί έως τώρα στην Κύπρο. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων με ανάλογες μελέτες σε χώρες της Ευρώπης δεν είναι εύκολη, αφού οι ζωικοί πληθυσμοί, οι διαγνωστικές μέθοδοι, τα cut-off points, το δείγμα μελέτης, και ο πληθυσμός ομάδας μελέτης διαφέρουν.

Τα αναπλάσματα και ειδικότερα το *A. phagocytophilum* έχουν μελετηθεί στα παραγωγικά ζώα σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες καθώς τα πρόβατα, οι αίγες και τα βοοειδή είναι ευαίσθητα σε λοιμώξεις από είδη των παθογόνων αυτών. Αναφέρονται σημαντικές διακυμάνσεις στα ποσοστά οροθετικότητας έναντι του *A. phagocytophilum* στα βοοειδή και τα πρόβατα, από πολύ υψηλά [Stuen και άλλοι, 2002; Naranjo και άλλοι, 2006], όσο κι

ενδιάμεσα [de la Fuente και άλλοι, 2005; Torina και άλλοι, 2007], έως πολύ χαμηλά [Amusatogui και άλλοι, 2006].

Πιθανή λοίμωξη στα ζώα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια βάρους και παραγωγικότητας [Stuen και άλλοι, 2002], αμβλώσεις [Garcia-Perez και άλλοι, 2003], χαμηλή παραγωγή γάλακτος [Matsumoto και άλλοι, 2006] ή ακόμα και το θάνατο [Stuen και άλλοι, 2003].

Σε πιθανά υπόδοχα αναζητήθηκαν το *A. phagocytophilum* αλλά και άλλα είδη αναπλασμάτων (*Anaplasma sp.*), και προσδιορίστηκε ο βαθμός μόλυνσης και διασποράς τους σε αυτά.

Αναπλασματικό DNA ανιχνεύτηκε στο 56% των pools από αίγες και σε 51% των pools από πρόβατα. Θετικά δείγματα βρέθηκαν, σε όλες τις επαρχίες επιβεβαιώνοντας τον ορολογικό έλεγχο (με εξαίρεση τα πρόβατα της Λεμεσού). Τα αποτελέσματα στα αιγοπρόβατα συμφωνούν με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών σε άλλες χώρες [Petrovec και άλλοι, 2003; Naranjo και άλλοι, 2006].

Τα στελέχη που ανιχνεύτηκαν στα ζώα εμφάνισαν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία. Ταυτοποιήθηκαν 6 διαφορετικοί «γενότυποι» (γενότυποι 1-6), με διαφορετική γεωγραφική κατανομή. Ο γενότυπος 2, παρουσίασε 100% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένα στελέχη του *A. platys* [Pinyosong και άλλοι, 2008; Aguirre και άλλοι, 2006], [Inokuma και άλλοι, 2002], και ανιχνεύθηκε μόνο στη Λευκωσία. Ο γενότυπος 6, παρουσίασε 100% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένα στελέχη του *A. phagocytophilum* [Zhan και άλλοι, 2007; Cao και άλλοι, 2006.], και ανιχνεύθηκε μόνο στη Λεμεσό. Τα είδη *A. platys* και το *A. phagocytophilum* βρέθηκαν μόνο στις αίγες. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά παρουσίας του *A. platys* στις αίγες, δεδομένου ότι το βακτηρίδιο συνήθως ανιχνεύεται στα σκυλιά [Waner και άλλοι, 1997], προκαλώντας την κυνοειδή ερλιχίωση. Οι γενότυποι 1, 3, 4, 5, παρουσίασαν 100% ομοιότητα με δημοσιευμένα στελέχη των αναπλασμάτων (AJ633052, AJ633051, AJ633048 [Liu και λοιποί 2005], AF414869, AF414875 [Lew και άλλοι, 2003] και είναι διάσπαρτοι σε διάφορες περιοχές της Κύπρου, τόσο σε αίγες όσο και σε πρόβατα. Οι γενότυποι 1, 4 και 5 μελετήθηκαν περαιτέρω με σκοπό την ακριβή ταυτοποίηση τους, με τη χρήση των γονιδίων *msp4*, 16S rDNA και *groEL*, ώστε να επιτευχθεί διάκριση μεταξύ των ειδών των αναπλασμάτων [de la Fuente και άλλοι, 2002; de la Fuente και άλλοι, 2005; de la Fuente και άλλοι, 2007] [Lew και άλλοι, 2003]. Η φυλογενετική ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη στελεχών του *A. ovis*.

Είναι ενδιαφέρον ότι τα ζώα ή τα κοπάδια που παρουσιάζουν υψηλό επιπολασμό ή/και θετική PCR δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε κλινικά σημεία λοίμωξης, κάτι που έχει

αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες [Rajput και άλλοι, 2005]. Λοιμώξεις των ζώων από *A. phagocytophilum* κι άλλα είδη αναπλάσμάτων μπορούν συχνά να είναι υποκλινικές και να παραμείνουν απαρατήρητες παρά την ενδημική παρουσία τους σε ορισμένες περιοχές. Παρόλα αυτά, περαιτέρω έρευνα απαιτείται διότι η αναπλάσμωση των ζώων μπορεί να εκδηλωθεί λόγω υποκείμενων παραγόντων [Friedhoff 1997] και να παραμείνει σαν μία επίμονη υποκλινική λοίμωξη [Kieser και άλλοι, 1990; Palmer και άλλοι, 1998].

Anaplasma sp. DNA, ανιχνεύθηκε στο 9% (7/74) των αγρινών. Φαίνεται ότι και τα αγρινά λειτουργούν ως φυσικοί ξενιστές. Το κυπριακό αγρινό, είναι ενδημικό υποείδος άγριου προβάτου και είναι το μεγαλύτερο άγριο, χερσαίο θηλαστικό της Κύπρου και κατοικεί στη περιοχή του δάσους της επαρχίας της Πάφου. Αποτελεί ένα αυστηρά προστατευόμενο είδος στο πλαίσιο της νομοθεσίας της Κυπριακής και Ευρωπαϊκής Ένωσης (που απαριθμείται στα παραρτήματα II και IV της οδηγίας 92/43 βιότοπων) και επίσης απαριθμείται από το 1996 στο πλαίσιο του καταλόγου της Παγκόσμιας Έκδοσης για την Προστασία της Φύσης (IUCN). Ένα σοβαρό πρόβλημα που αντιμετωπίζει το είδος είναι ο κίνδυνος μόλυνσης από διάφορα παθογόνα ανάμεσα στα οποία όπως φαίνεται συμπεριλαμβάνονται τα αναπλάσματα. Δημοσιευμένες μελέτες σε άγρια μηρυκαστικά για την καταγραφή πιθανής μόλυνσης τους από αναπλάσματα και άλλα παθογόνα γενικότερα σπανίζουν (Hubalek και άλλοι, 1993; Krause και άλλοι, 1996; Hofle και άλλοι, 2004; Hofmann-Lehmann και άλλοι, 2004).

Anaplasma sp. DNA, ανιχνεύθηκε επίσης και σε άλλα άγρια θηλαστικά τα οποία μελετήθηκαν [λαγός (48%), αλεπού (70%)]. Ελάχιστες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν στα δύο αυτά είδη των ζώων. Από αυτές, άλλες έχουν καταγράψει την παρουσία του *A. phagocytophilum* (Goethert και Telford 2003; Hulinska και άλλοι, 2004) όσο και ειδών των αναπλάσμάτων (Pusterla και άλλοι, 1999; Groen και άλλοι, 2002; Yabsley και άλλοι, 2006) και στα είδη των ζώων. Τα θηλαστικά αυτά θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση του *A. phagocytophilum* στην αλυσίδα των άγριων ζώων καθώς και τη διασπορά τους σε παραγωγικά ζώα, αλλά και ανθρώπους (κυνηγοί) που έρχονται σε επαφή με αυτά ή τους κρότωνες τους.

Σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση *Anaplasma sp.* DNA στο 37% των pools που ελέγχθηκαν σε επιδημικά και μεταναστευτικά πουλιά. Όπως φαίνονται από τα αποτελέσματα, τα πτηνά φαίνεται να διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη μεταφορά και διασπορά των αναπλάσμάτων, αφού θετικά βρέθηκαν σε όλες τις επαρχίες της Κύπρου, αν και στην περίπτωση αυτή η κατηγοριοποίηση σε σχέση με την επαρχία μικρή σημασία μάλλον έχει, καθώς τα πτηνά μπορούν, να περνούν από τη μία στην άλλη.

Τα ευρήματα μας συμφωνούν και με άλλες μελέτες οι οποίες εκφράζουν την άποψη ότι τα μεταναστευτικά πουλιά είναι εν δυνάμει μεταφορείς παθογόνων από το ένα μέρος στο άλλο ή/και από χώρα σε χώρα [Comstedt P. και άλλοι, 2006, Alekseen AN και άλλοι, 2001].

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη διασπορά από τα μεταναστευτικά πουλιά διαφόρων ζωνοδύων, όπως για παράδειγμα ο πυρετός WN (West Nile Fever), οι επιδημίες ιών Sidbis στη Σκανδιναβία, ο αιμορραγικός πυρετός της Κριμαίας-Κογκό (CCHF), η κροτωνογενής εγκεφαλίτιδα (TBE), ο αιμορραγικός πυρετός. Τα μεταναστευτικά πουλιά φαίνεται να έχουν επίσης έναν σημαντικό ρόλο στη διασπορά βακτηρίων όπως η *Borrelia burgdorferi sensu lato*, τα αναπλάσματα, οι ρικέτσιες και διάφοροι άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες ζωνοδύων που αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία στην Ευρώπη [Alekseen και λοιποί 2001; Hubalek 2004].

Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν ότι η προφανής αύξηση της συχνότητας των αναπλάσμων στα ζώα και τους ανθρώπους κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, είναι αποτέλεσμα διάφορων παραγόντων, ανάμεσα στους οποίους θα μπορούσε να είναι και η μετάδοση μέσω των πτηνών [Daniels και λοιποί 2002]. Τα ευρήματα μας συμφωνούν και με άλλες μελέτες, οι οποίες εκφράζουν την άποψη ότι τα μεταναστευτικά πουλιά είναι εν δυνάμει μεταφορείς παθογόνων από το ένα μέρος στο άλλο ή/και από χώρα σε χώρα [Bjoersdorff και λοιποί 2001].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η Κύπρος λόγω της γεωγραφικής της θέσης αποτελεί μια σημαντική ενδιάμεση στάση μετανάστευσης στην ανατολική Μεσόγειο. Οι ευνοϊκές καιρικές συνθήκες (ήρεμοι άνεμοι, ελαφριά σύννεφα, καλή διαφάνεια) κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης το φθινόπωρο και την άνοιξη, καθώς και οι ήπιοι και υγροί χειμώνες κάνουν την Κύπρο ένα ελκυστικό μέρος για σταθμό και πολλές φορές διαχείμαση των μεταναστευτικών πουλιών. Μια συντηρητική εκτίμηση ότι περίπου 250 εκατομμύρια μεταναστευτικά πουλιά περνούν μέσω του νησιού κατά τη διάρκεια και των δύο περιόδων μετανάστευσης (η πλειοψηφία είναι κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου), ενισχύει τη σημασία του νησιού ως κύρια ενδιάμεση στάση μετανάστευσης.

Σε κρότωνες, πιθανούς μεταβιβαστές, αναζητήθηκε *Anaplasma sp.* DNA και προσδιορίστηκε ο βαθμός μόλυνσης και διασποράς τους σε αυτά. *Anaplasma sp.* DNA ανιχνεύθηκε σε κρότωνες του είδους *H. sulcata*, *R. turanicus*, *R. sanguineus* και *I. ventraloi*. Η παρουσία αναπλάσμων στα παραπάνω είδη κροτώνων έχει ήδη αναφερθεί μετά την πρώτη ανίχνευση αναπλάσματος (*A. phagocytophilum*) στην Ευρώπη [von Stedingk και λοιποί 1997].

Πιο συγκεκριμένα, *Anaplasma sp.* DNA ανιχνεύθηκε σε κρότωνα που παρασιτούσαν σε σκύλους, αγρινά, λαγούς και αλεπούδες. Στα εκτοπαράσιτα των αγρινών, *Anaplasma sp.* DNA ανιχνεύθηκε μονάχα σε κρότωνα του είδους *H. sulcata*. Στα σκυλιά, *Anaplasma sp.* DNA ανιχνεύθηκε σε κρότωνα του είδους *R. sanguineus* [Skotarczak 2003]. Στα εκτοπαράσιτα που αφαιρέθηκαν από λαγούς και αλεπούδες *Anaplasma sp.* DNA ανιχνεύθηκε στον κρότωνα *R. turanicus* και στα δύο είδη ζώων. Επιπλέον *Anaplasma sp.* DNA βρέθηκε και σε κρότωνα του είδους *R. sanguineus* και *I. ventralloii*, που αφαιρέθηκαν από λαγούς.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, το *A. phagocytophilum* φαίνεται να έχει ευρεία διασπορά σε όλη την περιοχή της Μεσογείου. Έχει βρεθεί στην Τυνησία, το Μαρόκο [Sarih και άλλοι, 2005] και στη Βουλγαρία [Christova και άλλοι, 2003], σε κρότωνα του είδους *I. ricinus*. Το παθογόνο έχει ανιχνευθεί επίσης σε άλλου είδους κρότωνα στην Ισπανία και την Ιταλία (*Hyalomma marginatum marginatum*, *R. bursa*, *Ixodes sp.*, *Dermacentor marginatus*) [Naranjo και άλλοι, 2006] και στην Αλβανία (*R. bursa*, *R. sanguineus*) [Christova και άλλοι, 2003].

Άλλες μελέτες, [De La Fuente και άλλοι, 2004], αναφέρουν την ανίχνευση του *A. phagocytophilum* και του *A. marginale* σε κρότωνα του είδους *H. m. marginatum*, και *R. bursa*, και προτείνουν πιθανό ρόλο αυτών των δυο ειδών κροτώνων στη διατήρηση των αναπλασμάτων στην άγρια φύση και τη μετάδοσή τους σε κατοικίδια ζώα. Επίσης σε πρόσφατη μελέτη (Loftis και άλλοι, 2006), αναφέρεται η παρουσία του *A. marginale* σε κρότωνα του είδους *H. anatolicum excavatum* και *R. sanguineus* που είχαν αφαιρεθεί από βοοειδή.

Στον ανθρώπινο πληθυσμό οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στον επιπολασμό των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε άλλες χώρες της Ευρώπης, προτείνουν την χρήση της αραίωσης IgG 1/64 σαν cut-off point, όπως εξ' άλλου συνιστούν και οι παρασκευαστές των εμπορικά διαθέσιμων διαγνωστικών kits [Skarphedinsson και άλλοι, 2001; Woessner και άλλοι, 2001; Daniel και άλλοι, 2002; Groen και άλλοι, 2002]. Όμως, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συστήνει για οροεπιδημιολογικές μελέτες cut-off point IgG 1/128 [Walder και άλλοι, 2003]. Στην παρούσα μελέτη προκειμένου να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση του επιπολασμού ως cut-off point θεωρήθηκε ο τίτλος 1/128 για τα IgG αντισώματα. Με βάση το παραπάνω cut-off, η οροθετικότητα για IgG αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* ήταν 31% (από τα 187 δείγματα που ελέγχθηκαν, τα 58 ήταν θετικά) με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Πάφου (58%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Λάρνακας (24%)

Ο οροεπιπολασμός που καταγράφηκε είναι υψηλότερος από ανάλογες ομάδες (κυνηγοί, αγρότες) που έχει καταγραφεί σε άλλες μελέτες [Fingerle και άλλοι, 1997; Thomas και άλλοι, 1998; Cinco και άλλοι, 2004; Stanczak και Grzeszczuk 2006], σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, αποκαλύπτοντας οροθετικότητα της τάξης του 17.7% [Fingerle και άλλοι, 1997] και 9.6% [Stanczak και Grzeszczuk, 2006] σε δύο έρευνες στην Πολωνία, 14% στη Γερμανία [Fingerle και άλλοι, 1997], 9% στην Ελβετία [Pusterla και άλλοι, 1998], 8.8% στην Ιταλία [Cinco και άλλοι, 2004], ή 1.3% στις Κάτω Χώρες [Groen και άλλοι, 2002].

Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι δεν μπορούν να αποκλειστούν ψευδώς θετικές αντιδράσεις που πιθανόν οφείλονται σε διασταυρούμενες αντιδράσεις (cross-reactions) μεταξύ του αναπλάσματος και άλλων ρικετσιασικών νοσημάτων (Blanco και Oteo, 2002).

Σε παράλληλη μελέτη [Χοχλάκης Δημοσθένης, Διδακτορική διατριβή], έγινε ενεργητική και συστηματική αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών με επικέντρωση και έμφαση της προσπάθειας στις περιοχές που είχαν χαρακτηριστεί στην πρώτη φάση ως περιοχές «υψηλού κινδύνου». Μετά από ενημέρωση και ευαισθητοποίηση των γιατρών εστάλησαν στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων, και Γεωγραφικής Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης, προς διερεύνηση ως ύποπτα για αναπλάσμωση, δείγματα ασθενών με εμπύρετο νόσημα αγνώστου αιτιολογίας. Απ' αυτά, αναπλάσμωση επιβεβαιώθηκε σε 12 περιστατικά λοίμωξης από *A. phagocytophilum* ή άλλα αναπλάσματα. Για πρώτη φορά στην Κύπρο, ανιχνεύτηκε σε ασθενείς το *A. phagocytophilum* αλλά και *A. ovis*.

Η παρουσία του κρότωνα *I. ricinus* που θεωρείται ο μεταβιβαστής του *A. phagocytophilum*, [Parola P. και άλλοι, 2005], είναι σπάνια και δεν έχει καταγραφεί ακόμα στην Κύπρο, ωστόσο, η παρουσία στο νησί του κρότωνα *R. bursa*, πιθανού μεταβιβαστή του *A. ovis* [Friedhoff, 1997], προκαλεί το ενδιαφέρον σχετικά με το εάν το συγκεκριμένο είδος κρότωνα μπορεί να μεταβιβάσει το *A. ovis* στον άνθρωπο.

Μια υπόθεση που μπορεί να διατυπωθεί από τα ευρήματα της μελέτης μας, η οποία όμως απαιτεί παραπέρα διερεύνηση είναι ότι στις χώρες της Μεσογείου πιθανόν η οικολογία και η επιδημιολογία να διαφέρει από την Β. Ευρώπη.

2.2. *Rickettsiae*

Στο παρελθόν έχουν αναφερθεί κρούσματα ρικετσίωσης σποραδικά ή με μορφή επιδημίας και έχουν προσδιοριστεί διάφορα είδη κροτώνων που ενδημούν στην Κύπρο [Psaroulaki και άλλοι, 2005; Psaroulaki και άλλοι, 2006, Psaroulaki A., διδακτορική διατριβή]. Οι γνωστές στην Κύπρο ρικετσίώσεις είναι ο ενδημικός τύφος (*R. typhi*), και ο Μεσογειακός κηλιδοβλατιδώδης πυρετός (*R. conorii*). Προηγούμενη μελέτη από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων, και Γεωγραφικής Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι ρικετσίώσεις αποτελούν πρόβλημα υγείας για την Κύπρο. Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την υψηλή οροθετικότητα των παραγωγικών ζώων έναντι της *Rickettsia conorii*, καθώς από το σύνολο των 1017 ζώων που ελέγχθηκαν, τα 689 (68%) βρέθηκαν θετικά στα IgG αντισώματα. Υψηλά ποσοστά οροεπιπολασμού καταγράφηκαν τόσο στις αίγες (82%) όσο και στα πρόβατα (75%). Στα βοοειδή το ποσοστό ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο (46%), παρ' όλα αυτά είναι επίσης υψηλό. Όλα τα ζώα δηλώνονταν ως υγιή, χωρίς συμπτώματα.

Στην παρούσα μελέτη, με την εφαρμογή της PCR, ερευνήσαμε την παρουσία ρικετσιών σε διάφορα είδη θηλαστικών και στους κρότωνες που παρασιτούσαν σ' αυτά. Σε ένα υψηλό ποσοστό (29%) των κροτώνων ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA. Παρατηρήθηκε ευρεία γεωγραφική διασπορά των κροτώνων που ήταν μολυσμένοι με ρικέτσιες. Πέντε είδη ρικετσιών: *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia rhipicephali*, καθώς και variant της *Rickettsia africae* και *Rickettsia felis* (felis-like), ανιχνεύθηκαν και χαρακτηρίστηκαν γονοτυπικά. Από τα παραπάνω είδη, η *Rickettsia massiliae*, και η *Rickettsia aeschlimannii* έχουν συσχετιστεί με νόσο στον άνθρωπο.

