

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

ΧΟΧΛΑΚΗΣ ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ,
ΖΩΟΝΟΣΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
(WHO COLLABORATING CENTER)



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2009



Στο σπου μου
και στο σπορακούλη μου.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθ. μου Τσελέντη Ιωάννη γιατί μου έδωσε τη δυνατότητα να εργασθώ στο τμήμα του καθώς και να εκπονήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Ψαρουλάκη Άννα γιατί πίστεψε σε μένα από την αρχή, με στήριξε σε όλες τις δύσκολες στιγμές και με έκανε καλύτερο σαν άνθρωπο και σαν επιστήμονα μέσα από τις επικοδημητικές διαφωνίες μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθ. Γκίκα Αχιλλέα, την Επικ. Καθ. Αντωνίου Μαρία, την Επικ. Καθ. Σκούλικα Ευσταθία, την Καθ. Καλμαντή Μαρία και την Καθ. Παπαδάκη Ελένη για την τιμή που μου έκαναν να δεχθούν να συστήσουν την 7μελή μου επιτροπή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά της πτέρυγας, τη Χρυσούλα, τη Τζένη, τη Φιλία, τη Χαρά, τη Μάγδα, την Ιωάννα, και βέβαια το Σήφη και το Βασίλη γιατί με ανέχθηκαν τόσα χρόνια και με βοήθησαν εμπράκτως όποτε τους το ζήτησα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γιάννο στην Κύπρο γιατί εκτός από σπουδαίος συνεργάτης υπήρξε και πολύ καλός φίλος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Μανόλη και τον κύριο Λευτέρη από το Μικροβιολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου γιατί μου παρείχαν ό,τι τους ζήτησα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις αιμοδοσίες των νοσοκομείων για τα δείγματα τα οποία μας παρείχαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς μου και τον αδελφό μου που με έφτασαν έως εδώ.



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο ΧΟΧΛΑΚΗΣ ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ
 Όνομα πατέρα ΝΙΚΟΛΑΟΣ
 Όνομα μητέρας ΑΓΓΕΛΑ
 Τόπος γεννήσεως ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
 Ημερομηνία γεννήσεως 19.11.1978
 Οικογενειακή κατάσταση Έγγαμος
 Στρατιωτικές υποχρεώσεις Εκπληρωμένες
 Διεύθυνση κατοικίας ΟΔΟΣ ΦΙΛΑΡΕΤΟΥ ΑΡ. 9
 714 09 ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
 Τηλέφωνο 2810 232 850
 6973 094 389

ΣΠΟΥΔΕΣ

10/2000 – 09/2001 ΜΑΣΤΕΡ (MSc) στον τομέα της Κλινικής Βιοχημείας με Μοριακή Βιολογία (Clinical Biochemistry with Molecular Biology), στο Πανεπιστήμιο SURREY, Αγγλίας.
 09/1997 – 06/2001 Ιατρική Βιοχημεία (Medical Biochemistry), στο Πανεπιστήμιο SURREY, Αγγλίας, με βαθμολογική κατάταξη SECOND CLASS UPPER DIVISION (66%) για την απόκτηση του πτυχίου, που αντιστοιχεί σε 7,16 LIAN ΚΑΛΩΣ (ως Βεβαίωση ΔΙΚΑΤΣΑ)

ΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Πτυχιακή εργασία Έρευνα για το προσδιορισμό της συμπεριφοράς του ψευδαργύρου στον άνθρωπο (A Dynamic Function Test for the Assessment of Zinc Status).
 Μεταπτυχιακή εργασία Μελέτη συμπεριφοράς της μελατονίνης σε συνάρτηση με την ηλικία σε υγιείς ανθρώπους (πρωτοποριακή έρευνα) (A Longitudinal Study of the Relationship Between Melatonin Production and Age in Man).