Ρικετσιακό DNA βρέθηκε σε κρότωνες που αφαιρέθηκαν από πρόβατα (*Hyalomma anatolicum excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*) αλλά και από αίγες (*Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*). Σε κρότωνα *Rhipicephalus turanicus* που παρασιτούσε αίγα, τυποποιήθηκε η *Rickettsia aeschlimannii* καθώς και ένα variant της *Rickettsia africae*. Σε κρότωνες *Rhipicephalus bursa* τυποποιήθηκε η *Rickettsia massiliae*. Σε κρότωνες του είδους *Rhipicephalus turanicus* και *Hyalomma anatolicum excavatum* που παρασιτούσαν τα πρόβατα ταυτοποιήθηκε η *Rickettsia rhipicephali*. Στα εκτοπαράσιτα των βοοειδών δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA, όμως ήταν περιορισμένος ο αριθμός εκτοπαρασίτων τα οποία συλλέγησαν από το είδος αυτό. Ρικετσιακό DNA ανιχνεύθηκε στα δυο είδη κροτώνων που κυρίως παρασιτούσαν τα

σκυλιά τον *Rhipicephalus sanguineus* και τον *Rhipicephalus turanicus*. Και από τα δύο είδη των κροτώνων αυτών, ανιχνεύτηκε η *Rickettsia massilliae*.

Στο 1/4 περίπου των αγρινών που μελετήθηκαν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA (19/74). Ρικετσιακό DNA ανιχνεύθηκε και στα παρακάτω εκτοπαράσιτα τους: *Haemaphysalis sulcata*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*. Σε κρότωνα του είδους *Haemaphysalis punctata* ταυτοποιήθηκε *Rickettsia felis-like* καθώς και *Rickettsia endosymbiont of Haemaphysalis punctata* ενώ σε κρότωνα του είδους *Rhipicephalus turanicus* βρέθηκε variant της *Rickettsia africae*.

Η *R.felis* είναι ένα παθογόνο είδος ρικέτσιας που ανιχνεύτηκε το 1992 στην Καλιφόρνια και έχει τυποποιηθεί και στην Ευρώπη (Γαλλία) και καταταχθεί στην ομάδα των κηλιδωδών πυρετών.

Παρόμοια με τη δική μας μελέτη, ανίχνευση *Rickettsia felis-like*, επιτεύχθηκε σε κρότωνα του γένους *Haemaphysalis* από το Darja D. και τους συνεργάτες του στην Κροατία [Darja D. και άλλοι, 2006] με τη διαφορά ότι προερχόταν από κρότωνα του είδους *Haemaphysalis Sulcata* ενώ σ' εμάς από το είδος *Haemaphysalis punctata*.

Ταυτοποίηση της *Rickettsia aeschlimannii* επιτεύχθηκε από κρότωνα του είδους *Rhipicephalus turanicus* ενώ η Beati και οι συνεργάτες της αναφέρουν ως μεταβιβαστή τον κρότωνα *Hyalomma marginatum marginatum* [Beati L. και άλλοι, 1997] και ο Matsumoto και οι συνεργάτες του επίσης τον *Hyalomma marginatum marginatum* αλλά και τον *Hyalomma marginatum rufipes* [Matsumoto K. και άλλοι, 2004]. Στην Κεφαλονιά επίσης, η Psaroulaki και οι συνεργάτες της ανίχνευσαν το παθογόνο σε κρότωνα του είδους *Hyalomma anatolicum excavatum* [Psaroulaki A. και άλλοι, 2006], ενώ στην Ισπανία αυτό ανιχνεύθηκε από *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus* και *Hyalomma marginatum* από τον Marquez-Jimenez και τους συνεργάτες του [Marquez-Jimenez FJ. και άλλοι, 2005]. Η ίδια ρικέτσια ανιχνεύτηκε και σε κρότωνα *Rhipicephalus appendiculatus* από τους Pretorius και Birtles στην Ν. Αφρική [Pretorius AM και Birtles RJ].

Η *Rickettsia rhipicephali* βρέθηκε σε κρότωνα του είδους *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus bursa* και *Hyalomma anatolicum excavatum*. Παρόμοια ευρήματα με τα δικά μας, όσον αφορά την ανίχνευση από *Rhipicephalus turanicus* έχουν αναφερθεί από το Darja και τους συνεργάτες του στην Κροατία [Darja D. και άλλοι, 2006], ενώ στην έρευνα της Psaroulaki και των συνεργατών της στην Κεφαλονιά, ανιχνεύτηκε σε κρότωνα του είδους *Rhipicephalus sanguineus* [Psaroulaki A. και άλλοι, 2006].

Η *Rickettsia massiliae* βρέθηκε σε κρότωνα του είδους *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus bursa* και *Rhipicephalus sanguineus*. Η ρικέτσια αυτή ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 1992 στη Μασσαλία, από κρότωνα του είδους *Rhipicephalus sanguineus* [Beati L. και άλλοι, 1992; Beati L. και Raoult D., 1993]. Στην Ευρώπη, στη συνέχεια έχει ανιχνευθεί με μοριακές μεθόδους σε κρότωνα *R. sanguineus* στην Ελλάδα [Babalís T. και άλλοι, 1994] και *R. turanicus* στην Πορτογαλία [Bacellar F. και άλλοι, 1995]. *Rickettsia massiliae* ανιχνεύθηκε και στην Αφρική σε κρότωνα *R. sulcatus*, στην Κεντροαφρικανική Δημοκρατία [Tissot-Dupont H. και άλλοι, 1994], και από *R. muhsamae* που συλλέχθηκαν από βοοειδή στο Μάλι [Parola P. και άλλοι, 2001]. Μέχρι σήμερα, η *R. massiliae* έχει απομονωθεί και / ή ανιχνευθεί μόνο από κρότωνα και η παθογένεια της για τον άνθρωπο είναι άγνωστη. Το 1996, μια παραλλαγή του στελέχους *R. massiliae*, ονομάστηκε Bar29, και απομονώθηκε σε κρότωνα *R. sanguineus* στην Ισπανία [Beati L. και άλλοι, 1996].

Το σημαντικότερο εύρημα αυτού του μέρους της έρευνας, αποτελεί η ανίχνευση variant της *Rickettsia africae* από κρότωνα του είδους *Rhipicephalus turanicus*, γεγονός διπλής σημασίας γιατί από τη μια ανιχνεύεται η συγκεκριμένη ρικέτσια στον ευρωπαϊκό χώρο και από την άλλη σηματοδοτείται ίσως ο εντοπισμός ενός νέου μεταβιβαστή για το είδος αυτής της ρικέτσιας αφού οι περισσότερες μελέτες μέχρι σήμερα, αποδίδουν τη μετάδοση της σε κρότωνα του γένους *Amblyomma* (*A. variegatum*, *A. hebraeum* και *A. lepidum*) [Kelly P.J. και άλλοι, 1996, Parola P. και άλλοι, 2001]. Απαιτείται όμως παραπέρα τυποποίηση έτσι ώστε το στέλεχος να χαρακτηριστεί πλήρως.

Στα άλλα άγρια θηλαστικά, ρικετσιακό DNA ανιχνεύθηκε μονάχα σε λαγούς και μονάχα στην επαρχία της Πάφου. Παρ' όλα αυτά, ρικετσιακό DNA ανιχνεύτηκε σε εκτοπαράσιτα τόσο σε λαγούς (*Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus pusillus*) όσο και σε αλεπούδες (*Rhipicephalus turanicus*). Η *Rickettsia africae* variant και η *Rickettsia massilliae* τυποήθηκαν σε κρότωνα *Rhipicephalus turanicus* τόσο σε αλεπού όσο και σε λαγό.

Ο βαθμός έκθεσης της ομάδας του ανθρώπινου πληθυσμού που ελέγχθηκε ήταν αρκετά υψηλός. Ορίζοντας ως cut-off, τίτλο $\geq 1/120$ για τα IgG αντισώματα έναντι της *R. conori*, η οροθετικότητα υπολογίστηκε σε ποσοστό 33%, με τον ψηλότερο επιπολασμό να εμφανίζεται στην επαρχία Λάρνακας (51%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Πάφου (16%). Σε προηγούμενη έρευνα που έγινε το 1997 με συνεργασία του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων, και Γεωγραφικής Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης και των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών Κύπρου, ποσοστό 44,6% των συμμετεχόντων από αντιπροσωπευτικό στρωματοποιημένο δείγμα υγιούς γενικού

πληθυσμού απ' όλη την Κύπρο, εμφάνισε αντισώματα έναντι της *R. conorii*. Τότε θεωρήθηκε ως cut-off, τίτλος $\geq 1/60$.

Μετατρέποντας τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, για σκοπούς σύγκρισης με την προαναφερόμενη και ορίζοντας ως cut-off, τίτλο $\geq 1/60$, η οροθετικότητα υπολογίστηκε σε 53%, ποσοστό σαφώς μεγαλύτερο και που αποτελούσε αναμενόμενο γεγονός, αφού η ομάδα του πληθυσμού που ελέγχθηκε χαρακτηρίζεται σαν ομάδα «υψηλού κινδύνου».

Οι παράγοντες του περιβάλλοντος που επικρατούν στο νησί, έχουν άμεση σχέση με την εξάπλωση των ρικετσιώσεων των κηλιδωδών πυρετών. Οι κλιματολογικές συνθήκες, ευνοούν την αύξηση των πληθυσμών των κροτώνων και συμβάλλουν στη διατήρηση της ρικέτσιας στο περιβάλλον. Πιθανή αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, θα ευνοήσει ιδιαίτερα και τον πολλαπλασιασμό των μεταβιβαστών αλλά και της ρικέτσιας μέσα σ' αυτούς, με αποτέλεσμα την αύξηση από τη μια των πληθυσμών και από την άλλη του βαθμού ρικετσιοφορίας των μεταβιβαστών, έχοντας και ως άμεσο επακόλουθο και την αύξηση των κρουσμάτων στον ανθρώπινο πληθυσμό.

2.3. *Coxiella burnetii*

Η γεωγραφική διασπορά της *Coxiella burnetii* δείχνει ότι το παθογόνο απαντάται σε όλο το νησί. Αυτό το εύρημα δεν εκπλήσσει αφού είναι γνωστό ότι η *Coxiella burnetii* και ο πυρετός Q υφίστανται στην Κύπρο. Ο πυρετός Q έχει αναφερθεί για πρώτη φορά στην Κύπρο το 1951 από τους Kalplan και Bertagna (1955) όταν ανακάλυψαν αντισώματα στην εκτροπή συμπληρώματος της *C. burnetii* σε 24 από τα 60 πρόβατα (40%) και σε 11 από τις 31 αίγες (35%). Ταυτόχρονα, ύποπτα περιστατικά Q Fever στους ανθρώπους αναφέρθηκαν από το Τμήμα Ιατρικών Υπηρεσιών. Στα τέλη του 1960 ο Kelly [Kelly HB, 1974] είχε προβεί σε διερεύνηση 547 ορών αίματος που λήφθηκαν τυχαία από ανθρώπους στο Γενικό Νοσοκομείο Λευκωσίας κατά τα έτη 1968 και 1969. Το 5,3% των ορών αποδείχθηκαν θετικοί με τη μέθοδο της εκτροπής συμπληρώματος αντισωμάτων φάσης 2 του αντιγόνου της *C. burnetii*.

Το 1970 αποφασίστηκε η διερεύνηση των αποβολών στα παραγωγικά ζώα της νήσου. Ζητήθηκε από όλους τους κτηνιατρικούς σταθμούς να αποστέλλουν στο κτηνιατρικό εργαστήριο των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών ορούς αίματος, έμβρυα και πλακούντες από ζώα που έχουν αποβάλλει. Κατά τη διάρκεια του 1971, έξι πλακούντες βρέθηκαν να περιέχουν αριθμό μικρών acid-fast rot-like οργανισμών. Οροί από τα ίδια ζώα αποδείχθηκαν αρνητικοί για αντισώματα *Chlamydia Psittaci* και αντισώματα *Brucella melitensis*. Το 1973 είχαν βρεθεί και πάλι σε πλακούντες οι ίδιοι μικροοργανισμοί σε ζώα που είχαν αποβάλλει.

Σε δύο περιπτώσεις ποιμνίων με αποβολές που βρέθηκαν τέτοιοι μικροοργανισμοί συλλέχθηκαν από τα ίδια ζώα οροί αίματος που εξετάστηκαν από το Standards Laboratory, Colindale, UK και αποδείχθηκαν θετικοί στο Q Fever. Τον ίδιο χρόνο, από άλλες τέσσερις περιπτώσεις αποβολών σε ποίμνια που μικροσκοπικά ανευρέθησαν οι ίδιοι μικροοργανισμοί, οι εξετασθέντες οροί αίματος από τα ίδια ζώα αποδείχθηκαν θετικοί για αντισώματα στην *C.burnettii*. Κατά τη χρονική περίοδο του Δεκεμβρίου 1974 και του Ιουνίου 1975, 78 Βρετανοί στρατιώτες που είχαν σαν έδρα της Βρετανικές Βάσεις Δεκέλειας στην Επαρχία Λάρνακας οι οποίοι ασθένησαν με συμπτώματα πυρετού και γρίπης, βρέθηκαν θετικοί στον πυρετό Q μετά από σειρά εργαστηριακών εξετάσεων [Spicer AJ. και άλλοι, 1977; Spicer AJ., 1979]. Την ίδια περίοδο πρέπει να σημειωθεί ότι στην πιο πάνω περιοχή των βάσεων είχαν μετακινηθεί 40.000 πρόσφυγες, πολλοί από τους οποίους μετέφεραν και τα ποίμνια τους.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι από τους μόνιμους κατοίκους της περιοχής αυτής των βάσεων κανένας δεν παρουσίασε συμπτώματα της ασθένειας. Οι Ιατρικές αρχές των Βρετανικών Βάσεων ζήτησαν συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες και αφού διερευνήθηκε το ταυτόχρονο πρόβλημα αποβολών σε 21 ποίμνια αιγοπροβάτων της περιοχής τα περισσότερα βρέθηκαν να είναι θετικά στο πυρετό Q.

Σε οροεπιδημιολογική μελέτη που έγινε το 1996-1999, ο οροεπιπολασμός των IgG αντισωμάτων έναντι της *Coxiella burnetii* σε τυχαίο δείγμα γενικού ανθρώπινου πληθυσμού ήταν 34,3% (με cut off το 1/120) ενώ με cut off το 1/60 ο οροεπιπολασμός των IgG αντισωμάτων στο τυχαίο δείγμα του γενικού πληθυσμού ήταν 42,7%. Στην ίδια μελέτη το 29,3% των αιγών, το 17% των προβάτων, το 9,3% των βοοειδών ήταν οροθετικά [Psaroulaki A. και άλλοι, 2006; Φειδίας Λουκαΐδης, Διδακτορική διατριβή]. Μεγαλύτερος οροεπιπολασμός είχε παρατηρηθεί στις γεωργοκτηνοτροφικές περιοχές (60,8%) σε σύγκριση με τις ημιαστικές (48,4%) και τις αστικές (33,9%). Από την ανάλυση όλων των πιθανών παραγόντων κινδύνου για τη μετάδοση της νόσου είχαν προκύψει τρεις σημαντικοί παράγοντες κινδύνου: το επάγγελμα, την ιδιοκτησία αιγοπροβάτων και την ύπαρξη κοπριάς. Είχε διαπιστωθεί στην προαναφερόμενη μελέτη ότι μεγαλύτερο κίνδυνο είχε η κατηγορία επαγγέλματος που περιελάμβανε κτηνοτρόφους-κτηνίατρους σφαγείς κλπ, ιδιοκτήτες αιγοπροβάτων στους οποίους ο κίνδυνος είχε βρεθεί να αυξάνεται ακόμα περισσότερο όταν τα αιγοπρόβατα έχουν αποβολές. Ο παράγοντας της ιδιοκτησίας αιγοπροβάτων είναι ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου και μάλιστα όσοι ιδιοκτήτες ανέφεραν στο ιστορικό των ζώων τους αποβολές είχαν περίπου διπλάσιο κίνδυνο για οροθετικότητα από τους ιδιοκτήτες ζώων χωρίς αποβολές. Η χρήση κοπριάς στον κήπο είχε

διαπιστωθεί ότι σχετίζεται σημαντικά με την οροθετικότητα. Η κοπριά είχε αναδειχθεί σαν ένας ιδιαίτερα σημαντικός έμμεσος παράγοντας κινδύνου για τη μετάδοση του νοσήματος από τα αιγοπρόβατα στους ανθρώπους. Λαμβάνοντας υπόψη την αερογενή μετάδοση του νοσήματος, την αποβολή του μικροβίου στα κόπρανα των ζώων (κοπριά) και την επιβίωση της *C.burnettii* στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, η ύπαρξη κοπριάς φαίνεται να ευνοεί την αερογενή μετάδοση της *C.burnettii* και φαίνεται να είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου στη μετάδοση της νόσου στην Κύπρο.

Όλα τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώνονται και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Από την προαναφερόμενη μελέτη πριν 10 χρόνια τα ποσοστά αυξήθηκαν. Υψηλότερα ποσοστά οροθετικότητας βρέθηκαν σε αυτή την εργασία, και στα 3 είδη ζώων, αλλά και στον ανθρώπινο πληθυσμό επιβεβαιώνοντας και ενισχύοντας τις παλαιότερες μελέτες, όσον αφορά τη σημαντικότητα αυτού του παθογόνου για την Κύπρο. Σε σύνολο δείγματος 1017 ζώων που ελέγχθηκαν, 697 (69%) βρέθηκαν θετικά στα IgG αντισώματα έναντι της *C. burnettii*. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μικρών μηρυκαστικών (αίγες και πρόβατα) με τα βοοειδή ($p < 0,001$) και όπως προκύπτει από το δείγμα τα μεγάλα μηρυκαστικά έχουν χαμηλότερη οροθετικότητα (40%) σε σχέση με τις αίγες (84%) και τα πρόβατα (81%) παρ' όλα αυτά ο επιπολασμός παραμένει σε υψηλά επίπεδα και σε αυτό το είδος. Τα μικρά μηρυκαστικά δεν έχουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα ($p = 0,262$).

Ο βαθμός έκθεσης της ομάδας του ανθρώπινου πληθυσμού που ελέγχθηκε (κτηνοτρόφοι κλπ) ήταν αρκετά υψηλός. Καταγράφηκε οροθετικότητα σε IgG έναντι της *C. burnettii* της τάξης του 68% (127 θετικά από τα 187 δείγματα που εξετάστηκαν), με cut off σε IgG $\geq 1/120$. Υψηλότερα ποσοστά οροθετικότητας καταγράφηκαν στην επαρχία Αμμοχώστου (89%) και το χαμηλότερο στην επαρχία Λευκωσίας (53%). Τα ποσοστά είναι σημαντικά υψηλά που αναδεικνύουν την συσχέτιση του κινδύνου μόλυνσης σε πληθυσμούς ψηλού κινδύνου. Τα ποσοστά αυτά είναι σαφώς ψηλότερα από την προαναφερόμενη μελέτη που έγινε το 1997 όπου 52,7% δείγματος γενικού πληθυσμού βρέθηκε οροθετικός έναντι της *C. burnettii*, όταν χρησιμοποιήθηκε ως cut off τίτλοι για IgG $\geq 1/60$, ενώ με cut off σε IgG $\geq 1/120$ η οροθετικότητα ήταν 34,3% [Psaroulaki A και άλλοι, 2006]. Είναι ψηλότερο και από τα ποσοστά που είχαν καταγραφεί στη μελέτη του 1997, μετά από κατηγοριοποίηση, σε κατηγορίες επαγγελματιών, αφού τότε από τους συμμετέχοντες που ανήκαν στην κατηγορία επαγγέλματος «Κτηνοτρόφοι, Κτηνίατροι, Σφαγείς» το 80% ήταν οροθετικοί

για IgG αντισώματα, ενώ από αυτούς που ανήκαν στην κατηγορία «Γεωργοκτηνοτρόφοι» το 66,1% ήταν οροθετικοί [Φειδίας Λουκαΐδης, Διδακτορική διατριβή].

Μερικά βασικά συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν για την επιδημιολογία της *Coxiella* στην Κύπρο είναι τα παρακάτω: Η *Coxiella* σχετίζεται κυρίως με τα αιγοπρόβατα και όχι τόσο με τα βοοειδή όπως σε άλλες χώρες της Ευρώπης. Απ' ότι φαίνεται υπάρχει ένας κύκλος του βακτηρίου με επίκεντρο το ποίμνιο και πιο συγκεκριμένα με τα αιγοπρόβατα που φαίνεται να έχουν τον κύριο λόγο στην απέκκριση του βακτηρίου στο περιβάλλον.