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ Αγγλικά , άριστα (κάτοχος άδειας διδασκαλίας της Αγγλικής γλώσσας, από τη Β/θμια Εκπαίδευση Ν. Ηακλείου).
 Γαλλικά, πολύ καλά (Certificat de Langue Française)

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

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

02/2009 – ΣΗΜΕΡΑ Εργασία με σύμβαση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Επιτήρηση μικροβιολογικής ασφάλειας τροφίμων, υδάτων και περιβάλλοντος», στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας – Παρασιτολογίας.
 11/2008 – 01/2009 Εργασία με σύμβαση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Μελέτη του ιικού φορτίου στην HIV λοίμωξη και συσχέτιση του με την επιδημιολογία της ανοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα», στο Πανεπιστήμιο

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβάστες και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

10/2008 – 11/2008	Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας – Παρασιτολογίας. Εργασία με σύμβαση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «PCR δειγμάτων αίματος ασθενών και σκυλιών για Λεϊσμανίαση», στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας – Παρασιτολογίας.
01/2008 – 09/2008	Εργασία με σύμβαση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Εργαστηριακός – μικροβιολογικός έλεγχος βιολογικών δειγμάτων», στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας – Παρασιτολογίας.
04/2006 – 12/2007	Εργασία με σύμβαση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Μεταφορά τεχνογνωσίας σε θέματα εργαστηριακής διάγνωσης και μεθοδολογίας μοριακής επιδημιολογίας ζωνόσων και τροφιμογενών λοιμώξεων», στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας – Παρασιτολογίας.
01/2006 – 03/2006	Εργασία με σύμβαση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Εργαστηριακή διάγνωση ζωνόσων», στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας – Παρασιτολογίας.
02/2005 – 01/2006	Εργασία με σύμβαση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Επιδημιολογία και επιτήρηση ζωνόσων», στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας – Παρασιτολογίας.
11/2004 – 01/2005	Εργασία με σύμβαση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Επιδημιολογία και επιτήρηση ζωνόσων», στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας – Παρασιτολογίας.
10/2004 – 02/2005	Σύμβαση εργασίας ιδιωτικού δικαίου ορισμένου χρόνου με ωριαία αντιμισθία για τη διδασκαλία του μαθήματος της Βιοχημείας στο ΙΕΚ Ηρακλείου.
05/2004 – 10/2004	Εξάμηνη εργασία με σύμβαση στο Πανεπιστήμιο Κρήτης με έργο την ανίχνευση, καλλιέργεια και τυποποίηση <i>Legionella</i> sp. σε κλινικά δείγματα και δείγματα περιβάλλοντος.
07/2003 – 04/2004	Στο Βιοχημικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, ως άμισθος υπάλληλος.
02/2002 – 03/2003	Νοσηλεύτης στο Στρατό Ξηράς.
06/1999 – 09/1999	Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας - Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ηράκλειο. Παραγωγή ενζύμων.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

25/10/03 Αναλυτική αξιολόγηση Εργαστηριακών Μετρήσεων.

29/11/03 Ο έλεγχος ποιότητας στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας.



- 20/12/03 Κλινική αξιολόγηση Εργαστηριακών Μετρήσεων.
 31/01/04 Υδατάνθρακες.
 28/02/04 Λιπίδια – Λιποπρωτεΐνες
 15/05/04 Οξεοβασική ισορροπία – ηλεκτρολύτες.
 16/10/04 Ένζυμα

Τα Σεμινάρια οργανώθηκαν από την Ελληνική Εταιρία Κλινικής Χημείας – Κλινικής Βιοχημείας, στην Αθήνα.

- 18/03/06 Επιστημονική ημερίδα με θέμα: «Λοιμώξεις», Ηράκλειο Κρήτης
 23-25/5/07 Second International Conference of the Hellenic Proteomics Society, Ηράκλειο Κρήτης

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

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

- 1) Ιωάννου Ι., Χοχλάκης Δ., Παπαδόπουλος Β., Κασσίνης Ν., Ψαρουλάκη Α., Τσελέντης Γ. Arthropode-borne παθογόνα σε άγρια ζώα και αρθρώποδα στην Κύπρο.
- 2) Μηναδάκης Γ., Χοχλάκης Δ., Ματαλλιωτάκης Ε., Κατσανεβάκη Ζ., Σκορδιλάκη Α., Ψαρουλάκη Α., Τσελέντης Γ. Οροεπιδημιολογική μελέτη της «νόσου εξ' ονόχου γάλης» στην Κρήτη.
- 3) Χοχλάκης Δ., Ψαρουλάκη Α., Κοκκίνη Σ., Γκίκας Α., Τσελέντης Γ. Οροεπιδημιολογική μελέτη της αναπλάσμωσης στην Κρήτη.

17-18/05/06 Παρουσίαση εργαστηριακών και κλινικών δεδομένων σχετικά με την αναπλάσμωση, στους Ιατρικούς Συλλόγους της Λεμεσού και της Λευκωσίας.

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

- 1) Chochlakis Dimosthenis, Psaroulaki Anna, Kokkini Sofia, Kastanakis Serafim, Arkolaki Eva, Karagiannaki Eleni, Tsioutis Constantinos, Tselentis Ioannis, Gikas Achilleas. First evidence of *Anaplasma* infection in Crete, Greece. Report of six human cases.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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. Phylogentic analysis of *Anaplasma ovis* strains isolated from sheep and goats using groEL and mps4 genes. *Vet Microbiol*. 2009 Apr 19. [Epub ahead of print].
- 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, 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*. 2008 Oct 22. [Epub ahead of print].
- 6: 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.
- 7: Minadakis G, Chochlakis D, Kokkini S, Gikas A, Tselentis Y, Psaroulaki A. Seroprevalence of *Bartonella henselae* antibodies in blood donors in Crete. *Scand J Infect Dis*. 2008;40(10):846-7.
- 8: Turkmani A, Psaroulaki A, Christidou A, Chochlakis D, Tabaa D, Tselentis Y. In vitro-selected resistance to fluoroquinolones in two *Brucella* strains associated with mutational changes in gyrA. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Sep;32(3):227-32.
- 9: 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.
- 10: 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. Epub 2008 Feb 22.



ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	xii
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ, ΠΙΝΑΚΩΝ, ΣΧΗΜΑΤΩΝ, ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΧΑΡΤΩΝ	xiv
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
Αναπλάσματα – Εισαγωγικά στοιχεία	2
Ταξινόμηση	4
Βακτηριολογία	6
Πολλαπλασιασμός	6
Ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση	8
Μετάδοση	8
Ο ρόλος των κροτώνων	8
Άλλοι τρόποι μετάδοσης	9
Επιδημιολογία – Γεωγραφική κατανομή	10
Εποχιακή κατανομή	11
Παράγοντες κινδύνου	11
Μηχανισμοί παθογένειας του <i>A. phagocytophilum</i>	12
Επιβίωση του <i>A. phagocytophilum</i>	15
Κλινική εικόνα	20
Διάγνωση	23
Μη ειδικός εργαστηριακός έλεγχος	23
Ειδικός εργαστηριακός έλεγχος	23
Ορισμός κρούσματος (Case definition)	27
Θεραπεία	28
Αντοχή στα αντιβιοτικά	30
Αναπλάσμωση στα ζώα	32
<i>A. phagocytophilum</i>	33
Επιδημιολογία	33
Μετάδοση	33
Κλινική εικόνα λοίμωξης	34
Εργαστηριακή διάγνωση	34
<i>A. platys</i> , <i>A. bovis</i> , <i>A. ovis</i> , <i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i>	35
Επιδημιολογία	35
Μετάδοση	35

Κλινική εικόνα λοίμωξης.....	35
Εργαστηριακή διάγνωση.....	36
ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	38
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	43
Περιοχές μελέτης.....	43
Κρήτη.....	43
Κύπρος.....	44
Οροεπιδημιολογική μελέτη.....	46
Προσδιορισμός του οροεπιπολασμού των αντισωμάτων έναντι του <i>A. phagocytophilum</i> σε ανθρώπινο πληθυσμό.....	46
Οροεπιδημιολογική μελέτη σε δείγματα αιμοδοτών στην Κρήτη.....	47
Οροεπιδημιολογική μελέτη στον ανθρώπινο πληθυσμό στην Κύπρο.....	47
Οροεπιδημιολογική μελέτη σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας στην Κρήτη και την Κύπρο.....	48
Γονοτυπική ανίχνευση αναπλάσμάτων (<i>Anaplasma sp.</i>) σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές.....	50
Δειγματοληψία από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας και σκυλιά.....	50
Δειγματοληψία από άγρια ζώα – πουλιά.....	50
Ενεργή αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών αναπλάσματος.....	51
Εργαστηριακός έλεγχος δειγμάτων.....	52
Επεξεργασία δειγμάτων ορού, ολικού αίματος, γάλακτος.....	52
Επεξεργασία φίλτρων.....	53
Επεξεργασία εκτοπαρασίτων.....	53
Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA).....	54
Ανθρώπινα δείγματα.....	54
Δείγματα ζώων κτηνοτροφικής σημασίας.....	54
Εκχύλιση DNA.....	55
Γενωμικός πολλαπλασιασμός (PCR).....	55
Πρόβλεψη RFLP αποτυπωμάτων (patterns) με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής – RFLP ανάλυση.....	57
Ηλεκτροφόρηση.....	58
Αλληλουχοποίηση (sequencing analysis).....	59
Επεξεργασία κι ανάλυση αποτελεσμάτων.....	59