Μέσα απ' αυτό τον κύκλο, το βακτήριο συντηρείται αλλά και διασπείρεται μεταδιδόμενο αερογενώς σε μεγάλες αποστάσεις.

Στη διασπορά συμβάλλει και το γεγονός της άμμεσης γεινίασης των χώρων σταυλισμού και της συγκέντρωσης των κτηνοτροφικών μονάδων σε συγκεκριμένες καθορισμένες κτηνοτροφικές περιοχές. Στις περιοχές αυτές υπάρχει αυξημένο μικροβιακό φορτίο και θεωρούνται εν δυνάμει εστίες της *Coxiella*. Εκτεθειμένη κοπριά ή πλημμελής υγιεινή, ειδικά κατά τη διάρκεια του τοκετού των ζώων επιδεινώνει το πρόβλημα. Η ξηρασία των τελευταίων χρόνων είναι πιθανόν να συμβάλλει στη διατήρηση του παθογόνου στη φύση, και στη δημιουργία αερολύματος. Η παραπάνω υπόθεση χρήζει παραπέρα διερεύνησης.

Παράλληλα στον παραπάνω κύκλο φαίνεται να λειτουργεί και ένας άγριος κύκλος που περιλαμβάνει άγρια θηλαστικά και πτηνά και τα εκτοπαράσιτά τους.

Γονοτυπική ανίχνευση της *Coxiella burnetii* έγινε στους κρότωναes που παρασιτούσαν πρόβατα, αίγες, αλλά και βοοειδή. Η *Coxiella burnetii* ανιχνεύθηκε στους κρότωναes *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus bursa*, που αφαιρέθηκαν από αίγες, σε κρότωναes του είδους *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus bursa*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum* που αφαιρέθηκαν από πρόβατα, και από κρότωναes *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Rhipicephalus turanicus* που παρασιτούσαν βοοειδή. Η *Coxiella burnetii* ανιχνεύτηκε επίσης σε *Rhipicephalus sanguineus* και *Rhipicephalus turanicus*, που παρασιτούσαν τα σκυλιά.

Στο 1/4 των αγρινών βρέθηκε θετικό στην PCR για το παθογόνο, το οποίο, επίσης, ανιχνεύθηκε σε όλα σχεδόν τα εκτοπαράσιτα, με εξαίρεση τους κρότωναes *Ixodes gibbosus*, που παρασιτούσαν τα αγρινά, δηλαδή στους κρότωναes *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis sulcata*, *Rhipicephalus turanicus* και *Rhipicephalus bursa*.

Γονοτυπική ανίχνευση της *Coxiella burnetii* έγινε σε λαγούς (48%) καθώς και σε κρότωνα *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus*, *Ixodes ventralloii* που παρασιτούσαν σ' αυτούς.

Η *Coxiella burnetii* επίσης βρέθηκε και σε αλεπούδες (30%), καθώς επίσης και σε κρότωνα *Rhipicephalus turanicus* που αφαιρέθηκαν από τα παραπάνω ζώα

Όσον αφορά τα πτηνά, *Coxiella burnetii* βρέθηκε σε όλες τις επαρχίες της Κύπρου, σε διάφορα είδη, καθώς και στα λιγιστά εκτοπαράσιτα τους (κρότωνα *Ixodes ventralloii*), οι οποίοι βρέθηκαν να παρασιτούν πέρδικες, το μοναδικό είδος πτηνού το οποίο βρέθηκε να παρασιτείται από κρότωνα. Τα πτηνά είναι φορείς του παθογόνου.

Η sequencing analysis των προϊόντων της PCR σε όλες τις περιπτώσεις που ανιχνεύτηκε *Coxiella burnetii* DNA, έδειξε την ύπαρξη του στελέχους RSA 331 και αποκαλύφθηκε ότι το ίδιο στέλεχος κυκλοφορεί σ' όλους τους παράγοντες του κύκλου μετάδοσης

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της έρευνας μας προκύπτει ότι το παθογόνο μεταφέρεται από ένα πολύ μεγάλο φάσμα ειδών κροτώνων αφού ανιχνεύτηκε σε κρότωνα των ειδών *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus bursa*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis sulcata*, *Rhipicephalus sanguineus* και *Ixodes ventralloii* και συμφωνούν απόλυτα με τα γνωστά δεδομένα, ότι δηλαδή η *C. burnetii* μπορεί να μεταδίδεται από περισσότερα από 40 φυσικώς μολυσμένα είδη κροτώνων, οι οποίοι δύνανται να μεταβιβάσουν τον παράγοντα τόσο κάθετα (transtadially ή transovarially στους απογόνους με πιο συχνούς μεταβιβαστές της, κρότωνα που ανήκουν στα γένη *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, και *Dermacentor* [Parola P. και Raoult D., 2001].

Σε παλαιότερη έρευνα που έγινε στην Κύπρο από την ερευνητική ομάδα του καθ/τη Τσελέντη Ιωάννη, αναφέρεται η ανίχνευση της *C. burnetii* σε κρότωνα του είδους *Rhipicephalus sanguineus* και *Hyalomma spp* [Spiridaki I. και άλλοι, 2002; Ιωάννα Σπυριδάκη, Διδακτορική διατριβή], δεδομένα πανομοιότυπα με αυτά της Loftis και των συνεργατών της, οι οποίοι 4 χρόνια μετά στην Αίγυπτο, ανίχνευσαν το παθογόνο σε κρότωνα *Rhipicephalus sanguineus* και *Hyalomma spp* [Loftis AD. και άλλοι, 2006]. Σε έρευνα της Psaroulaki και των συνεργατών της στην Κεφαλονιά, η *C. burnetii* ανιχνεύτηκε επιπλέον σε κρότωνα *R. turanicus*, *D. marginatus*, πέραν αυτών του είδους *H. marginatum marginatum* [Psaroulaki A. και άλλοι, 2006].

Ο ρόλος των κροτώνων στην οικολογία της *C. burnetii* είναι αμφιλεγόμενος. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι κρότωνα συμβάλλουν στη μετάδοση της *C. burnetii* ανάμεσα στα άγρια ζώα, συμβάλλοντας έτσι στη συντήρηση του κύκλου μεταξύ

των άγριων ζώων. Ο ρόλος των κροτώνων στη μετάδοση της *C. burnetii* στον άνθρωπο, φαίνεται να είναι αμελητέος, αφού η μετάδοση γίνεται μέσω του «ποιμνίου», είτε με άμεση επαφή, είτε αερογενώς, και πολύ σπανιότερα πλέον με κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος ή προϊόντων του.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αν συνδυαστούν με εκείνα της προηγούμενης μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν όλες οι προϋποθέσεις και αυξημένος κίνδυνος (risk) για τη μετάδοση της *C. burnetii* στην Κύπρο: μια ευρεία διασπορά τόσο στο ποίμνιο όσο και στον άγριο κύκλο, όπως φαίνεται με τα υψηλά ποσοστά μόλυνσης όλων των ζώων που ελέγχθηκαν, η παρουσία των μολυσμένων με το παθογόνο κροτώνων που τα διασπείρουν στον άγριο κύκλο σε συνδυασμό με την ύπαρξη προϋποθέσεων για την γειτνίαση αυτών των κύκλων, οδηγεί και στην αμφίδρομη ανατροφοδότησή τους και ταυτόχρονα σε αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης του ανθρώπινου πληθυσμού

Η *Coxiella*, είναι ένα ευρέως διαδεδομένο βακτήριο στην Κύπρο, σε τέτοιο βαθμό ώστε να μπορεί να χαρακτηριστεί το νησί σαν υπερενδημική περιοχή.

3. Συμπερασματικά

- Προσδιορίστηκαν τα είδη των κροτώνων που ενδημούν στην Κύπρο, και η γεωγραφική κατανομή τους.
- Κάποια από τα είδη των κροτώνων που εποικούν την Κύπρο παρασιτώντας τόσο τα παραγωγικά ζώα όσο και τα άγρια ζώα είναι εν δυνάμει μεταβιβαστές σημαντικών για την υγεία των ζώων και του ανθρώπου παθογόνων
- Τα μολυσμένα εκτοπαράσιτα λειτούργησαν σαν δείκτης για να εντοπιστεί και να αναδειχτεί το κάθε παθογόνο και υπέδειξαν συγκεκριμένες περιοχές κινδύνου. Προσδιορίστηκε ο ορο-επιπολασμός της *R. conorii*, *A. phagocytophilum* και της *C. burnetii* στα παραγωγικά ζώα και σε δείγμα ανθρώπινου πληθυσμού το οποίο ανήκε στην κατηγορία υψηλού κινδύνου.
- Έγινε γονοτυπική ανίχνευση αναπλασμάτων, ρικετσιακών στελεχών και της *C. burnetii* σε ένα ευρύ φάσμα υποδόχων και μεταβιβαστών
- Ένα γενικό συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι υπάρχουν όλες οι προϋποθέσεις για τη μετάδοση των tick-borne ρικετσιών της *Coxiella burnetii* και των αναπλασμάτων στην Κύπρο.
- Για πρώτη φορά έγινε ανίχνευση και χαρακτηρισμός των ειδών των αναπλασμάτων που «κυκλοφορούν» στην Κύπρο και εκτίμηση της διασποράς τους σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές. Για πρώτη φορά στην Κύπρο αλλά και την Ν.Α Μεσόγειο, περιγράφηκε η παρουσία του *A. ovis*.
- Οι αναπλασμάσεις υφίστανται στην Κύπρο, τόσο στον ανθρώπινο πληθυσμό, όσο και σε ζώα (παραγωγικά και μη) και σε κρότωνες. Στον κύκλο μετάδοσης τους φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο οι αίγες και τα πρόβατα κατά κύριο λόγο, αλλά και τα αγρινά, οι λαγοί και οι αλεπούδες θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως φυσικοί ξενιστές των αναπλασμάτων.
- Επιβεβαιώθηκε η ενδημικότητα των ρικετσιών της ΟΚΠ στην Κύπρο. Οι ρικετσιώσεις συνιστούν ένα συνεχιζόμενο πρόβλημα υγείας για την Κύπρο που στις περισσότερες περιπτώσεις δεν καταγράφεται, γιατί η νόσος δεν διακρίνεται εύκολα στην κλινική πράξη από άλλα εμπύρετα, και υποδιαγιγνώσκεται.
- Περιγράφηκε για πρώτη φορά στην Κύπρο, η παρουσία 2 ειδών ρικετσιών της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών (ΟΚΠ), η *Rickettsia massiliae* και η *Rickettsia aeschlimannii*.
- Ο πυρετός Q εξακολουθεί να αποτελεί πρόβλημα υγείας για την Κύπρο, για ανθρώπους και ζώα, επιβεβαιώνοντας τα δεδομένα παλαιότερων ερευνών . Η *Coxiella burnetii* είναι

ένα ευρέως διαδεδομένο βακτήριο στην Κύπρο, σε τέτοιο βαθμό ώστε να μπορεί να χαρακτηριστεί το νησί σαν υπερενδημική περιοχή.

- Η *Coxiella* σχετίζεται κυρίως με τα αιγοπρόβατα και όχι τόσο με τα βοοειδή όπως σε άλλες χώρες της Ευρώπης. Απ' ότι φαίνεται υπάρχει ένας κύκλος του βακτηρίου με επίκεντρο το ποίμνιο και πιο συγκεκριμένα με τα αιγοπρόβατα που φαίνεται να έχουν τον κύριο λόγο στην απέκκριση του βακτηρίου στο περιβάλλον. Επιπλέον, το παθογόνο μεταφέρεται από ένα πολύ μεγάλο φάσμα ειδών κροτώνων. Τέλος, η ανευρεθείσα μόλυνση των μεταναστευτικών πτηνών έχει ιδιαίτερη σημασία και ενισχύει ακόμη περισσότερο τα προηγούμενα, αφού καταργούν και την ανάγκη ύπαρξης του παράγοντα κινδύνου της γεινίασης, αφού χάρις σε αυτά μπορεί να επιτευχθεί διασπορά του παθογόνου παράγοντα σε μεγάλες αποστάσεις.

Συνοπτικά:

- Από τα συμπεράσματα προκύπτει ότι τα παθογόνα που μελετήθηκαν υπάρχουν και ενδημούν τόσο στον ανθρώπινο πληθυσμό, όσο και σε παραγωγικά ζώα και άγρια ζώα (θηλαστικά και μεταναστευτικά πτηνά), αλλά και στους κρότωνες οι οποίοι αποτελούν σημαντικό κρίκο στην αλυσίδα μετάδοσης των tick-borne ζωνοσών στην Κύπρο.
- Τα αποτελέσματα της μελέτης, θέτουν το πρόβλημα της λήψης μέτρων ελέγχου και πρόληψης και παρέχουν επιδημιολογικά δεδομένα και σημαντική πληροφόρηση για τα είδη των κροτώνων και τη διασπορά τους στην Κύπρο, στοιχείο πολύ σημαντικό για μελλοντικές μελέτες των νόσων που μεταφέρουν/μεταδίδουν. Θα αποτελέσουν επίσης ένα βασικό οδηγό και μοντέλο μελέτης για αποτελεσματικά προγράμματα ελέγχου όχι μόνο των παθογόνων που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αλλά και άλλων παθογόνων που μεταφέρονται από τους κρότωνες. Γνωρίζοντας τα είδη και την οικογεωγραφία των κροτώνων στην Κύπρο, θα είναι πιο εύκολη η πρόληψη, επιτήρηση και ενδεχομένως η πρόβλεψη αναδυόμενων ζωνοσών των οποίων οι κρότωνες αποτελούν μεταβιβαστές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. National Notifiable Diseases Surveillance System. Notifications of Diseases by State and Territory and Year. 2005 [cited 2005 August 24].
2. Ackland JR, Worswick DA, Marmion BP. Vaccine prophylaxis of Q fever. A follow-up study of the efficacy of Q-Vax (CSL) 1985-1990. *Med J Aust.* 1994 Jun 6;160(11):704-8.
3. Aguirre E, Tesouro MA, Ruiz L, Amusatogui I, Sainz A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2006 May;53(4):197-200.
4. Alarcon A, Villanueva JL, Viciano P, Lopez-Cortes L, Torronteras R, Bernabeu M, et al. Q fever: epidemiology, clinical features and prognosis. A study from 1983 to 1999 in the South of Spain. *J Infect.* 2003 Aug;47(2):110-6.
5. Amusatogui I, Sainz A, Tesouro MA. Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:487-90.
6. Anon. Murine typhus, Portugal. *Wkly Epidemiol Rec.* 1998(73):262-3.
7. Anton E, Font B, Munoz T, Sanfeliu I, Segura F. Clinical and laboratory characteristics of 144 patients with mediterranean spotted fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003 Feb;22(2):126-8.
8. Arricau Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet Res.* 2003 Jul-Aug;34(4):423-33.
9. Ayres JG, Wildman M, Groves J, Ment J, Smith EG, Beattie JM. Long-term follow-up of patients from the 1989 Q fever outbreak: no evidence of excess cardiac disease in those with fatigue. *Qjm.* 2002 Aug;95(8):539-46.
10. Babalis T, Tselentis Y, Roux V, Psaroulaki A, Raoult D. Isolation and identification of a rickettsial strain related to *Rickettsia massiliae* in Greek ticks. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Mar;50(3):365-72.
11. Baca OG, Paretsky D. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiol Rev.* 1983 Jun;47(2):127-49.
12. Bacellar F, Beati L, Franca A, Pocas J, Regnery R, Filipe A. Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human disease in Portugal. *Emerg Infect Dis.* 1999 Nov-Dec;5(6):835-6.
13. Bacellar F, Nuncio MS, Alves MJ, Filipe AR. [*Rickettsia slovaca*: an agent of the group of exanthematous fevers, in Portugal]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995 Apr;13(4):218-23.
14. Bacellar F, Regnery RL, Nuncio MS, Filipe AR. Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. *Epidemiol Infect.* 1995 Feb;114(1):169-78.
15. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Jr., Bolger AF, Levison ME, et al. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. *Circulation.* 2005 Jun 14;111(23):e394-434.
16. Badiaga S, Brouqui P, Raoult D. Autochthonous epidemic typhus associated with *Bartonella quintana* bacteremia in a homeless person. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 May;72(5):638-9.
17. Badudieri B. Q fever: A zoonosis. *Adv Vet Sci* 1959(5):81-181.
18. Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis.* 2000 Aug;31(2):554-60.
19. Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:236-47.
20. Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *Jama.* 1994 Jul 20;272(3):212-8.
21. Barralet JH, Parker NR. Q fever in children: an emerging public health issue in Queensland. *Med J Aust.* 2004 Jun 7;180(11):596-7.

22. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File Jr TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2000 Aug;31(2):347-82.
23. Baumann D, Pusterla N, Peter O, Grimm F, Fournier PE, Schar G, et al. [Fever after a tick bite: clinical manifestations and diagnosis of acute tick bite-associated infections in northeastern Switzerland]. Dtsch Med Wochenschr. 2003 May 9;128(19):1042-7.
24. Beati L, Finidori JP, Gilot B, Raoult D. Comparison of serologic typing, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis protein analysis, and genetic restriction fragment length polymorphism analysis for identification of rickettsiae: characterization of two new rickettsial strains. J Clin Microbiol. 1992 Aug;30(8):1922-30.
25. Beati L, Meskini M, Thiers B, Raoult D. Rickettsia aeschlimannii sp. nov., a new spotted fever group rickettsia associated with Hyalomma marginatum ticks. Int J Syst Bacteriol. 1997 Apr;47(2):548-54.
26. Beati L, Raoult D. Rickettsia massiliae sp. nov., a new spotted fever group Rickettsia. Int J Syst Bacteriol. 1993 Oct;43(4):839-40.
27. Beati L, Roux V, Ortuno A, Castella J, Porta FS, Raoult D. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group Rickettsiae isolated from Catalan Rhipicephalus sanguineus ticks. J Clin Microbiol. 1996 Nov;34(11):2688-94.
28. Beck MD, Bell JA, et al. Q fever studies in Southern California; an epidemiological study of 300 cases. Public Health Rep. 1949 Jan 14;64(2):41-56.
29. Bell M, Patel M, Sheridan J. Q fever vaccination in Queensland abattoirs. Commun Dis Intell. 1997 Feb 6;21(3):29-31.
30. Beninati T, Lo N, Noda H, Esposito F, Rizzoli A, Favia G, et al. First detection of spotted fever group rickettsiae in Ixodes ricinus from Italy. Emerg Infect Dis. 2002 Sep;8(9):983-6.
31. Bernabeu-Wittel M, Pachon J, Alarcon A, Lopez-Cortes LF, Viciano P, Jimenez-Mejias ME, et al. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration: a 17-year study in the south of Spain. Arch Intern Med. 1999 Apr 26;159(8):872-6.
32. Bernit E, Pouget J, Janbon F, Dutronc H, Martinez P, Brouqui P, et al. Neurological involvement in acute Q fever: a report of 29 cases and review of the literature. Arch Intern Med. 2002 Mar 25;162(6):693-700.
33. Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of Coxiella burnetii from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. Vet Microbiol. 2000 Mar 15;72(3-4):285-93.
34. Berri M, Souriau A, Crosby M, Crochet D, Lechopier P, Rodolakis A. Relationships between the shedding of Coxiella burnetii, clinical signs and serological responses of 34 sheep. Vet Rec. 2001 Apr 21;148(16):502-5.
35. Bjoersdorff A, Bergstrom S, Massung RF, Haemig PD, Olsen B. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. Emerg Infect Dis. 2001 Sep-Oct;7(5):877-9.
36. Blanco JR, L. Perez-Martinez and M. Vallejo, editor. Prevalence of Rickettsia felis-like and Bartonella spp. in Ctenocephalides felis and Ctenocephalides canis from La Rioja (Northern Spain). 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases; 2005; Logroño, La Rioja, Spain.
37. Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Clin Microbiol Infect. 2002 Dec;8(12):763-72.
38. Boland PJ, Parker NR. Q fever in south west Queensland. Med J Aust. 1999 Oct 18;171(8):446.
39. Bolanos M, Santana OE, Angel-Moreno A, Perez-Arellano JL, Liminana JM, Serra-Majem L, et al. Seroprevalence of infection by Coxiella burnetii in Canary Islands (Spain). Eur J Epidemiol. 2003;18(3):259-62.
40. Boschini A, Di Perri G, Legnani D, Fabbri P, Ballarini P, Zucconi R, et al. Consecutive epidemics of Q fever in a residential facility for drug abusers: impact on persons with human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis. 1999 Apr;28(4):866-72.
41. Botelho-Nevers E, Fournier PE, Richet H, Fenollar F, Lepidi H, Foucault C, et al. Coxiella burnetii infection of aortic aneurysms or vascular grafts: report of 30 new cases and evaluation of outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007 Sep;26(9):635-40.

42. Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *Int J Syst Bacteriol.* 1993 Oct;43(4):777-86.
43. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Dec;10(12):1108-32.
44. Burgdorfer W, Anacker RL, Bird RG, Bertram DS. Intranuclear growth of *Rickettsia rickettsii*. *J Bacteriol.* 1968 Oct;96(4):1415-8.
45. Burnet FM, Freeman M. Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Rev Infect Dis.* 1983 Jul-Aug;5(4):800-8.
46. Camacho MT, Outschoorn I, Kovacova E, Tellez A. Distribution of immunoglobulin G (IgG) and A (IgA) subclasses following Q fever vaccination with soluble phase I *Coxiella burnetii* extract. *Vaccine.* 2000 Mar 6;18(17):1773-7.
47. Cao WC, Zhan L, He J, Foley JE, SJ DEV, Wu XM, et al. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Oct;75(4):664-8.
48. Capuano F, Landolfi MC, Monetti DM. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *Vet Rec.* 2001 Dec 1;149(22):669-71.
49. Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A. Managing Q fever during pregnancy: the benefits of long-term cotrimoxazole therapy. *Clin Infect Dis.* 2007 Sep 1;45(5):548-55.
50. Carrieri MP, Tissot-Dupont H, Rey D, Brousse P, Renard H, Obadia Y, et al. Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Jan;21(1):17-21.
51. Cazorla C, Enea M, Lucht F, Raoult D. First isolation of *Rickettsia slovaca* from a patient, France. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jan;9(1):135.
52. CDC. Summary of notifiable diseases United States. *Morb Mortal Wkly Rep* [serial on the Internet]. 2004.
53. Cetinkaya B, Kalender H, Ertas HB, Muz A, Arslan N, Ongor H, et al. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet Rec.* 2000 Jan 29;146(5):131-6.
54. Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Walker DH. Identification of the antigenic constituents of *Ehrlichia chaffeensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Jan;50(1):52-8.
55. Chochlakis D, Ioannou I, Kokkini I, Tselentis Y, Psaroulaki A. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in a high-risk human population. *J Infect.* 2009 Jan;58(1):87-8.
56. Chochlakis D, Ioannou I, Sharif L, Kokkini S, Hristophi N, Dimitriou T, et al. Prevalence of *Anaplasma* sp. in goats and sheep in Cyprus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009 Oct;9(5):457-63.
57. Chochlakis D, Koliou M, Ioannou I, Tselentis Y, Psaroulaki A. Kawasaki disease and *Anaplasma* sp. infection of an infant in Cyprus. *Int J Infect Dis.* 2009 Mar;13(2):e71-3.
58. Chochlakis D, Papaeustathiou A, Minadakis G, Psaroulaki A, Tselentis Y. A serosurvey of *Anaplasma phagocytophilum* in blood donors in Crete, Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 Jun;27(6):473-5.
59. Chomel BB, Kasten RW, Sykes JE, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:267-78.
60. Christova I, Van De Pol J, Yazar S, Velo E, Schouls L. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group *Rickettsiae* in ticks from Southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003 Sep;22(9):535-42.
61. Cinco M, Barbone F, Grazia Ciufolini M, Mascioli M, Anguero Rosenfeld M, Stefanel P, et al. Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Dec;10(12):1056-61.
62. Cowdry EV. A New (Ninth) Edition of Lee's "the Microtome's Vademecum". *Science.* 1926 Jul 23;64(1647):91.

63. Dalton MJ, Clarke MJ, Holman RC, Krebs JW, Fishbein DB, Olson JG, et al. National surveillance for Rocky Mountain spotted fever, 1981-1992: epidemiologic summary and evaluation of risk factors for fatal outcome. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 May;52(5):405-13.
64. Daniels TJ, Battaly GR, Liveris D, Falco RC, Schwartz I. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? *Emerg Infect Dis.* 2002 Dec;8(12):1524-5.
65. de la Fuente J, Atkinson MW, Hogg JT, Miller DS, Naranjo V, Almazan C, et al. Genetic characterization of *Anaplasma ovis* strains from bighorn sheep in Montana. *J Wildl Dis.* 2006 Apr;42(2):381-5.
66. de la Fuente J, Atkinson MW, Naranjo V, Fernandez de Mera IG, Mangold AJ, Keating KA, et al. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma ovis* strains. *Vet Microbiol.* 2007 Jan 31;119(2-4):375-81.
67. de la Fuente J, Torina A, Naranjo V, Caracappa S, Di Marco V, Alongi A, et al. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a seronegative patient in Sicily, Italy: case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2005;4:15.
68. de la Fuente J, Van Den Bussche RA, Garcia-Garcia JC, Rodriguez SD, Garcia MA, Guglielmone AA, et al. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet Microbiol.* 2002 Sep 2;88(3):275-85.
69. De La Fuente J, Vicente J, Hofle U, Ruiz-Fons F, Fernandez De Mera IG, Van Den Bussche RA, et al. *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *Vet Microbiol.* 2004 Jun 3;100(3-4):163-73.
70. de Sousa R, Ismail N, Doria-Nobrega S, Costa P, Abreu T, Franca A, et al. The presence of eschars, but not greater severity, in Portuguese patients infected with Israeli spotted fever. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1063:197-202.
71. de Sousa R, Nobrega SD, Bacellar F, Torgal J. Mediterranean spotted fever in Portugal: risk factors for fatal outcome in 105 hospitalized patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:285-94.
72. Demma LJ, Holman RC, McQuiston JH, Krebs JW, Swerdlow DL. Epidemiology of human ehrlichiosis and anaplasmosis in the United States, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Aug;73(2):400-9.
73. Derrick E. The Query Fever-the Elkington Oration. *Queensland Health* 1964(1):1-20.
74. Derrick EH. "Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Rev Infect Dis.* 1983 Jul-Aug;5(4):790-800.
75. Dolce P, Belanger MJ, Tumanowicz K, Gauthier CP, Jutras P, Masse R, et al. *Coxiella burnetii* seroprevalence of shepherds and their flocks in the lower Saint-Lawrence River region of Quebec, Canada. *Can J Infect Dis.* 2003 Mar;14(2):97-102.
76. Duh D, Punda-Polic V, Trilar T, Petrovec M, Bradaric N, Avsic-Zupanc T. Molecular identification of *Rickettsia felis*-like bacteria in *Haemaphysalis sulcata* ticks collected from domestic animals in southern Croatia. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:347-51.
77. Dumler JS. *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1063:361-73.
78. Dumler JS, Bakken JS. Human ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks. *Annu Rev Med.* 1998;49:201-13.
79. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 Nov;51(Pt 6):2145-65.
80. Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis.* 2005 Dec;11(12):1828-34.
81. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis.* 2007 Jul 15;45 Suppl 1:S45-51.
82. Dumler S. Q fever. *Curr Treat Options Infect Dis* 2002(4):437-45.

83. Dupont HT, Cornet JP, Raoult D. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Mar;50(3):373-80.
84. Dupuis G, Peter O, Pedroni D, Petite J. [Clinical aspects observed during an epidemic of 415 cases of Q fever]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1985 Jun 15;115(24):814-8.
85. Dupuis G, Petite J, Peter O, Vouilloz M. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *Int J Epidemiol.* 1987 Jun;16(2):282-7.
86. Enright JB, Longhurst WM, Franti CE, Behymer DE, Dutson VJ, Wright ME. *Coxiella burnetii* in a wildlife-livestock environment. Isolations of rickettsiae from sheep and cattle. *Am J Epidemiol.* 1971 Jul;94(1):72-8.
87. Eremeeva ME, Roux V, Raoult D. Determination of genome size and restriction pattern polymorphism of *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi* by pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett.* 1993 Aug 15;112(1):105-12.
88. Estrada-Pena A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol.* 1999 Sep;23(9):685-715.
89. Fenollar F, Fournier PE, Carrieri MP, Habib G, Messina T, Raoult D. Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2001 Aug 1;33(3):312-6.
90. Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *Apmis.* 2004 Nov-Dec;112(11-12):785-807.
91. Fenollar F, Thuny F, Xeridat B, Lepidi H, Raoult D. Endocarditis after acute Q fever in patients with previously undiagnosed valvulopathies. *Clin Infect Dis.* 2006 Mar 15;42(6):818-21.
92. Fernandez-Soto P, Encinas-Grandes A, Perez-Sanchez R. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jul;9(7):889-90.
93. Field PR, Mitchell JL, Santiago A, Dickeson DJ, Chan SW, Ho DW, et al. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with immunofluorescence and complement fixation tests for detection of *Coxiella burnetii* (Q fever) immunoglobulin M. *J Clin Microbiol.* 2000 Apr;38(4):1645-7.
94. Field PR, Santiago A, Chan SW, Patel DB, Dickeson D, Mitchell JL, et al. Evaluation of a novel commercial enzyme-linked immunosorbent assay detecting *Coxiella burnetii*-specific immunoglobulin G for Q fever prevaccination screening and diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3526-9.
95. Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurti TJ, Munderloh UG, Wilske B. Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J Clin Microbiol.* 1997 Dec;35(12):3244-7.
96. Fishbein DB, Raoult D. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 Jul;47(1):35-40.
97. Fournier PE, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Brouqui P, Raoult D. Aneuruptic fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J Clin Microbiol.* 2004 Feb;42(2):816-8.
98. Fournier PE, Durand JP, Rolain JM, Camicas JL, Tolou H, Raoult D. Detection of Astrakhan fever rickettsia from ticks in Kosovo. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:158-61.
99. Fournier PE, Etienne J, Harle JR, Habib G, Raoult D. Myocarditis, a rare but severe manifestation of Q fever: report of 8 cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001 May 15;32(10):1440-7.
100. Fournier PE, Gouriet F, Brouqui P, Lucht F, Raoult D. Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2005 May 15;40(10):1435-44.
101. Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis.* 2000 Jul-Aug;6(4):389-92.
102. Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol.* 1998 Jul;36(7):1823-34.

103. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol.* 2003 Nov;41(11):5094-8.
104. Fournier PE, Roux V, Caumes E, Donzel M, Raoult D. Outbreak of *Rickettsia africae* infections in participants of an adventure race in South Africa. *Clin Infect Dis.* 1998 Aug;27(2):316-23.
105. Fournier PE, Tissot-Dupont H, Gallais H, Raoult DR. *Rickettsia mongolotimonae*: a rare pathogen in France. *Emerg Infect Dis.* 2000 May-Jun;6(3):290-2.
106. Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, Dyer TA, et al. The phylogeny of prokaryotes. *Science.* 1980 Jul 25;209(4455):457-63.
107. Friedhoff KT. Tick-borne diseases of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parassitologia.* 1997 Jun;39(2):99-109.
108. Fries LF, Waag DM, Williams JC. Safety and immunogenicity in human volunteers of a chloroform-methanol residue vaccine for Q fever. *Infect Immun.* 1993 Apr;61(4):1251-8.
109. Gage KL, Gilmore RD, Karstens RH, Schwan TG. Detection of *Rickettsia rickettsii* in saliva, hemolymph and triturated tissues of infected *Dermacentor andersoni* ticks by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* 1992 Aug;6(4):333-41.
110. Gage KL, Schrumph ME, Karstens RH, Burgdorfer W, Schwan TG. DNA typing of rickettsiae in naturally infected ticks using a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism system. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Feb;50(2):247-60.
111. Gami AS, Antonios VS, Thompson RL, Chaliki HP, Ammash NM. Q fever endocarditis in the United States. *Mayo Clin Proc.* 2004 Feb;79(2):253-7.
112. Garcia-Perez AL, Barandika J, Oporto B, Povedano I, Juste RA. *Anaplasma phagocytophila* as an abortifacient agent in sheep farms from northern Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:429-32.
113. Garner MG, Longbottom HM, Cannon RM, Plant AJ. A review of Q fever in Australia 1991-1994. *Aust N Z J Public Health.* 1997 Dec;21(7):722-30.
114. Ge Y, Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* delays spontaneous human neutrophil apoptosis by modulation of multiple apoptotic pathways. *Cell Microbiol.* 2006 Sep;8(9):1406-16.
115. Giammanco GM, Mansueto S, Ammatuna P, Vitale G. Israeli spotted fever *Rickettsia* in Sicilian *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jul;9(7):892-3.
116. Gikas A, Doukakis S, Pediaditis J, Kastanakis S, Psaroulaki A, Tselentis Y. Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical, and therapeutic data from 83 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 May-Jun;96(3):250-3.
117. Gikas A, Kofteridis D, Bouros D, Voloudaki A, Tselentis Y, Tsaparas N. Q fever pneumonia: appearance on chest radiographs. *Radiology.* 1999 Feb;210(2):339-43.
118. Gikas A, Kofteridis DP, Manios A, Pediaditis J, Tselentis Y. Newer macrolides as empiric treatment for acute Q fever infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Dec;45(12):3644-6.
119. Gilot B, Laforge ML, Pichot J, Raoult D. Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and Mediterranean spotted fever epidemiology in France. *Eur J Epidemiol.* 1990 Dec;6(4):357-62.
120. Gimenez DF. Staining *Rickettsiae* in Yolk-Sac Cultures. *Stain Technol.* 1964 May;39:135-40.
121. Goethert HK, Telford SR, 3rd. Enzootic transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis among cottontail rabbits. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Jun;68(6):633-7.
122. Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Kurti TJ, et al. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med.* 1996 Jan 25;334(4):209-15.
123. Greenslade E, Beasley R, Jennings L, Woodward A, Weinstein P. Has *Coxiella burnetii* (Q fever) been introduced into New Zealand? *Emerg Infect Dis.* 2003 Jan;9(1):138-40.
124. Groen J, Koraka P, Nur YA, Avsic-Zupanc T, Goessens WH, Ott A, et al. Serologic evidence of ehrlichiosis among humans and wild animals in The Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Jan;21(1):46-9.
125. Hackstadt T, Williams JC. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 May;78(5):3240-4.

126. Halle S, Dasch GA, Weiss E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against typhus rickettsiae, *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi*. *J Clin Microbiol.* 1977 Aug;6(2):101-10.
127. Hartzell JD, Peng SW, Wood-Morris RN, Sarmiento DM, Collen JF, Robben PM, et al. Atypical Q fever in US soldiers. *Emerg Infect Dis.* 2007 Aug;13(8):1247-9.
128. Hatchette TF, Hayes M, Merry H, Schlech WF, Marrie TJ. The effect of *C. burnetii* infection on the quality of life of patients following an outbreak of Q fever. *Epidemiol Infect.* 2003 Jun;130(3):491-5.
129. Hatchette TF, Hudson RC, Schlech WF, Campbell NA, Hatchette JE, Ratnam S, et al. Goat-associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerg Infect Dis.* 2001 May-Jun;7(3):413-9.
130. Hawker JI, Ayres JG, Blair I, Evans MR, Smith DL, Smith EG, et al. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Commun Dis Public Health.* 1998 Sep;1(3):180-7.
131. Hechemy KE, Oteo JA, Raoult D, Silverman DJ, Blanco JR. A century of rickettsiology: emerging, reemerging rickettsioses, clinical, epidemiologic, and molecular diagnostic aspects and emerging veterinary rickettsioses: an overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:1-14.
132. Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 1999 Apr;7(4):149-54.
133. Heinzen RA, Hayes SF, Peacock MG, Hackstadt T. Directional actin polymerization associated with spotted fever group *Rickettsia* infection of Vero cells. *Infect Immun.* 1993 May;61(5):1926-35.
134. Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis.* 2001 Sep-Oct;7(5):789-96.
135. Hernandez Cabrera M, Angel-Moreno A, Santana E, Bolanos M, Frances A, Martin-Sanchez MS, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2004 Apr;10(4):740-3.
136. Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1063:374-82.
137. Hickie I, Davenport T, Wakefield D, Vollmer-Conna U, Cameron B, Vernon SD, et al. Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study. *Bmj.* 2006 Sep 16;333(7568):575.
138. Hilbink F, Penrose M, Kovacova E, Kazar J. Q fever is absent from New Zealand. *Int J Epidemiol.* 1993 Oct;22(5):945-9.
139. Hirai K, To H. Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. *J Vet Med Sci.* 1998 Jul;60(7):781-90.
140. Hofle U, Vicente J, Nagore D, Hurtado A, Pena A, de la Fuente J, et al. The risks of translocating wildlife. Pathogenic infection with *Theileria* sp. and *Elaeophora elaphi* in an imported red deer. *Vet Parasitol.* 2004 Dec 30;126(4):387-95.
141. Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, Gonczi E, Deplazes P, Braun U, et al. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug;42(8):3775-80.
142. Horowitz HW, Aguero-Rosenfeld ME, McKenna DF, Holmgren D, Hsieh TC, Varde SA, et al. Clinical and laboratory spectrum of culture-proven human granulocytic ehrlichiosis: comparison with culture-negative cases. *Clin Infect Dis.* 1998 Nov;27(5):1314-7.
143. Horowitz HW, Hsieh TC, Aguero-Rosenfeld ME, Kalantarpour F, Chowdhury I, Wormser GP, et al. Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Mar;45(3):786-8.
144. Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Aguero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, et al. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med.* 1998 Aug 6;339(6):375-8.
145. Howe D, Mallavia LP. *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):3815-21.

146. Hubalek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis.* 2004 Oct;40(4):639-59.
147. Hubalek Z, Juricova Z, Svobodova S, Halouzka J. A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *J Wildl Dis.* 1993 Oct;29(4):604-7.
148. Hulinska D, Langrova K, Pejcoch M, Pavlasek I. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. *Apmis.* 2004 Apr-May;112(4-5):239-47.
149. Humphres RC, Hinrichs DJ. Role of antibody in *Coxiella burnetii* infection. *Infect Immun.* 1981 Feb;31(2):641-5.
150. Inokuma H, Brouqui P, Drancourt M, Raoult D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *J Clin Microbiol.* 2001 Sep;39(9):3031-9.
151. Inokuma H, Fujii K, Okuda M, Onishi T, Beaufile JP, Raoult D, et al. Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon *groESL* and the citrate synthase gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Sep;9(5):1132-6.
152. Inokuma H, Parola P, Raoult D, Brouqui P. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Vet Parasitol.* 2001 Aug 31;99(4):335-9.
153. Jager C, Willems H, Thiele D, Baljer G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol Infect.* 1998 Mar;120(2):157-64.
154. Jensenius M, Hasle G, Henriksen AZ, Vene S, Raoult D, Bruu AL, et al. African tick-bite fever imported into Norway: presentation of 8 cases. *Scand J Infect Dis.* 1999;31(2):131-3.
155. Jensenius M, Hoel T, Raoult D, Fournier PE, Kjelshus H, Bruu AL, et al. Seroepidemiology of *Rickettsia africae* infection in Norwegian travellers to rural Africa. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(2):93-6.
156. Jensenius M, Parola P, Raoult D. Threats to international travellers posed by tick-borne diseases. *Travel Med Infect Dis.* 2006 Jan;4(1):4-13.
157. Jorm LR, Lightfoot NF, Morgan KL. An epidemiological study of an outbreak of Q fever in a secondary school. *Epidemiol Infect.* 1990 Jun;104(3):467-77.
158. Kanfer E, Farrag N, Price C, MacDonald D, Coleman J, Barrett AJ. Q fever following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1988 Mar;3(2):165-6.
159. Kaplan MM, Bertagna P. The geographical distribution of Q fever. *Bull World Health Organ.* 1955;13(5):829-60.
160. Kazar J. Q fever: current concept. In: Raoult D, P. Brouqui, editor. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millennium.* New York: Elsevier; 1999. p. 304-19.
161. Kelly DJ, Richards AL, Temenak J, Strickman D, Dasch GA. The past and present threat of rickettsial diseases to military medicine and international public health. *Clin Infect Dis.* 2002 Jun 15;34(Suppl 4):S145-69.
162. Kelly HB. Q fever in Cyprus report of cases and a survey of United Nations personnel. *Int J Epidemiol.* 1974 Mar;3(1):47-53.
163. Kelly PJ, Beati L, Mason PR, Matthewman LA, Roux V, Raoult D. *Rickettsia africae* sp. nov., the etiological agent of African tick bite fever. *Int J Syst Bacteriol.* 1996 Apr;46(2):611-4.
164. Kenny MJ, Birtles RJ, Day MJ, Shaw SE. *Rickettsia felis* in the United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug;9(8):1023-4.
165. Kermod M, Yong K, Hurley S, Marmion B. An economic evaluation of increased uptake in Q fever vaccination among meat and agricultural industry workers following implementation of the National Q Fever Management Program. *Aust N Z J Public Health.* 2003;27(4):390-8.
166. Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun.* 1990 Apr;58(4):1117-9.
167. Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Dubovi E. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg Infect Dis.* 2005 Apr;11(4):619-21.
168. Kocan KM, de la Fuente J. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 2003 Mar 25;112(4):295-305.
169. Komitova R, Lakos A, Aleksandrov A, Christova I, Murdjeva M. A case of tick-transmitted lymphadenopathy in Bulgaria associated with *Rickettsia slovaca*. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(3):213.