Φυλογενετική ανάλυση.....	59
Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	60
Γεωγραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων.....	60
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
Οροεπιδημιολογική μελέτη.....	61
Οροεπιδημιολογική μελέτη σε δείγματα αιμοδοτών στην Κρήτη.....	61
Οροεπιδημιολογική μελέτη στον ανθρώπινο πληθυσμό σε περιοχή υψηλού κινδύνου στην Κρήτη.....	66
Οροεπιδημιολογική μελέτη στον ανθρώπινο πληθυσμό στην Κύπρο.....	67
Αναζήτηση αντισωμάτων έναντι του <i>A. phagocytophilum</i> σε δείγματα ορών ζώων κτηνοτροφικής σημασίας.....	70
Γονοτυπική ανίχνευση αναπλασμάτων (<i>Anaplasma sp.</i>) σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές.....	72
Γονοτυπική ανίχνευση των αναπλασμάτων σε πιθανά-ζώα υπόδοχα.....	72
Δείγματα προβάτων στην Κρήτη.....	72
Δείγματα ζώων κτηνοτροφικής σημασίας στην Κύπρο.....	73
Δείγματα σκυλιών.....	76
Δείγματα άγριων ζώων και πτηνών.....	76
Γονοτυπική ανίχνευση των αναπλασμάτων σε αρθρόποδα-μεταβιβαστές.....	78
Παρασιτισμός.....	78
Μελέτη των εκτοπαρασίτων με μοριακές μεθόδους.....	79
Ενεργή αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών.....	80
Περιστατικό 1.....	83
Περιστατικό 2.....	84
Περιστατικό 4.....	85
Περιστατικό 5.....	86
Περιστατικό 6.....	87
Μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση – Μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας μετάδοσης.....	92
Ζώα κτηνοτροφικής σημασίας.....	92
Ανθρώπινα περιστατικά.....	99
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	136
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	150

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	150
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2	151
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3	153
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4	154
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5	155
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6	156
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7	157
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8	158
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9	159
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10	160
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11	161
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12	162
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13	163



ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

γ-GT:	γ-glutamyl transpeptidase
ALP:	Alkaline phosphatase
ALT:	Alanine transaminase
ARDS:	Adult Respiratory Distress Syndrome
AST:	Aspartate transaminase
ASTO:	Anti-streptolysin O titer
ATCC:	American Type Culture Collection
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
CCHF:	Crimean-Congo haemorrhagic fever
CDC:	Center for Disease Control
CRP:	C-reactive protein
CMV:	Cytomegalovirus
EBV:	Epstein-barr virus
ESR:	Erythrocyte Sedimentation Rate
FBC:	Full blood count
FBS:	Foetal bovine serum
GIS:	Geographic information system
HB:	Haemoglobin
HEE:	Human ewingii ehrlichiosis
HIV:	Human immunodeficiency virus
HFRS:	Hemorrhagic fever with renal syndrome
HGE:	Human granulocytic ehrlichiosis
HME:	Human monocytic ehrlichiosis
HSV:	Herpes simplex virus

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβάστες και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

IUCN: International Union for Conservation of Nature

IFA: Indirect immunofluorescence assay

IV: Intravenously

IVIG: Intravenous immunoglobulin

KD: Kawasaki disease

LDH: Lactate dehydrogenase

mg: miligram

MIC: Minimum inhibitory concentration

mm/hr: millimeters per hour

MRI: Magnetic resonance imaging

MSPs: Major surface proteins

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

PLT: Platelets

PSGL-1:P-selectin glycoprotein ligand-1

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

SOD: Superoxide dismutase

TAE: Tris-acetate-EDTA

TBE: Tick-borne encephalitis

U/L: Units per liter

UV: Ultraviolet

VZV: Varicella zoster virus

WHO: World Health Organisation

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ, ΠΙΝΑΚΩΝ, ΣΧΗΜΑΤΩΝ,

ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΧΑΡΤΩΝ

Εικόνα 1: Φυλογενετική και ταξινομική διάταξη των ειδών της οικογένειας Σελ. 6

Anaplasmataceae.

Εικόνα 2: Κύκλος του *A. phagocytophilum* από την αρχική προσβολή Σελ. 7

κυττάρων του αίματος μέχρι την τελική προσβολή οργάνων.

Εικόνα 3: Μόλυνση κυττάρων με *A. phagocytophilum* B: Ουδετερόφιλα του Σελ. 24

περιφερικού αίματος. D: Κύτταρα HL-60 σε κυτταροκαλλιέργεια.

Διάγραμμα 1: Πορεία ενεργειών που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη. Σελ: 42

Πίνακας 1: Κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις μετά από λοίμωξη από το *A.* Σελ. 22

phagocytophilum, σε 15 περιστατικά στην Ευρώπη.

Πίνακας 2: Ευαισθησία των προτεινόμενων μεθόδων για την εργαστηριακή Σελ. 27

ανίχνευση του *A. phagocytophilum*.

Πίνακας 3: Προτεινόμενη θεραπεία για ενήλικες και παιδιά για λοίμωξη από Σελ. 29

το *A. phagocytophilum*.

Πίνακας 4α, 4β: Ενεργότητα διάφορων αντιβιοτικών ουσιών έναντι του *A.* Σελ. 32

phagocytophilum.

Πίνακας 5: Εναρκτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση DNA των Σελ. 56

αναπλασμάτων στα υπό μελέτη δείγματα. *A. phag*: *A. phagocytophilum*.

Πίνακας 6: Οροθετικότητα για τις ομάδες του πληθυσμού των αιμοδοτών Σελ. 63

της Κρήτης.

Πίνακας 7: Συνολικός αριθμός δειγμάτων υγιούς πληθυσμού της περιοχής Σελ. 67

των Ανωγείων ανά φύλο και ηλικιακή ομάδα.

Πίνακας 8: Θετικά δείγματα για τα IgG αντισώματα του υγιούς πληθυσμού της περιοχής των Ανωγείων ανά φύλο και ηλικιακή ομάδα. Σελ. 67

Πίνακας 9: Ορολογικός έλεγχος ανθρώπινου πληθυσμού στην Κύπρο. Σελ. 68

Πίνακας 10: Ορολογικός έλεγχος ανθρώπινου πληθυσμού της Κύπρου μετά από τη κατηγοριοποίηση σε 2 ομάδες, υψηλού και χαμηλού κινδύνου. Σελ. 68

Πίνακας 11: Ορολογικός έλεγχος των ζώων κτηνοτροφικής σημασίας στις 5 επαρχίες της Κύπρου για αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum*. Σελ. 71

Πίνακας 12: Οροθετικότητα έναντι του *A. phagocytophilum* σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας σε διάφορες μελέτες στην Ευρώπη. Σελ. 72

Πίνακας 13: Έλεγχος με PCR των δειγμάτων γάλακτος κι αίματος των προβάτων της περιοχής των Ανωγείων. Σελ. 73

Πίνακας 14: Έλεγχος με PCR των δειγμάτων των ζώων κτηνοτροφικής σημασίας στις 5 επαρχίες στην Κύπρο. Σελ. 74

Πίνακας 15: Κατανομή των γενοτύπων στις 5 επαρχίες και στα 2 είδη ζώων. Σελ. 75

Πίνακας 16: Έλεγχος με PCR των δειγμάτων των σκυλιών στην Κύπρο. Σελ. 76

Πίνακας 17: Έλεγχος με PCR των φίλτρων των άγριων ζώων στην Κύπρο. Σελ. 77

Πίνακας 18: Συλλεχθέντες κρότνες από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας. Σελ. 78

Πίνακας 19: Παρασιτισμός άγριων θηλαστικών και πτηνών Σελ. 79

Πίνακας 20: Έλεγχος με PCR των συλλεχθέντων εκτοπαρασίτων από τα κτηνοτροφικής σημασίας ζώα Σελ. 79