170. Komiya T, Sadamasu K, Toriniwa H, Kato K, Arashima Y, Fukushi H, et al. Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. *J Infect Chemother*. 2003 Jun;9(2):151-5.
171. Korch G. Geographic dissemination of tick-borne zoonoses. In: Sonenshine D, TN, Mather editor. *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. New York: Oxford University Press; 1994. p. 139-97.
172. Kovacova E, Kazar J. Q fever--still a query and underestimated infectious disease. *Acta Virol*. 2002;46(4):193-210.
173. Krause PJ, Telford SR, 3rd, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *Jama*. 1996 Jun 5;275(21):1657-60.
174. Krause PJ, Wormser GP. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis? *Jama*. 2008 Nov 19;300(19):2308-9.
175. Kuttler KL. Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review. *J Wildl Dis*. 1984 Jan;20(1):12-20.
176. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*. 1997 Nov;35(11):2715-27.
177. Lakos A. Tick-borne lymphadenopathy--a new rickettsial disease? *Lancet*. 1997 Oct 4;350(9083):1006.
178. Lakos A. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA). *Wien Klin Wochenschr*. 2002 Jul 31;114(13-14):648-54.
179. Lambert M, Dugernier T, Bigaignon G, Rahier J, Piot P. Mediterranean spotted fever in Belgium. *Lancet*. 1984 Nov 3;2(8410):1038.
180. Landais C, Fenollar F, Thuny F, Raoult D. From acute Q fever to endocarditis: serological follow-up strategy. *Clin Infect Dis*. 2007 May 15;44(10):1337-40.
181. Lane S. Competence of ticks as vectors of microbial agents with an emphasis on *Borrelia burgdorferi*. In: Sonenshine D, TN, Mather editor. *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. New York: Oxford University Press; 1994. p. 45-67.
182. Lang GH. Serosurvey on the occurrence of *Coxiella burnetii* in Ontario cattle. *Can J Public Health*. 1988 Jan-Feb;79(1):56-9.
183. Lang GH. Coxiellosis (Q fever) in animals. In: Marrie TJ, editor. *Q Fever: The Disease*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 23-48.
184. Langley JM, Marrie TJ, Covert A, Waag DM, Williams JC. Poker players' pneumonia. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. *N Engl J Med*. 1988 Aug 11;319(6):354-6.
185. Langley JM, Marrie TJ, Leblanc JC, Almudevar A, Resch L, Raoult D. *Coxiella burnetii* seropositivity in parturient women is associated with adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Jul;189(1):228-32.
186. Lawrence G, Menzies R, Burgess M, McIntyre P, Wood N, Boyd I, et al. Surveillance of adverse events following immunisation: Australia, 2000-2002. *Commun Dis Intell*. 2003;27(3):307-23.
187. Leiby DA, Chung AP, Cable RG, Trouern-Trend J, McCullough J, Homer MJ, et al. Relationship between tick bites and the seroprevalence of *Babesia microti* and *Anaplasma phagocytophila* (previously *Ehrlichia* sp.) in blood donors. *Transfusion*. 2002 Dec;42(12):1585-91.
188. Leone M, Honstetter A, Lepidi H, Capo C, Bayard F, Raoult D, et al. Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17beta-estradiol. *J Infect Dis*. 2004 Jan 15;189(2):339-45.
189. Lepidi H, Houpiqian P, Liang Z, Raoult D. Cardiac valves in patients with Q fever endocarditis: microbiological, molecular, and histologic studies. *J Infect Dis*. 2003 Apr 1;187(7):1097-106.
190. Leung-Shea C, Danaher PJ. Q fever in members of the United States armed forces returning from Iraq. *Clin Infect Dis*. 2006 Oct 15;43(8):e77-82.
191. Levy PY, Carrieri P, Raoult D. *Coxiella burnetii* pericarditis: report of 15 cases and review. *Clin Infect Dis*. 1999 Aug;29(2):393-7.

192. Levy PY, Drancourt M, Etienne J, Auvergnat JC, Beytout J, Sainty JM, et al. Comparison of different antibiotic regimens for therapy of 32 cases of Q fever endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991 Mar;35(3):533-7.
193. Lew AE, Gale KR, Minchin CM, Shkap V, de Waal DT. Phylogenetic analysis of the erythrocytic *Anaplasma* species based on 16S rDNA and GroEL (HSP60) sequences of *A. marginale*, *A. centrale*, and *A. ovis* and the specific detection of *A. centrale* vaccine strain. *Vet Microbiol.* 2003 Mar 20;92(1-2):145-60.
194. Liu Z, Luo J, Bai Q, Ma M, Guan G, Yin H. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in China for phylogenetic analysis. *Vet Microbiol.* 2005 Apr 25;107(1-2):145-8.
195. Loebermann M, Fingerle V, Lademann M, Fritzsche C, Reisinger EC. *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* coinfection. *Emerg Infect Dis.* 2006 Feb;12(2):353-5.
196. Loftis AD, Reeves WK, Szumlas DE, Abbassy MM, Helmy IM, Moriarity JR, et al. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp Appl Acarol.* 2006;40(1):67-81.
197. Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, Logar M, Strle F. Epidemiological, clinical and laboratory distinction between human granulocytic ehrlichiosis and the initial phase of tick-borne encephalitis. *Wien Klin Wochenschr.* 2002 Jul 31;114(13-14):636-40.
198. Lovey PY, Morabia A, Bleed D, Peter O, Dupuis G, Petite J. Long term vascular complications of *Coxiella burnetii* infection in Switzerland: cohort study. *Bmj.* 1999 Jul 31;319(7205):284-6.
199. Madariaga MG. Q fever wildlife reservoir. *Emerg Infect Dis.* 2005 May;11(5):776-7.
200. Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):709-21.
201. Mak DB, Fry DF, Bulsara MK. Prevalence of markers of Q fever exposure in the Kimberley, Western Australia. *Commun Dis Intell.* 2003;27(2):267-71.
202. Maltezou HC, Raoult D. Q fever in children. *Lancet Infect Dis.* 2002 Nov;2(11):686-91.
203. Marmion BP. Q fever: recent developments and some unsolved problems. *Proc R Soc Med.* 1959 Aug;52:613-6.
204. Marmion BP. Q fever trilogy morbidity--deadends--stark choices. *Aust N Z J Public Health.* 1997 Dec;21(7):677-80.
205. Marmion BP, Ormsbee RA, Kyrkou M, Wright J, Worswick DA, Izzo AA, et al. Vaccine prophylaxis of abattoir-associated Q fever: eight years' experience in Australian abattoirs. *Epidemiol Infect.* 1990 Apr;104(2):275-87.
206. Marmion BP, Shannon M, Maddocks I, Storm P, Penttila I. Protracted debility and fatigue after acute Q fever. *Lancet.* 1996 Apr 6;347(9006):977-8.
207. Marmion BP, Stoker MG. Q fever in Great Britain. Epidemiology of an outbreak. *Lancet.* 1950 Nov 25;2(6639):611-6.
208. Marmion BP, Storm PA, Ayres JG, Semendric L, Mathews L, Winslow W, et al. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* after acute primary Q fever. *Qjm.* 2005 Jan;98(1):7-20.
209. Marquez FJ, Muniain MA, Perez JM, Pachon J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe. *Emerg Infect Dis.* 2002 Jan;8(1):89-91.
210. Marrero M, Raoult D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Feb;40(2):197-9.
211. Marrie TJ. Q fever - a review. *Can Vet J.* 1990 Aug;31(8):555-63.
212. Marrie TJ. *Coxiella burnetii* pneumonia. *Eur Respir J.* 2003 Apr;21(4):713-9.
213. Marrie TJ, Embil J, Yates L. Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* among wildlife in Nova Scotia. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Nov;49(5):613-5.
214. Marrie TJ, MacDonald A, Durant H, Yates L, McCormick L. An outbreak of Q fever probably due to contact with a parturient cat. *Chest.* 1988 Jan;93(1):98-103.
215. Marrie TJ, Pollak PT. Seroepidemiology of Q fever in Nova Scotia: evidence for age dependent cohorts and geographical distribution. *Eur J Epidemiol.* 1995 Feb;11(1):47-54.
216. Marrie TJ, Raoult D. Q fever-a review and issues for the next century. *Int J Antimicrob Agents.* 1997;8(3):145-61.
217. Marrie TJ, Stein A, Janigan D, Raoult D. Route of infection determines the clinical manifestations of acute Q fever. *J Infect Dis.* 1996 Feb;173(2):484-7.

218. Mather T, SG, Howard Vector-host-pathogen relationships: transmission dynamics of tick-borne infections. In: Sonenshine D, TN, Mather editor. Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. New York: Oxford University Press; 1994. p. 68–90.
219. Matsumoto K, Joncour G, Davoust B, Pitel PH, Chauzy A, Collin E, et al. Anaplasma phagocytophilum infection in cattle in France. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1078:491-4.
220. Matsumoto K, Parola P, Brouqui P, Raoult D. Rickettsia aeschlimannii in Hyalomma ticks from Corsica. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004 Sep;23(9):732-4.
221. Maurin M, Benoliel AM, Bongrand P, Raoult D. Phagolysosomal alkalinization and the bactericidal effect of antibiotics: the Coxiella burnetii paradigm. J Infect Dis. 1992 Nov;166(5):1097-102.
222. Maurin M, Raoult D. In vitro susceptibilities of spotted fever group rickettsiae and Coxiella burnetii to clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother. 1993 Dec;37(12):2633-7.
223. Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev. 1999 Oct;12(4):518-53.
224. McDade JE. Historical aspects of Q fever. In: Marrie TJ, editor. Q fever, the disease. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 6-21.
225. McQuiston JH, Childs JE. Q fever in humans and animals in the United States. Vector Borne Zoonotic Dis. 2002 Fall;2(3):179-91.
226. McQuiston JH, Holman RC, McCall CL, Childs JE, Swerdlow DL, Thompson HA. National surveillance and the epidemiology of human Q fever in the United States, 1978-2004. Am J Trop Med Hyg. 2006 Jul;75(1):36-40.
227. Milazzo A, Hall R, Storm PA, Harris RJ, Winslow W, Marmion BP. Sexually transmitted Q fever. Clin Infect Dis. 2001 Aug 1;33(3):399-402.
228. Moos A, Hackstadt T. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of Coxiella burnetii in the guinea pig model. Infect Immun. 1987 May;55(5):1144-50.
229. Mossienko EV, Tokarevich NK, Suvorov AN, Totolian AA. Detection of Coxiella burnetii by PCR in mice after administration of live M-44 vaccine. Folia Microbiol (Praha). 2003;48(1):103-4.
230. Muramatsu Y, Yanase T, Okabayashi T, Ueno H, Morita C. Detection of Coxiella burnetii in cow's milk by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay combined with a novel sample preparation method. Appl Environ Microbiol. 1997 Jun;63(6):2142-6.
231. Murphy AM, Field PR. The persistence of complement-fixing antibodies to Q-fever (Coxiella burnetii) after infection. Med J Aust. 1970 Jun 6;1(23):1148-50.
232. Naranjo V, Ruiz-Fons F, Hofle U, Fernandez de Mera IG, Villanua D, Almazan C, et al. Molecular epidemiology of human and bovine anaplasmosis in southern Europe. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1078:95-9.
233. Niang M, Brouqui P, Raoult D. Epidemic typhus imported from Algeria. Emerg Infect Dis. 1999 Sep-Oct;5(5):716-8.
234. Nicholson WL, Comer JA, Sumner JW, Gingrich-Baker C, Coughlin RT, Magnarelli LA, et al. An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 1997 Jun;35(6):1510-6.
235. Niebylski ML, Peacock MG, Schwan TG. Lethal effect of Rickettsia rickettsii on its tick vector (Dermacentor andersoni). Appl Environ Microbiol. 1999 Feb;65(2):773-8.
236. Niebylski ML, Schrupf ME, Burgdorfer W, Fischer ER, Gage KL, Schwan TG. Rickettsia peacockii sp. nov., a new species infecting wood ticks, Dermacentor andersoni, in western Montana. Int J Syst Bacteriol. 1997 Apr;47(2):446-52.
237. Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C. Association of Rickettsia helvetica with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. Lancet. 1999 Oct 2;354(9185):1169-73.
238. Nilsson K, Pahlson C, Lukinius A, Eriksson L, Nilsson L, Lindquist O. Presence of Rickettsia helvetica in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. J Infect Dis. 2002 Apr 15;185(8):1128-38.
239. Nourse C, Allworth A, Jones A, Horvath R, McCormack J, Bartlett J, et al. Three cases of Q fever osteomyelitis in children and a review of the literature. Clin Infect Dis. 2004 Oct 1;39(7):e61-6.
240. Oda H, Yoshiie K. Isolation of a Coxiella burnetii strain that has low virulence for mice from a patient with acute Q fever. Microbiol Immunol. 1989;33(11):969-73.

241. Ormsbee RA. The growth of *Coxiella burnetii* in embryonated eggs. *J Bacteriol.* 1952 Jan;63(1):73-86.
242. Ormsbee RA, B. P. Marmion. Prevention of *Coxiella burnetii* infection: vaccines and guidelines for those at risk. In: Marrie TJ, editor. *Q fever, the disease.* Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 226-48.
243. Osorio S, Sarria C, Gonzalez-Ruano P, Casal EC, Garcia A. Nosocomial transmission of Q fever. *J Hosp Infect.* 2003 Jun;54(2):162-3.
244. Oster CN, Burke DS, Kenyon RH, Ascher MS, Harber P, Pedersen CE, Jr. Laboratory-acquired Rocky Mountain spotted fever. The hazard of aerosol transmission. *N Engl J Med.* 1977 Oct 20;297(16):859-63.
245. Oteo JA, Estrada-Pena A, Ortega-Perez C, Martinez de Artola V. Mediterranean spotted fever: a preliminary tick field study. *Eur J Epidemiol.* 1996 Oct;12(5):475-8.
246. Oteo JA, Ibarra V. [DEBONEL (Dermacentor-borne-necrosis-erythemalymphadenopathy). A new tick-borne disease?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002 Feb;20(2):51-2.
247. Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR, Martinez de Artola V, Marquez FJ, Portillo A, et al. Dermacentor-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Apr;10(4):327-31.
248. Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR, Metola L, Vallejo M, De Artola VM. Epidemiological and clinical differences among DEBONEL-TIBOLA and other tick-borne diseases in Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:391-2.
249. Ozturk MK, Gunes T, Kose M, Coker C, Radulovic S. Rickettsialpox in Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2003 Nov;9(11):1498-9.
250. Palmer GH, Abbott JR, French DM, McElwain TF. Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the msp-2 and msp-3 multigene families within the genus *Anaplasma.* *Infect Immun.* 1998 Dec;66(12):6035-9.
251. Pancholi P, Kolbert CP, Mitchell PD, Reed KD, Jr., Dumler JS, Bakken JS, et al. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis.* 1995 Oct;172(4):1007-12.
252. Pantanowitz L, Telford SR, Cannon ME. Tick-borne diseases in transfusion medicine. *Transfus Med.* 2002 Apr;12(2):85-106.
253. Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. *Lancet.* 2006 Feb 25;367(9511):679-88.
254. Parola P, Beati L, Cambon M, Raoult D. First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998 Feb;17(2):95-100.
255. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res.* 2005 May-Jun;36(3):469-92.
256. Parola P, Inokuma H, Camicas JL, Brouqui P, Raoult D. Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in African ticks. *Emerg Infect Dis.* 2001 Nov-Dec;7(6):1014-7.
257. Parola P, Jourdan J, Raoult D. Tick-borne infection caused by *Rickettsia africae* in the West Indies. *N Engl J Med.* 1998 May 7;338(19):1391.
258. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 2001 Mar 15;32(6):897-928.
259. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(11):e338.
260. Parola P, Vestris G, Martinez D, Brochier B, Roux V, Raoult D. Tick-borne rickettiosis in Guadeloupe, the French West Indies: isolation of *Rickettsia africae* from *Amblyomma variegatum* ticks and serosurvey in humans, cattle, and goats. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Jun;60(6):888-93.
261. Penttila IA, Harris RJ, Storm P, Haynes D, Worswick DA, Marmion BP. Cytokine dysregulation in the post-Q-fever fatigue syndrome. *Qjm.* 1998 Aug;91(8):549-60.
262. Peter O, Raoult D, Gilot B. Isolation by a sensitive centrifugation cell culture system of 52 strains of spotted fever group rickettsiae from ticks collected in France. *J Clin Microbiol.* 1990 Jul;28(7):1597-9.
263. Petrovec M, Lotric Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, et al. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol.* 1997 Jun;35(6):1556-9.

264. Petrovec M, Sixl W, Marth E, Bushati N, Wust G. Domestic animals as indicators of *Anaplasma* species infections in Northern Albania. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:112-5.
265. Pinyoowong D, Jittapalapong S, Suksawat F, Stich RW, Thamchaipenet A. Molecular characterization of Thai Ehrlichia canis and Anaplasma platys strains detected in dogs. *Infect Genet Evol.* 2008 Jul;8(4):433-8.
266. Pretorius AM, Birtles RJ. Rickettsia aeschlimannii: A new pathogenic spotted fever group rickettsia, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2002 Aug;8(8):874.
267. Psaroulaki A, Germanakis A, Gikas A, Scoulica E, Tselentis Y. Simultaneous detection of "Rickettsia mongolotimonae" in a patient and in a tick in Greece. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3558-9.
268. Psaroulaki A, Hadjichristodoulou C, Loukaides F, Soteriades E, Konstantinidis A, Papastergiou P, et al. Epidemiological study of Q fever in humans, ruminant animals, and ticks in Cyprus using a geographical information system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006 Sep;25(9):576-86.
269. Psaroulaki A, Koliou M, Chochohlakis D, Ioannou I, Mazeri S, Tselentis Y. Anaplasma phagocytophilum infection in a child. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Jul;27(7):664-6.
270. Psaroulaki A, Ragiadakou D, Kouris G, Papadopoulos B, Chaniotis B, Tselentis Y. Ticks, tick-borne rickettsiae, and Coxiella burnetii in the Greek Island of Cephalonia. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:389-99.
271. Punda-Polic V, Petrovec M, Trilar T, Duh D, Bradaric N, Klismanic Z, et al. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Exp Appl Acarol.* 2002;28(1-4):169-76.
272. Pusterla N, Deplazes P, Braun U, Lutz H. Serological evidence of infection with Ehrlichia spp. in red foxes (Vulpes vulpes) in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 1999 Apr;37(4):1168-9.
273. Racult D, Stein A. Q fever during pregnancy--a risk for women, fetuses, and obstetricians. *N Engl J Med.* 1994 Feb 3;330(5):371.
274. Radulovic S, Feng HM, Morovic M, Djelalija B, Popov V, Crocquet-Valdes P, et al. Isolation of Rickettsia akari from a patient in a region where Mediterranean spotted fever is endemic. *Clin Infect Dis.* 1996 Feb;22(2):216-20.
275. Rajput ZI, Hu SH, Arijio AG, Habib M, Khalid M. Comparative study of Anaplasma parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005 Nov;6(11):1057-62.
276. Raoult D. Q fever: still a query after all these years. *J Med Microbiol.* 1996 Feb;44(2):77-8.
277. Raoult D. Q fever: still a mysterious disease. *Qjm.* 2002 Aug;95(8):491-2.
278. Raoult D, Berbis P, Roux V, Xu W, Maurin M. A new tick-transmitted disease due to Rickettsia slovaca. *Lancet.* 1997 Jul 12;350(9071):112-3.
279. Raoult D, Brouqui P, Roux V. A new spotted-fever-group rickettsiosis. *Lancet.* 1996 Aug 10;348(9024):412.
280. Raoult D, Dasch GA. Line blot and western blot immunoassays for diagnosis of Mediterranean spotted fever. *J Clin Microbiol.* 1989 Sep;27(9):2073-9.
281. Raoult D, Fenollar F, Stein A. Q fever during pregnancy: diagnosis, treatment, and follow-up. *Arch Intern Med.* 2002 Mar 25;162(6):701-4.
282. Raoult D, Fournier PE, Abboud P, Caron F. First documented human Rickettsia aeschlimannii infection. *Emerg Infect Dis.* 2002 Jul;8(7):748-9.
283. Raoult D, Fournier PE, Fenollar F, Jensenius M, Prieo T, de Pina JJ, et al. Rickettsia africae, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. *N Engl J Med.* 2001 May 17;344(20):1504-10.
284. Raoult D, Houpiqian P, Tissot Dupont H, Riss JM, Arditi-Djiane J, Brouqui P. Treatment of Q fever endocarditis: comparison of 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Intern Med.* 1999 Jan 25;159(2):167-73.
285. Raoult D, La Scola B, Anea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F, et al. A flea-associated Rickettsia pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis.* 2001 Jan-Feb;7(1):73-81.
286. Raoult D, Lakos A, Fenollar F, Beytout J, Brouqui P, Fournier PE. Spotless rickettsiosis caused by Rickettsia slovaca and associated with Dermacentor ticks. *Clin Infect Dis.* 2002 May 15;34(10):1331-6.
287. Raoult D, Marrie T. Q fever. *Clin Infect Dis.* 1995 Mar;20(3):489-95; quiz 96.

288. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis.* 2005 Apr;5(4):219-26.
289. Raoult D, Piquet P, Gallais H, de Micco C, Drancourt M, Casanova P. Coxiella burnetii infection of a vascular prosthesis. *N Engl J Med.* 1986 Nov 20;315(21):1358-9.
290. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Oct;10(4):694-719.
291. Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, Gouvernet J, Fournier PE, Bernit E, et al. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine (Baltimore).* 2000 Mar;79(2):109-23.
292. Raoult D, Vestris G, Enea M. Isolation of 16 strains of Coxiella burnetii from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *J Clin Microbiol.* 1990 Nov;28(11):2482-4.
293. Raoult D, Weiller PJ, Chagnon A, Chaudet H, Gallais H, Casanova P. Mediterranean spotted fever: clinical, laboratory and epidemiological features of 199 cases. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Jul;35(4):845-50.
294. Raoult D, Zuchelli P, Weiller PJ, Charrel C, San Marco JL, Gallais H, et al. Incidence, clinical observations and risk factors in the severe form of Mediterranean spotted fever among patients admitted to hospital in Marseilles 1983-1984. *J Infect.* 1986 Mar;12(2):111-6.
295. Razmi GR, Dastjerdi K, Hossieni H, Naghibi A, Barati F, Aslani MR. An epidemiological study on Anaplasma infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad Suburb, Khorasan Province, Iran. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:479-81.
296. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol.* 1991 Mar;173(5):1576-89.
297. Rehacek J, I. V. Tarasevich. Q fever. In: Gresikova M, editor. Acari-borne Rickettsiae and Rickettsioses in Eurasia. Bratislava: VEDA; 1988. p. 204-343.
298. Reilly S, Northwood JL, Caul EO. Q fever in Plymouth, 1972-88. A review with particular reference to neurological manifestations. *Epidemiol Infect.* 1990 Oct;105(2):391-408.
299. Richardus JH, Donkers A, Dumas AM, Schaap GJ, Akkermans JP, Huisman J, et al. Q fever in the Netherlands: a sero-epidemiological survey among human population groups from 1968 to 1983. *Epidemiol Infect.* 1987 Apr;98(2):211-9.
300. Richardus JH, Dumas AM, Huisman J, Schaap GJ. Q fever in infancy: a review of 18 cases. *Pediatr Infect Dis.* 1985 Jul-Aug;4(4):369-73.
301. Richter J, Fournier PE, Petridou J, Haussinger D, Raoult D. Rickettsia felis infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis.* 2002 Feb;8(2):207-8.
302. Richter PJ, Jr., Kimsey RB, Madigan JE, Barlough JE, Dumler JS, Brooks DL. Ixodes pacificus (Acari: Ixodidae) as a vector of Ehrlichia equi (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J Med Entomol.* 1996 Jan;33(1):1-5.
303. Rikihisa Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:548-55.
304. Rikihisa Y. New findings on members of the family Anaplasmataceae of veterinary importance. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:438-45.
305. Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of Bartonella quintana, B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, Rickettsia felis, and Wolbachia pipientis in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis.* 2003 Mar;9(3):338-42.
306. Rolain JM, Mallet MN, Raoult D. Correlation between serum doxycycline concentrations and serologic evolution in patients with Coxiella burnetii endocarditis. *J Infect Dis.* 2003 Nov 1;188(9):1322-5.
307. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis.* 2002 Feb;8(2):225-30.
308. Roux V, Drancourt M, Raoult D. Determination of genome sizes of Rickettsia spp. within the spotted fever group, using pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 1992 Nov;174(22):7455-7.
309. Roux V, Raoult D. Genotypic identification and phylogenetic analysis of the spotted fever group rickettsiae by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 1993 Aug;175(15):4895-904.

310. Roux V, Raoult D. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases. *J Clin Microbiol.* 1999 Mar;37(3):596-9.
311. Salmon MM, Howells B, Glencross EJ, Evans AD, Palmer SR. Q fever in an urban area. *Lancet.* 1982 May 1;1(8279):1002-4.
312. Santos AS, Santos-Silva MM, Almeida VC, Bacellar F, Dumler JS. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2004 Sep;10(9):1643-8.
313. Sardelic S, Fournier PE, Punda Polic V, Bradaric N, Grgic D, Ivic I, et al. First isolation of *Rickettsia conorii* from human blood in Croatia. *Croat Med J.* 2003 Oct;44(5):630-4.
314. Sarih M, M'Ghirbi Y, Bouattour A, Gern L, Baranton G, Postic D. Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. *J Clin Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1127-32.
315. Sawyer LA, Fishbein DB, McDade JE. Q fever: current concepts. *Rev Infect Dis.* 1987 Sep-Oct;9(5):935-46.
316. Schelling E, Diguimbaye C, Daoud S, Nicolet J, Boerlin P, Tanner M, et al. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Prev Vet Med.* 2003 Dec 12;61(4):279-93.
317. Serbezov VS, Kazar J, Novkirishki V, Gatcheva N, Kovacova E, Voynova V. Q fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg Infect Dis.* 1999 May-Jun;5(3):388-94.
318. Skarphedinsson S, Sogaard P, Pedersen C. Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis in high-risk groups in Denmark. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(3):206-10.
319. Sonenshine D. *Biology of ticks.* New York: Oxford University Press; 1991.
320. Sonenshine D. *Biology of ticks.* New York: Oxford University Press; 1993.
321. Spelman DW. Q fever: a study of 111 consecutive cases. *Med J Aust.* 1982 Jun 26;1(13):547-8, 51, 53.
322. Spicer AJ. Investigation of *Coxiella burnetii* infection as a possible cause of chronic liver disease in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979;73(4):415-7.
323. Spicer AJ, Crowther RW, Vella EE, Bengtsson E, Miles R, Pitzolis G. Q fever and animal abortion in Cyprus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;71(1):16-20.
324. Splitter EJ, Anthony HD, Twiehaus MJ. *Anaplasma ovis* in the United States; experimental studies with sheep and goats. *Am J Vet Res.* 1956 Jul;17(64):487-91.
325. Spyridaki I, Gikas A, Kofteridis D, Psaroulaki A, Tselentis Y. Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1998 Jul;36(7):2063-7.
326. Spyridaki I, Psaroulaki A, Loukaides F, Antoniou M, Hadjichristodolou C, Tselentis Y. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jan;66(1):86-90.
327. Stanczak J, Grzeszczuk A. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among forestry rangers in northern and northeastern Poland. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:89-91.
328. Stein A, Raoult D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Sep;30(9):2462-6.
329. Stein A, Raoult D. Q fever during pregnancy: a public health problem in southern France. *Clin Infect Dis.* 1998 Sep;27(3):592-6.
330. Stein A, Raoult D. Pigeon pneumonia in provence: a bird-borne Q fever outbreak. *Clin Infect Dis.* 1999 Sep;29(3):617-20.
331. Stein A, Saunders NA, Taylor AG, Raoult D. Phylogenic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett.* 1993 Nov 1;113(3):339-44.
332. Stoker MG, Marmion BP. The spread of Q fever from animals to man; the natural history of a rickettsial disease. *Bull World Health Organ.* 1955;13(5):781-806.
333. Stuen S, Nevland S, Moum T. Fatal cases of Tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:433-4.

334. Stuen S, Van De Pol I, Bergstrom K, Schouls LM. Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3192-7.
335. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1995 Jul;45(3):589-91.
336. Teyssie N, Chiche-Portiche C, Raoult D. Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* based on actin polymerization. *Res Microbiol.* 1992 Nov-Dec;143(9):821-9.
337. Thomas DR, Sillis M, Coleman TJ, Kench SM, Ogden NH, Salmon RL, et al. Low rates of ehrlichiosis and Lyme borreliosis in English farmworkers. *Epidemiol Infect.* 1998 Dec;121(3):609-14.
338. Thomas LD, Hongo I, Bloch KC, Tang YW, Dummer S. Human ehrlichiosis in transplant recipients. *Am J Transplant.* 2007 Jun;7(6):1641-7.
339. Tigertt WD, Benenson AS, Gochenour WS. Airborne Q fever. *Bacteriol Rev.* 1961 Sep;25:285-93.
340. Tissot Dupont H, Raoult D, Brouqui P, Janbon F, Peyramond D, Weiller PJ, et al. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am J Med.* 1992 Oct;93(4):427-34.
341. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis.* 2004 Jul;10(7):1264-9.
342. Tissot-Dupont H, Torres S, Nezri M, Raoult D. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am J Epidemiol.* 1999 Jul 1;150(1):67-74.
343. To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushi H, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci.* 1998 Jul;60(7):859-61.
344. Torina A, Vicente J, Alongi A, Scimeca S, Turla R, Nicosia S, et al. Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003-2005. *Zoonoses Public Health.* 2007;54(1):8-15.
345. Tselentis Y, Gikas A, Kofteridis D, Kyriakakis E, Lydataki N, Bouros D, et al. Q fever in the Greek Island of Crete: epidemiologic, clinical, and therapeutic data from 98 cases. *Clin Infect Dis.* 1995 May;20(5):1311-6.
346. Tselentis Y, Psaroulaki A, Maniatis J, Spyridaki I, Babalis T. Genotypic identification of murine typhus *Rickettsia* in rats and their fleas in an endemic area of Greece by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Apr;54(4):413-7.
347. van Woerden HC, Mason BW, Nehaul LK, Smith R, Salmon RL, Healy B, et al. Q fever outbreak in industrial setting. *Emerg Infect Dis.* 2004 Jul;10(7):1282-9.
348. Varga V. An explosive outbreak of Q-fever in Jed'love Kostol'any, Slovakia. *Cent Eur J Public Health.* 1997 Dec;5(4):180-2.
349. Vitale G, Mansuelo S, Rolain JM, Raoult D. *Rickettsia massiliae* human isolation. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jan;12(1):174-5.
350. Vogel JP. Turning a tiger into a house cat: using *Legionella pneumophila* to study *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 2004 Mar;12(3):103-5.
351. Voloudaki AE, Kofteridis DP, Tritou IN, Gourtsoyiannis NC, Tselentis YJ, Gikas AI. Q fever pneumonia: CT findings. *Radiology.* 2000 Jun;215(3):880-3.
352. Waag DM, England MJ, Tammariello RF, Byrne WR, Gibbs P, Banfield CM, et al. Comparative efficacy and immunogenicity of Q fever chloroform:methanol residue (CMR) and phase I cellular (Q-Vax) vaccines in cynomolgus monkeys challenged by aerosol. *Vaccine.* 2002 Jun 7;20(19-20):2623-34.
353. Walder G, Tiwald G, Dierich MP, Wurzner R. Serological evidence for human granulocytic ehrlichiosis in Western Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003 Sep;22(9):543-7.
354. Walker DH, Feng HM, Saada JI, Crocquet-Valdes P, Radulovic S, Popov VL, et al. Comparative antigenic analysis of spotted fever group rickettsiae from Israel and other closely related organisms. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 Jun;52(6):569-76.

355. Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E, Avidar Y, Keysary A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet Parasitol.* 1997 May;69(3-4):307-17.
356. Webster JP, Lloyd G, Macdonald DW. Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. *Parasitology.* 1995 Jan;110 (Pt 1):31-5.
357. Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, et al. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol.* 1989 Aug;171(8):4202-6.
358. Weiss E. History of rickettsiology. In: Walker DH, editor. *Biology of rickettsial diseases.* Boca Raton, Florida: CRC Press; 1986. p. 15-32.
359. Wells GM, Woodward TE, Fiset P, Hornick RB. Rocky mountain spotted fever caused by blood transfusion. *Jama.* 1978 Jun 30;239(26):2763-5.
360. Wen B, Cao W, Pan H. Ehrlichiae and ehrlichial diseases in china. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:45-53.
361. Wildman MJ, Smith EG, Groves J, Beattie JM, Caul EO, Ayres JG. Chronic fatigue following infection by *Coxiella burnetii* (Q fever): ten-year follow-up of the 1989 UK outbreak cohort. *Qjm.* 2002 Aug;95(8):527-38.
362. Williams JC. Infectivity, virulence, and pathogenicity of *Coxiella burnetii* for various hosts. In: Williams JC, H.A. Thomson, editor. *Q fever, the biology of Coxiella burnetii.* Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 21-71.
363. Williams JC, Peacock MG, McCaul TF. Immunological and biological characterization of *Coxiella burnetii*, phases I and II, separated from host components. *Infect Immun.* 1981 May;32(2):840-51.
364. Williams JC, Thomas LA, Peacock MG. Humoral immune response to Q fever: enzyme-linked immunosorbent assay antibody response to *Coxiella burnetii* in experimentally infected guinea pigs. *J Clin Microbiol.* 1986 Dec;24(6):935-9.
365. Williams WJ, S. Radulovic, G.A. Dasch, J. Lindstrom, D.J. Kelly, C.N. Oster and D.H. Walker Identification of *Rickettsia conorii* infection by polymerase chain reaction in a soldier returning from Somalia. *Clin Infect Dis.* 1994 Jul;19(1):93-9.
366. Wilson HG, Neilson GH, Galea EG, Stafford G, O'Brien MF. Q fever endocarditis in Queensland. *Circulation.* 1976 Apr;53(4):680-4.
367. Wimberly MC, Baer AD, Yabsley MJ. Enhanced spatial models for predicting the geographic distributions of tick-borne pathogens. *Int J Health Geogr.* 2008;7:15.
368. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987 Jun;51(2):221-71.
369. Woessner R, Gaertner BC, Grauer MT, Weber K, Mueller-Lantzsch N, Hunfeld KP, et al. Incidence and prevalence of infection with human granulocytic ehrlichiosis agent in Germany. A prospective study in young healthy subjects. *Infection.* 2001 Oct;29(5):271-3.
370. Woldehiwet Z. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res Vet Sci.* 2004 Oct;77(2):93-100.
371. Worswick D, Marmion BP. Antibody responses in acute and chronic Q fever and in subjects vaccinated against Q fever. *J Med Microbiol.* 1985 Jun;19(3):281-96.
372. Yabsley MJ, Romines J, Nettles VF. Detection of *Babesia* and *Anaplasma* species in rabbits from Texas and Georgia, USA. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006 Spring;6(1):7-13.
373. Yeaman MR, Mitscher LA, Baca OG. In vitro susceptibility of *Coxiella burnetii* to antibiotics, including several quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987 Jul;31(7):1079-84.
374. Yu X, Jin Y, Fan M, Xu G, Liu Q, Raoult D. Genotypic and antigenic identification of two new strains of spotted fever group rickettsiae isolated from China. *J Clin Microbiol.* 1993 Jan;31(1):83-8.
375. Zeidner NS, Massung RF, Dolan MC, Dadey E, Gabitzsch E, Dietrich G, et al. A sustained-release formulation of doxycycline hyclate (Atridox) prevents simultaneous infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* transmitted by tick bite. *J Med Microbiol.* 2008 Apr;57(Pt 4):463-8.
376. Zhan L, He J, Saren GW, Wu XM, Wang JB, Zhao QM, et al. [Investigation on *Anaplasma phagocytophilum* infection in rodents from forest areas in northeastern China]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2007 Feb;28(2):157-9.
377. Zhang G, To H, Russell KE, Hendrix LR, Yamaguchi T, Fukushi H, et al. Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane

- protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect Immun.* 2005 Mar;73(3):1561-7.
378. Zhang JZ, Popov VL, Gao S, Walker DH, Yu XJ. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. *Cell Microbiol.* 2007 Mar;9(3):610-8.
379. Διδακτορική διατριβή Άννας Ψαρουλάκη, 2000.
380. Διδακτορική διατριβή Ιωάννας Σπυριδάκη, 2000.
381. Διδακτορική διατριβή Φειδία Λουκαΐδη, 2000.
382. Διδακτορική διατριβή Δημοσθένη Χοχλάκη, 2009.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΛΤΙΑ**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ ΓΙΑ ΖΩΑ**

Ημερομηνία:

Περιοχή:

Κωδικός περιοχής:

Όνομα κτηνοτρόφου:

CYS

Αρ. ΕνωτίωνΕίδος ΖώουΠαρασιτισμός

1.

2.

3.

4.

5.

6.

7.

8.

9.

10.

Παρατηρήσεις:

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ ΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

- ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΗ / ΙΑΤΡΟΥ -

Όνοματεπώνυμο ασθενή:	Ημερομηνία Καταγραφής (ηη/μμ/εεεε): / /
Διεύθυνση Κατοικίας (αριθμός/οδός):	Όνοματεπώνυμο Ιατρού:
Πόλη:	Αριθμός Τηλεφώνου:

- ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ -

Τόπος διαμονής:	Ταχυδρομικός Κώδικας:	Φύλο <input type="checkbox"/> Άνδρας <input type="checkbox"/> Γυναίκα
Ημερομηνία γέννησης (ηη/μμ/εεεε): / /	Επάγγελμα κατά το χρόνο έναρξης της νόσου σχετικό με: <input type="checkbox"/> Γαλακτοκόμος <input type="checkbox"/> Κτηνίατρος <input type="checkbox"/> Κτηνοτρόφος <input type="checkbox"/> Ιατρική έρευνα <input type="checkbox"/> Έρευνα με πειραματόζωα <input type="checkbox"/> Εργασία σε μικροβιολογικό εργαστήριο <input type="checkbox"/> Εργασία σε Σφαγείο <input type="checkbox"/> Ζει με άτομο που σχετίζεται επαγγελματικά κάποιο από τα παραπάνω <input type="checkbox"/> Άλλο (καθορίστε)	
Επαφή με ζώα εντός 2 μηνών από έναρξη της νόσου: <input type="checkbox"/> Βοοειδή <input type="checkbox"/> Αιγοπρόβατα <input type="checkbox"/> Γάτες <input type="checkbox"/> Σκύλοι <input type="checkbox"/> Περιστερία <input type="checkbox"/> Κουνέλια <input type="checkbox"/> Ποντίκια <input type="checkbox"/> Τσιμπούρια <input type="checkbox"/> Ψύλλοι <input type="checkbox"/> Άλλο (καθορίστε)		
Έκθεση σε λοχεία ζώων: <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Άγνωστο	Άλλο μέλος της οικογένειας με παρόμοια ασθένεια το τελευταίο έτος: <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Άγνωστο	
Έκθεση σε μη-πασταριωμένο γάλα: <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Άγνωστο	Ταξίδι κατά το τελευταίο έτος: <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Άγνωστο Αν ναι, καθορίστε: Νομός: Χώρα Εξωτερικού:	

ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Ημερομηνία έναρξης των συμπτωμάτων (ηη/μμ/εεεε): / /	Κλινικά συμπτώματα και σύνδρομα (τσεκάρτε όσα ισχύουν): <input type="checkbox"/> Πυρετός (> 37.5°) <input type="checkbox"/> Μυαλγία <input type="checkbox"/> Οπισθοβολβικός πόνος <input type="checkbox"/> Καταβολή <input type="checkbox"/> Εξάνθημα <input type="checkbox"/> Βήχας <input type="checkbox"/> Κεφαλαλγία <input type="checkbox"/> Σπληνομεγαλία <input type="checkbox"/> Ηπατομεγαλία <input type="checkbox"/> Πνευμονία <input type="checkbox"/> Ηπατίτιδα <input type="checkbox"/> Ενδοκαρδίτιδα <input type="checkbox"/> Άλλο (καθορίστε):
Προϋπάρχουσα νόσος; (τσεκάρτε όσα ισχύουν): <input type="checkbox"/> Ανοσοκαταστολή <input type="checkbox"/> Βαλβιδοπάθεια ή Αγγειακό νόσημα <input type="checkbox"/> Εγκυμοσύνη <input type="checkbox"/> Άλλη (καθορίστε):	Νοσηλεία λόγω της παρούσας νόσου ; <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Άγνωστο

ΖΗΤΟΥΜΕΝΟΣ ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Πυρετός Q (C. Burnetti) Ενδημικός τύφος (R. typhi) Μεσ.Κηλιδοβλατιδώδης πυρετός (R. conorii)

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ - ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

- Καλλιέργεια αίματος (buffy coat) PCR

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΝΟΣΟΥ

.....

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

A) Παραγωγικά ζώα

Από κάθε ζώο λαμβάνονται 2 δείγματα αίματος (ένας σωλήνας με αντιπηκτικό και ο δεύτερος χωρίς). Σε κάθε ζώο δίνεται ένας κωδικός ο οποίος σχετίζεται με την περιοχή δειγματοληψίας. Το κάθε ζώο ελέγχεται για την παρουσία εκτοπαρασίτων (κρότωνες) και αν υπάρχουν συλλέγονται και τοποθετούνται σε σωλήνα στον οποίο αναγράφεται ο κωδικός του ζώου. Ο κωδικός του ζώου σχετίζεται με τον κωδικό των δειγμάτων αίματος και των αρθροπόδων που λαμβάνονται απ' αυτό.

Τα δείγματα αίματος και τα εκτοπαρασίτα από τα παραγωγικά ζώα μεταφέρονται σε ισοθερμικά δοχεία μεταφοράς στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες όπου ταξινομούνται και καταγράφονται. Από τον σωλήνα με αντιπηκτικό (EDTA) γίνεται η λήψη της λευκοκυτταρικής στοιβάδας, και ακολουθεί φύλαξη στους -80°C . Το αίμα χωρίς αντιπηκτικό φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 10 λεπτά και ο ορός μεταφέρεται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο των 2ml στους -80°C . Τα αρθρόποδα τοποθετούνται σε cryo-tubes στους -80°C .

Αναλυτικότερα για τη συλλογή δειγμάτων για ορολογικό έλεγχο και γονοτυπική ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων ακολουθήθηκε η πιο κάτω διαδικασία.

I. Δείγματα αίματος για ορολογικό έλεγχο:

- Λήψη και συλλογή 5 ml αίματος σε σωλήνες **ΧΩΡΙΣ** αντιπηκτικό
- Παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προς πήξη
- Μεταφορά στο εργαστήριο σε ισοθερμικά δοχεία μεταφοράς
- Φυγοκέντρωση 3000 rpm / 10 λεπτά
- Λήψη με σύριγγα μιας χρήσης (ή με αποστειρωμένο tip μικροπιπέτας) και μεταφορά του ορού σε σωληνάκια erpendorf στους 4°C αν ελεγχθεί αμέσως ή στους -20°C για φύλαξη και μελλοντική χρήση.

II. Δείγματα αίματος για γονοτυπική ανίχνευση των παθογόνων με τη μέθοδο PCR

Σε στείρες συνθήκες

- Λήψη και συλλογή 5 ml αίματος σε σωλήνες **ΜΕ** αντιπηκτικό (EDTA)
- Μεταφορά στο εργαστήριο σε ισοθερμικά δοχεία μεταφοράς
- Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι κατακάθισης των ερυθρών (1-2 ώρες).

-Λήψη με σύριγγα (ή με αποστειρωμένο tip μικροπιπέτας, ή με σύριγγα ινσουλίνης μιας χρήσης) του στρώματος του πλάσματος που βρίσκεται ακριβώς πάνω από τα ερυθρά, προσέχοντας να αποφύγουμε τα τελευταία (στιβάδα λευκών-buffy coat)

- Φύλαξη σε στείρα σωληνάρια (πλαστικά με βιδωτό καπάκι) στους -80°C .

B) Άγρια ζώα

Σύλληψη, μεταφορά και παράδοση άγριων θηλαστικών και πτηνών στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών για την απαιτούμενη αιμοληψία και συλλογή βιολογικού υλικού για εργαστηριακό έλεγχο. Η συλλογή αίματος γίνεται σε ειδικά φίλτρα (Whatman® paper) τα οποία τοποθετούνται σε αποστειρωμένα φιαλίδια των 30 ml και φυλάγονται στους -80°C . Ελέγχεται η παρουσία εκτοπαρασίτων (κροτώνων) τα οποία και συλλέγονται, αν υπάρχουν, με ειδική λαβίδα και τοποθετούνται σε cryo-tubes και φυλάγονται και αυτά όπως και τα φίλτρα στους -80°C μέχρι την επεξεργασία και την εξέταση τους με τη μέθοδο PCR. Σε κάθε ζώο δίνεται ένας κωδικός ο οποίος συσχετίζεται με τον κωδικό των δειγμάτων που λαμβάνονται για έλεγχο από το ζώο.

Σε Microsoft Excell έχουν καταχωρούνταν όλες οι πληροφορίες που αφορούσαν το ζώο, οι εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα αυτών των εξετάσεων.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ**A) ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ (αιγοπροβάτων βοοειδών, σκυλιών και ανθρώπων)****α) Ορολογικός έλεγχος για *Rickettsia conorii***

Χρησιμοποιήθηκε το kit της *Biomerieux IFA* για ανίχνευση αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Αρχική αραιώση του εξεταστέου ορού 1/60 (με PBS) και διαδοχικές αραιώσεις υποδιπλασιασμού. Cut off τίτλος θεωρήθηκε: 1/120.

β) Ορολογικός έλεγχος για *Coxiella burnetii*

Χρησιμοποιήθηκε το kit της *Biomerieux IFA* για ανίχνευση αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Αρχική αραιώση του εξεταστέου ορού 1/60 (με PBS) και διαδοχικές αραιώσεις υποδιπλασιασμού. Cut off τίτλος θεωρήθηκε: 1/120.

γ) Ορολογικός έλεγχος για *A. phagocytophilum*

Χρησιμοποίηση του kit της VMRD (USA) IFA για ανίχνευση αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Αρχική αραιώση του εξεταστέου ορού 1/50 (με PBS) και διαδοχικές αραιώσεις υποδιπλασιασμού. Cut off τίτλος θεωρήθηκε: 1/100.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

- Όλα τα υλικά πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους.
- Ο εξεταστέος ορός διαλύεται στην αρχική αναλογία με PBS. Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις υποδιπλασιασμού.
- 25μl από το παραπάνω διάλυμα τοποθετούνται διαδοχικά στα βοθρία της αντικειμενοφόρου πλάκας, τα οποία είναι ήδη επικαλυμμένα με αντιγόνο *Rickettsia conorii*/ή *Coxiella burnetii*/ή *A. Phagocytophilum*.
- Ακολουθείται η ίδια διαδικασία για όλους τους εξεταστέους ορούς.
- Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση της αντικειμενοφόρου πλάκας σε υγρό περιβάλλον για 30 λεπτά στους 37°C
- Μετά το τέλος της επώασης ακολουθεί πλύσιμο με PBS για 10 λεπτά
- Αφού οι αντικειμενοφόρες πλάκες σκουπιστούν καλά διηθητικό χαρτί, γίνεται η προσθήκη 25μl αντι-αντισώματος (anti-goat, anti-sheep, anti-bovine, anti-dog, anti-human αντίστοιχα(IgG (H+L) Fluorescein conjugated, PIERCE), και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της επώασης, σε υγρό περιβάλλον στο σκοτάδι, για 30 λεπτά.

- Οι πλάκες ξεπλένονται με PBS σκουπίζονται, προστίθεται μικρή ποσότητα γλυκερόλης και τοποθετείται καλυπτρίδα. Στη συνέχεια εξετάζονται σε μικροσκόπιο φθορισμού και το αποτέλεσμα προσδιορίζεται με την παρουσία και την ένταση του φθορισμού σε κάθε δείγμα.

B) ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ PCR.

B.1. Εξαγωγή DNA

Η εξαγωγή του DNA από αίμα ή λευκά αιμοσφαίρια πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του blood QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

- Περίπου 200 μl δείγματος μεταφέρονται σε σωληνάριο eppendorf το οποίο περιέχει 200 μl Buffer AL (παρέχεται στο kit).
- Αφού προστεθούν 20 μl QIAGEN Protease, το μείγμα αναδεύεται καλά με vortex και επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 56°C για 10 λεπτά. Για τους τεμαχισμένους κρότωνα, η εώαση θα μπορούσε να γίνει εναλλακτικά σε υδατόλουτρο στους 56°C overnight.
- Προστίθενται 200 μl αιθανόλης 100% και το μείγμα αναδεύεται καλά με vortex.
- Το διάλυμα μεταφέρεται σε μια στήλη QIAamp (παρέχεται στο kit), και φυγοκεντρείται στα 8000 g για 1 λεπτό.
- Στη συνέχεια προστίθενται 500 μl Buffer AW1 (παρέχεται στο kit) και ακολουθεί φυγοκέντριση στα 8000 g για 1 λεπτό.
- Επαναλαμβάνεται ακόμα ένας κύκλος πλυσίματος, προσθέτοντας 500 μl Buffer AW2, φυγοκεντρώντας στα 8000 g για 1 λεπτό.
- Πετάγεται το απόβλητο και ακολουθεί νέα φυγοκέντριση στα 10000 g για 1 λεπτό.
- Η στήλη QIAamp μεταφέρεται σε ένα καθαρό eppendorf.
- Προστίθενται 200 μl Buffer AE, γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 8000 g για 2 λεπτά και το δείγμα φυλλάσσεται στους -20°C μέχρι το γονιδιακό πολλαπλασιασμό.

B.2. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση ρικετσιών, αναπλασμάτων και *C. burnetii* σε δείγματα αίματος, φίλτρα και εκτοπαράσιτα

-Για την ανίχνευση ρικετσιακού DNA χρησιμοποιούνται 2 ζεύγη ειδικών εκκινητών CS1-CS2 AND ompA1-ompA2

- Για την ανίχνευση *Coxiella burnetii* χρησιμοποιείται το ζεύγος εκκινητών CB1-CB2

Για την ανίχνευση *Ehrlichia*- *Anaplasma* χρησιμοποιείται ένα Ζεύγος εκκινητών

B.3. Ηλεκτροφόρηση του DNA

Η επιτυχία και η ειδικότητα του πολ/μού του DNA επιβεβαιώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1-2%. Υπολογίζεται το μέγεθος του προϊόντος του PCR με τη βοήθεια των δεικτών μοριακού βάρους. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση με το μέγεθος του προϊόντος του PCR του θετικού μάρτυρα.

Διαδικασία

- Προετοιμάζεται το διάλυμα αγαρόζης 1-2% σε TAE 1X
- Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 0,5μg/ml και το διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης όπου αφήνεται να πήξει.
- Το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει προστεθεί το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και αφαιρείται προσεκτικά η χτένα.
- Τοποθετούνται 10μl του προϊόντος της PCR σε 2 μl χρωστικής και στη συνέχεια μεταφέρονται στα πηγάδια της πηκτής.
- Μετά από μία ώρα τρεξίματος στα 100 volts, Μετά από μία ώρα τρεξίματος στα 90 volts, ακολουθεί επώαση 30-90 λεπτών σε χρώση GelStar[®] (Lonza, ΗΠΑ) προετοιμασμένη σε διάλυμα TAE 1X.
- Η πηκτή τοποθετείται σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).
- Φωτογραφίζεται με μηχανή Polaroid για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να είναι κενός. Ο θετικός μάρτυρας πρέπει να περιέχει την χαρακτηριστική μπάντα των εναρκτών που χρησιμοποιήθηκαν. Κάθε επιτυχημένος πολ/σμός εμφανίζει όμοια μπάντα μ' αυτήν του θετικού μάρτυρα.

B.4. Ταυτοποίηση

Επίδραση στα προϊόντα του γενωμικού πολλαπλασιασμού με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP).

Το DNA "κόβεται" σε μικρότερα κλάσματα με μια ή συνδυασμό περισσότερων περιοριστικών ενδονουκλεασών και το μίγμα των κομματιών αυτών τοποθετείται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Το DNA μετακινείται προς την άνοδο, με τα μικρότερα κλάσματα να κινούνται γρηγορότερα και τα μεγαλύτερα αργότερα. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται χρώση των νουκλεικών οξέων και φωτογράφηση τους.

Η επίδραση στα προϊόντα πολ/μού με περιοριστικά ένζυμα παρέχει κατατομές κλασμάτων DNA που συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες των στελεχών αναφοράς, συμβάλλει ουσιαστικά στην ταυτοποίηση του νέου στελέχους.

Μετά την επίδραση στο προϊόν της PCR, με περιοριστικά ένζυμα ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 3% LMP (Low Melting Point) και χρώση της πηκτής σε βρωμιούχο αιθίδιο. Το ειδικό προφίλ κατατομής των κλασμάτων του DNA καθορίζει τη γονοτυπική ταυτοποίηση του στελέχους.

Διαδικασία

Όλοι οι χειρισμοί γίνονται μέσα σε πάγο.

- Προετοιμασία του διαλύματος αντίδρασης:

περιοριστικό ένζυμο 1,0 μl

αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα 2,7 μl

δείγμα 23,3 μl

Το διάλυμα αντίδρασης επωάζεται για 2 ώρες στην κατάλληλη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία.

Τα δείγματα διατηρούνται στους 4⁰C, μέχρι την ηλεκτροφόρηση τους.

Παράρτημα 4

Πίνακας Α: Περιοχές Οργανωμένης Δειγματοληψίας και Αρ. Δειγμάτων αίματος κατά είδος Ζώου ανά Περιοχή.

ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ			ΑΡ. ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ			
ΕΠΑΡΧΙΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΧΩΡΙΟ	ΑΙΓΕΣ	ΠΡΟΒΑΤΑ	ΒΟΟΕΙΔΗ	
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	1243	ΚΟΚΚΙΝΟΤΡΙΜΙΘΙΑ	10			
	1360	ΑΚΑΚΙ		10	9	
	1201	ΦΑΡΜΑΚΑΣ	9			
	1106	ΠΕΡΑ ΧΩΡ. ΝΗΣΟΥ		10		
	1104	ΚΟΤΣΙΑΤΗΣ	10			
	1241	ΠΑΛΙΟΜΕΤΟΧΟ	18		10	
	1427	ΚΑΜΠΟΣ	10			
	1416	ΚΑΤΥΔΑΤΑ			8	
	1206	ΑΓ. ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΣ	10			
	1224	ΚΟΤΣΙΑΤΗΣ			10	
	1368	ΜΕΝΟΙΚΟ			10	
	1107	ΔΑΛΙ			21	
	1120	ΠΟΤΑΜΙΑ			10	
	1410	ΕΥΡΥΧΟΥ	10			
	1024	ΓΕΡΙ		10	10	
	1013	ΑΘΑΛΑΣΣΑ			10	
	1457	ΚΑΤΩ ΠΥΡΓΟΣ	10			
	1108	ΛΥΜΠΙΑ		10	20	
	1303	ΦΤΕΡΙΚΟΥΔΙ	10			
	1229	ΨΗΜΟΛΟΦΟΥ		14		
	1416	ΦΛΑΣΟΥ		11		
	1361	ΠΕΡΙΣΤΕΡΩΝΑ		10	10	
	1361OR	ΟΡΟΥΝΤΑ	10			
		ΑΘΡΟΙΣΜΑ		107	75	128
	ΛΕΜΕΣΟΣ	5125	ΠΑΡΕΚΚΛΗΣΙΑ	5	7	
		5221	ΠΑΡΑΜΑΛΙ		15	
		5324	ΜΑΛΛΙΑ	10		
5311		ΔΩΡΟΣ	10			
5365		ΠΕΛΕΝΤΡΙ	10			
5201		ΑΣΩΜΑΤΟΣ	10			
5129		ΠΥΡΓΟΣ ΛΕΜΕΣΟΥ			10	
5222		ΑΥΔΗΜΟΥ	6	4	10	
5213		ΚΑΝΤΟΥ		10		
5308		ΠΑΧΝΑ	10			
5227		ΠΙΣΣΟΥΡΙ	11			
5133		ΠΡΑΣΤΕΙΟ	10			
5146		ΚΑΛΟ ΧΩΡΙΟ	10			
5101	ΠΑΡΑΜΥΘΑ	5	5			
	ΑΘΡΟΙΣΜΑ		97	41	20	
ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΣ	4107	ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ		11		
	3103	ΣΩΤΗΡΑ	10			
	3105	ΦΡΕΝΑΡΟΣ		10		
	3114	ΒΡΥΣΟΥΛΕΣ	5	6	10	
	3111	ΑΧΝΑ	1	9	20	
	3102	ΔΕΡΥΝΕΙΑ		10		
	3110	ΑΥΓΟΡΟΥ		10		
	ΑΘΡΟΙΣΜΑ		16	56	30	

ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ			ΑΡ. ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ		
ΕΠΑΡΧΙΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΧΩΡΙΟ	ΑΙΓΕΣ	ΠΡΟΒΑΤΑ	ΒΟΟΕΙΔΗ
ΛΑΡΝΑΚΑ	4307	ΑΓΙΟΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ		10	
	4010	ΑΡΑΔΙΠΠΟΥ	7	6	20
	4319	ΒΑΒΑΤΣΙΝΙΑ	10		
	4106	ΟΡΜΗΔΕΙΑ		10	
	4311	ΛΕΥΚΑΡΑ		10	
	4213	ΨΕΥΔΑΣ		10	
	4210	ΚΑΛΟ ΧΩΡΙΟ		10	
	4012	ΔΡΟΜΟΛΑΞΙΑ			20
	4202	ΑΘΗΑΙΝΟΥ	10		20
	4105	ΕΥΛΟΤΥΜΠΟΥ			10
	4125	ΑΛΕΘΡΙΚΟ		5	10
	4126	ΚΛΑΥΔΙΑ			10
	4013	ΜΕΝΕΟΥ			10
	4104	ΠΥΛΑ			10
	4110	ΚΙΤΙ			10
	4122	ΑΝΑΦΩΤΙΑ			10
	4120	ΜΑΖΩΤΟΣ	10		
	4100	ΚΕΛΙΑ		10	
	4301	ΜΑΡΙ	5	8	
	4124	ΚΙΒΙΣΙΛΙ		10	
	4309	ΚΟΦΙΝΟΥ		10	10
	4108	ΠΕΡΓΑΜΟΣ			10
	4102	ΟΡΟΚΛΙΝΗ		10	
ΑΘΡΟΙΣΜΑ			42	109	150
ΠΑΦΟΣ	6100	ΚΟΥΚΛΙΑ		10	
	6102	ΝΙΚΟΚΛΕΙΑ	10		
	6122	ΠΑΝΩ ΣΤΡΟΥΜΠΗ	10		
	6227	ΣΤΑΤΟΣ	10		
	6308	ΔΡΥΜΟΥ	10		
	6319	ΜΕΛΑΝΔΡΑ	9	6	
	6210	ΚΕΛΟΚΕΔΑΡΑ		10	
	6219	ΑΓ. ΙΩΑΝΝΗΣ		10	
	6353	ΔΡΟΥΣΙΑ	10		
	6024	ΜΕΣΑ ΧΩΡΙΟ	10		
	6367	ΠΩΜΟΣ	15		
	6107	ΑΝΑΡΙΤΑ			10
6133	ΠΕΓΕΙΑ		16		
ΑΘΡΟΙΣΜΑ			84	52	10
ΤΕΛΙΚΟ ΑΘΡΟΙΣΜΑ			346	333	338

Πίνακας Β: Είδη και αριθμός άγριων πτηνών.

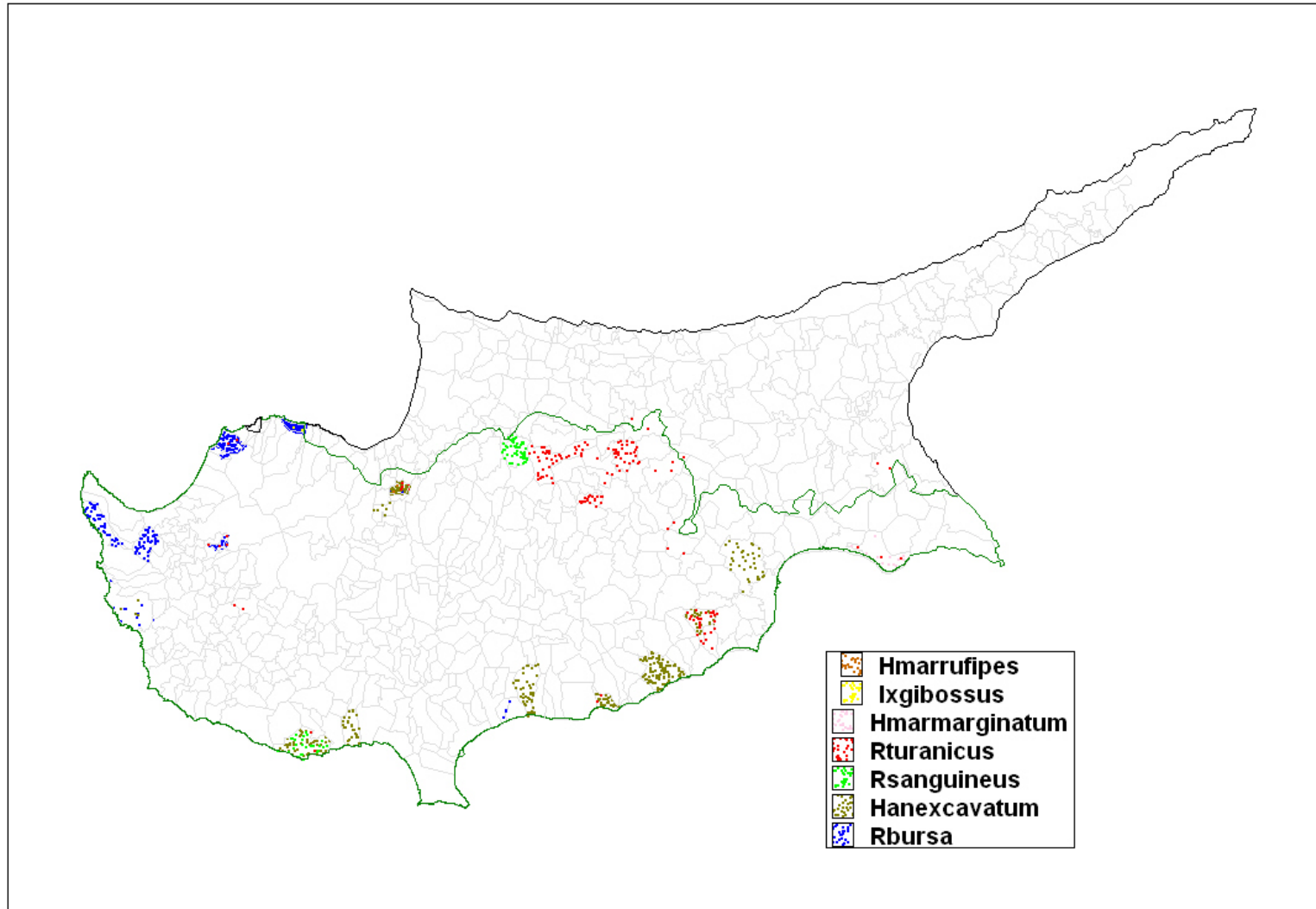
A/A	Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Αρ. δειγμάτων
1	ΤΣΑΛΑΠΕΤΕΙΝΟΣ	Upupa epops	1
2	ΠΕΤΡΙΤΗΣ	Falco peregrinus	6
3	ΦΑΛΚΟΝΙ ΤΗΣ ΕΛΕΟΝΟΡΑΣ	Falco eleonorae	1
4	ΦΑΛΚΟΝΙ ΚΟΚΚΙΝΟΠΟΔΑΡΟ	Falco vespertinus	7
5	ΕΡΩΔΙΟΣ	Ixobrychus minutus	6
6	ΦΑΣΣΑ	Columba palumbus	67
7	ΤΡΥΓΟΝΙ	Streptopelia turtur	41
8	ΑΝΘΡΩΠΟΠΟΥΛΙ	Tyto alba	22
9	ΣΦΗΚΟΒΑΡΒΑΚΙΝΑ	Pernis apivorus	18
10	ΟΡΤΥΚΙ	Coturnix coturnix	12
11	ΟΡΤΥΚΟΜΑΝΑ	Crex crex	5
12	ΑΡΚΟΘΟΥΠΙΟΣ-ΝΑΝΟΜΠΟΥΦΟΣ	Asio otus	17
13	ΜΕΛΙΣΣΟΦΑΓΟΣ	Merops apiaster	9
14	ΦΛΑΜΠΓΚΟ-ΦΟΙΝΙΚΟΠΤΕΡΟΣ	Phoenicopterus ruber	11
15	ΕΡΩΔΙΟΣ-ΣΤΑΧΤΟΤΣΙΚΝΙΑΣ	Ardea cinerea	10
16	ΤΡΟΥΛΟΥΡΙΔΑ-ΠΕΤΡΟΤΡΙΛΙΔΑ	Burhinus oediconemus	3
17	ΚΙΤΣΗΣ	Falco tinnunculus	80
18	ΚΙΡΚΟΣ-ΚΑΛΑΜΟΚΙΡΚΟΣ	Circus aeruginosus	23
19	ΠΟΝΤΙΚΟΒΑΡΒΑΚΙΝΑ	Buteo buteo	12
20	ΑΕΤΟΒΑΡΒΑΚΙΝΑ	Buteo rufinus	11
21	ΔΑΚΚΑΝΟΥΡΑ	Lanius minor	2
22	ΝΕΡΟΚΟΤΑ	Gallinula chloropus	30
23	ΑΛΚΥΟΝΗ	Alcedo atthis	2
24	ΓΛΑΡΟΣ Ο ΑΡΓΥΡΟΧΡΟΥΣ	Larus cachinnans	17
25	ΓΕΡΑΝΟΣ	Grus grus	2
26	ΤΣΙΧΛΟΓΕΡΑΚΑΣ	Accipiter nisus	6
27	ΚΟΥΚΟΥΒΑΓΙΑ	Athene noctua	5
28	ΔΙΠΛΟΣΙΑΧΙΝΟ	Accipiter gentilis	6
29	ΠΕΡΔΙΚΑ	Alectoris chukar	2
30	ΓΙΔΟΥΖΑΣΤΡΑ	Caprimulgus europaeus	3
31	ΦΡΑΓΚΟΛΙΝΑ	Francolinus Francolinus	11
32	ΑΕΤΟΣ BONELLI-ΣΠΙΖΑΕΤΟΣ	Hieraaetus fasciatus	2
33	ΒΟΡΤΑΚΟΦΑΣ	Botaurus stellaris	4
34	ΝΕΡΑΛΛΙΔΙ	Rallus aquaticus	10
35	ΜΠΕΚΑΤΣΑ	Scolopax rusticola	7
36	ΚΑΡΑΠΑΤΤΑΣ-ΦΑΛΛΑΡΙΔΑ	Fulica atra	20
37	ΚΩΛΟΒΟΥΤΗΣ-ΠΥΓΟΠΟΥΣ Ο ΕΡΥΘΡΟΛΑΙΜΟΣ	Tachybaptus ruficollis	3
38	ΒΟΥΤΗΧΤΗΣ-ΠΥΓΟΠΟΥΣ Ο ΛΟΦΙΟΦΟΡΟΣ	Podiceps cristatus	1
39	ΠΡΑΣΙΝΟΚΕΦΑΛΗ ΠΑΠΙΑ	Anas platyrhynchos	7
40	ΑΣΠΡΟΣ ΕΡΩΔΙΟΣ-ΛΕΥΚΟΤΣΙΚΝΙΑΣ	Egretta garzetta	2
41	ΝΥΚΤΟΚΟΡΑΚΑΣ-ΨΑΡΟΦΑΣ	Nycticorax nycticorax	1
42	ΕΡΩΔΙΟΣ ΠΥΡΟΧΡΟΥΣ-ΠΟΡΦΥΡΟΤΣΙΚΝΙΑΣ	Ardea purpurea	1
43	ΚΑΛΑΜΟΖΑΜΠΗΣ-ΚΑΛΑΜΟΚΑΝΑΣ	Himantopus himantopus	3
44	ΚΟΡΜΟΡΑΝΟΣ	Phalacrocorax carbo	23
45	ΚΙΡΚΟΣ-ΒΑΛΤΟΚΙΡΚΟΣ	Circus cyaneus	6
46	ΠΕΛΑΡΓΟΣ-ΛΕΥΚΟΠΕΛΑΡΓΟΣ	Ciconia ciconia	4
47	ΣΑΡΣΕΛΛΙ	Anas crecca	1
48	ΓΛΑΡΟΣ Ο ΜΕΛΑΧΡΟΥΣ	Larus fuscus	3
49	ΓΛΑΡΟΣ Ο ΜΙΚΡΟΣ	Larus ridipundus	9
50	ΦΑΛΚΟΝΙ-ΔΕΝΤΡΟΓΕΡΑΚΑΣ	Falco subbuteo	1
51	ΧΡΥΣΟΓΕΡΑΚΑΣ	Falco cherrug	1

Παράρτημα 5

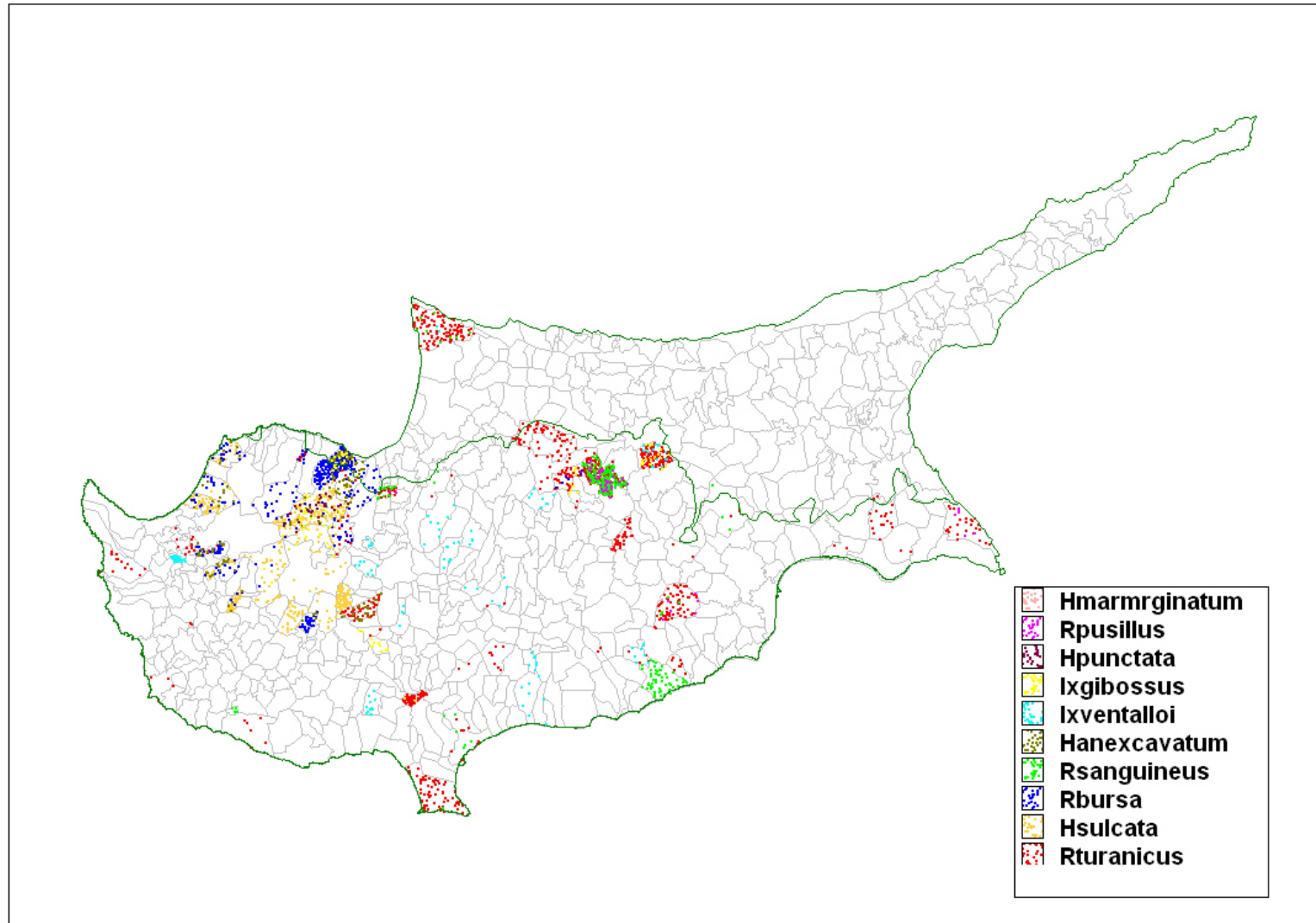
ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ [Compatibility Mode] - Microsoft Excel															
A274 163															
A	B	C	D	E	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
268	291	2949	31/10/04	38291	ΛΑΓΟΣ	4307Λ83	ΑΓ. ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΛΑΡΝ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
269	292	2950	31/10/04	38291	ΛΑΓΟΣ	4316Λ84	ΜΕΛΙΝΗ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
270	293	2951	31/10/04	38291	ΛΑΓΟΣ	4315Λ85	ΠΑΡΣΑΤΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
271	294	2952	31/10/04	38291	ΛΑΓΟΣ	4304Λ86	ΧΟΙΡΟΚΟΙΤΙΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
272	295	2953	31/10/04	38291	ΛΑΓΟΣ	4311Λ87	ΛΕΥΚΑΡΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
273	297	2970	31/10/04	38291	ΛΑΓΟΣ	1213Λ88	ΜΙΤΣΕΡΟΝ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
274	163	2/11	02/11/04	38293	ΑΝΘΡΩΠΟΠΟΥΛ	5000Τα6	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
275	164	4/11	02/11/04	38293	ΓΕΡΑΝΙΟΣ	4000Gg1	ΛΑΡΝΙΑΚΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
276	165	2690	02/11/04	38293	ΑΓΡΙΝΟ	1425Α43	ΛΑΤΑΝΙΑ ΔΑΣ/ΠΑΦΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	hamophys sulcata		1	3		
277		3690a								rhipicephala bursa				3	
278	230	2920	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	1457Λ89	Κ ΠΥΡΓΟΣ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
279	231	2921	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	5318Λ90	ΦΥΛΑΓΡΑ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ixodes ventalloi		1	1		
280	232	2922	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	5000Λ91	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
281	233	2923	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	5000Λ92	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
282	234	2924	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	5366Λ93	ΑΓΡΟΣ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
283	235	2925	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	5223Λ94	ΠΛΑΤΑΝΗΣΚΙΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
284	236	2926	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	5145Λ95	ΑΓ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
285	237	2927	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	5145Λ96	ΑΓ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
286	305	2932	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	1108Λ97	ΛΥΜΠΙΑ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	rhipicephala turanicus			1		
287	306	2933	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	1108Λ98	ΛΥΜΠΙΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
288	298	2971	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	1210Λ99	ΑΡΕΔΙΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
289	299	2972	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	1210Λ100	ΑΡΕΔΙΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
290	300	2973	03/11/04	38294	ΛΑΓΟΣ	1210Λ101	ΑΡΕΔΙΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
291	166	9/11	04/11/04	38295	ΚΙΤΣΗΣ	1225Ft11	ΤΣΕΡΙ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
292	167	10/11	04/11/04	38295	ΠΕΤΡΙΤΗΣ	1000Fp1	ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
293	168	14/11	04/11/04	38295	ΣΙΧΛΟΓΕΡΑΚΑ	5000An1	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
294	169	2706	04/11/04	38295	ΑΓΡΙΝΟ	6318Α17	ΛΥΣΟΣ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	hamophys sulcata		3	1		
295		2706a								rhipicephala bursa				3	
296	174	2699	04/11/04	38295	ΛΑΓΟΣ	4214Λ102	ΚΤΡΟΦ. ΣΤΑΥΡΟΒΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
297	175	2700	04/11/04	38295	ΛΑΓΟΣ	4214Λ103	ΚΤΡΟΦ. ΣΤΑΥΡΟΒΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
298	176	2701	04/11/04	38295	ΛΑΓΟΣ	4214Λ104	ΚΤΡΟΦ. ΣΤΑΥΡΟΒΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
299	177	2702	04/11/04	38295	ΛΑΓΟΣ	4214Λ105	ΚΤΡΟΦ. ΣΤΑΥΡΟΒΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
300	178	2703	04/11/04	38295	ΛΑΓΟΣ	4214Λ106	ΚΤΡΟΦ. ΣΤΑΥΡΟΒΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
301	170	2708	07/11/04	38298	ΑΓΡΙΝΟ	6219Α18	ΓΙΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΠΑΦΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	hamophys sulcata		11	7		
302	238	2928	07/11/04	38298	ΛΑΓΟΣ	1222Λ107	ΑΠΑΛΥΟΝΤΑΣ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
303	239	2929	07/11/04	38298	ΛΑΓΟΣ	5316Λ108	ΑΓ ΜΑΜΑΣ ΛΣΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
304	240	2930	07/11/04	38298	ΛΑΓΟΣ	5307Λ109	ΛΟΦΟΥ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
305	241	2931	07/11/04	38298	ΛΑΓΟΣ	1328Λ110	ΚΟΥΤΡΑΦΑΣ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
306	171	19/11	08/11/04	38299	ΑΝΘΡΩΠΟΠΟΥΛ	4000Τα7	ΛΑΡΝΙΑΚΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						
307	266	2954	10/11/04	38301	ΛΑΓΟΣ	1302Λ111	ΑΛΩΝΑ	ΝΑΙ	ΌΧΙ						

Βάση δεδομένων για καταχωρησεις δειγματοληψιών άγριων ζώων

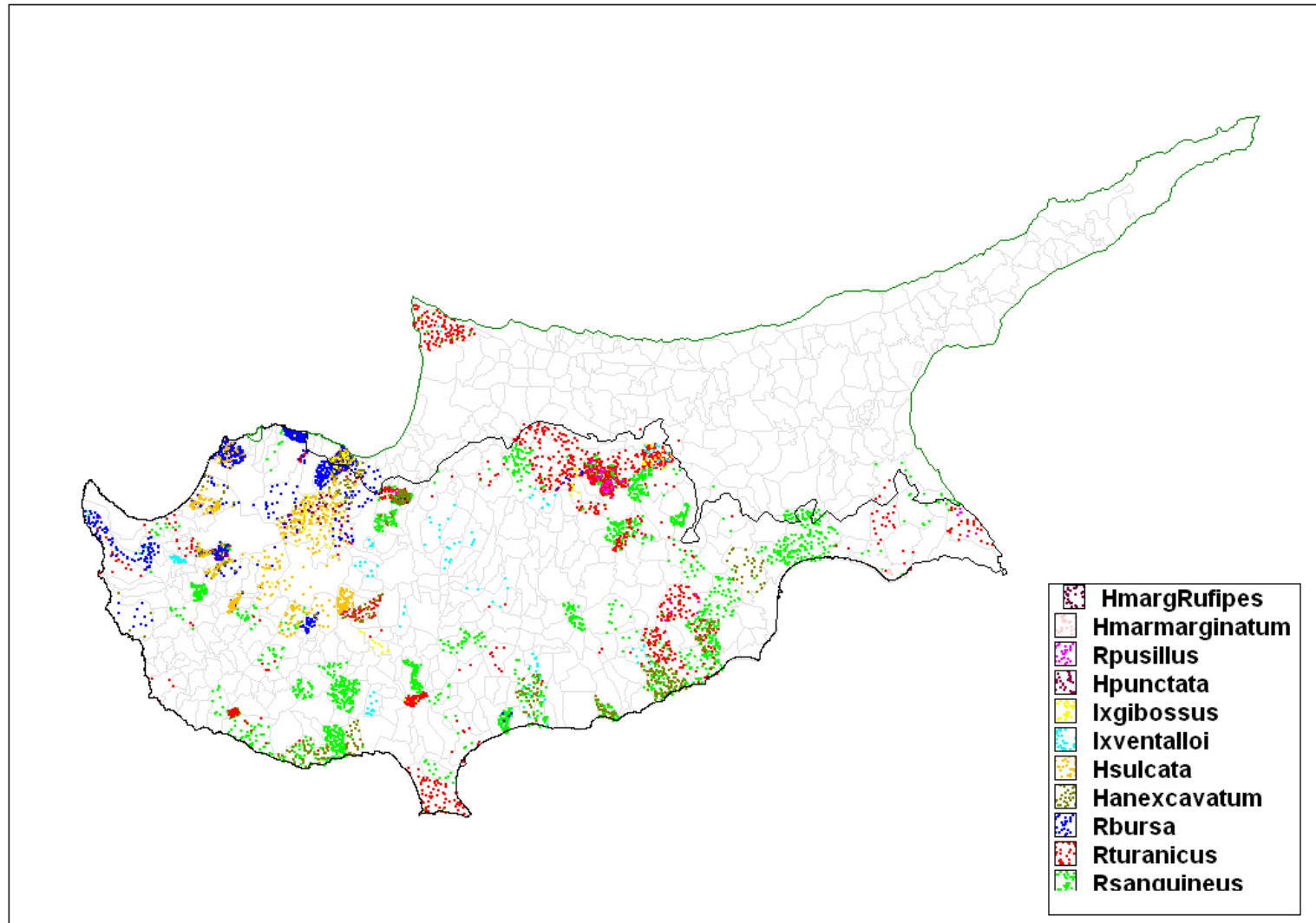
Παράρτημα 6



Χάρτης Α: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν συνολικά στα παραγωγικά ζώα.



Χάρτης Β: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν συνολικά στα άγρια ζώα.



Χάρτης Γ: Γεωγραφική κατανομή των κροτώνων που παρασιτούσαν συνολικά σε όλα τα είδη των ζώων.