Πίνακας 21: Έλεγχος με PCR των συλλεχθέντων εκτοπαρασίτων από τα άγρια ζώα και πτηνά της Κύπρου. Σελ. 80

Πίνακας 22 Επιβεβαιωμένα περιστατικά λοίμωξης από *A. phagocytophilum* στην Νότιο-ανατολική Μεσόγειο. Σελ. 91



- Πίνακας 23:** Κλινικά κι εργαστηριακά ευρήματα των καταγεγραμμένων Σελ. 92 περιστατικών σε Ελλάδα και Κύπρο.
- Πίνακας 24:** Θέσεις στις αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου *groEL* που Σελ. 96 παρουσιάζουν σημειακές μεταλλάξεις (point mutations) ή τριπλέτες εισαγωγής (triplet insertions).
- Πίνακας 25:** Θέσεις στις αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου *msp4* που Σελ. 97 παρουσιάζουν σημειακές μεταλλάξεις (point mutations).
- Πίνακας 26:** Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών, του γονιδίου *groEL*, Σελ. 101 στελεχών που έχουν κατατεθεί στην Genbank.
- Πίνακας 27:** Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών, του γονιδίου *msp4*, Σελ. 102 στελεχών που έχουν ανιχνευθεί σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες.
- Πίνακας 28:** Σύγκριση των αλληλουχιών των ανιχνευθέντων στελεχών Σελ. 107 *Anaplasma* sp. σε ανθρώπους με τις αντίστοιχες σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας, με βάση το γονίδιο 16s rRNA.
- Σχήμα 1:** Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών φαγοκυττάρωσης που Σελ. 14 εξαρτώνται από το οξυγόνο.
- Σχήμα 2:** Αναστολή της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης από το *A.* Σελ. 18 *phagocytophilum*.
- Σχήμα 3:** Αναστολή της NADPH oxidase από το *A. phagocytophilum*. Σελ. 19
- Σχήμα 4:** Εργαστηριακή, κλινική και θεραπευτική προσέγγιση ασθενούς με Σελ. 30 ιστορικό έκθεσης σε κρότωνες και πυρετό αγνώστου αιτιολογίας.
- Σχήμα 5:** Σχηματική αναπαράσταση του προσδοκώμενου προφίλ με βάση το Σελ. 58 κόψιμο των γονιδίων *groEL* κι *msp4* με τα περιοριστικά ένζυμα *HaeIII* και *ApoI*, αντίστοιχα.

- Σχήμα 6:** Κόψιμο του περιοριστικού ενζύμου *HaeIII* στο γονίδιο *groEL*. Σελ. 162
- Σχήμα 7:** Κόψιμο του περιοριστικού ενζύμου *ApoI* στο γονίδιο *msp4*. Σελ. 163
- Γράφημα 1:** Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση το μήνα Σελ. 64
(cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 2:** Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση επάγγελμα Σελ. 64
(cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 3:** Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση την ηλικία Σελ. 65
(cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 4:** Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση τον νομό Σελ. 65
και το μήνα (cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 5:** Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση την περιοχή Σελ. 66
(cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 6:** Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση το φύλο Σελ. 66
(cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 7:** Οροθετικότητα στο δείγμα του πληθυσμού στην Κύπρο με βάση Σελ. 69
το φύλο (cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 8:** Οροθετικότητα στο δείγμα του πληθυσμού στην Κύπρο με βάση Σελ. 69
την ηλικία (cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 9:** Οροθετικότητα στο δείγμα του πληθυσμού στην Κύπρο με βάση Σελ. 70
την επαρχία (cut-off: IgG \geq 1/128).
- Γράφημα 10:** Φυλογενετικό δένδρο που απεικονίζει την ομαδοποίηση των Σελ. 98
αλληλουχιών του γονιδίου *msp4*.
- Γράφημα 11:** Φυλογενετικό δένδρο που απεικονίζει την ομαδοποίηση των Σελ. 99
αλληλουχιών του γονιδίου *groEL*.



Γράφημα 12: Φυλογενετικό δένδρο που απεικονίζει την ομαδοποίηση των αλληλουχιών των γονιδίων *msp4* και *groel* για το περιστατικό *A. ovis*. Σελ: 103

Γράφημα 13: Φυλογενετικό δένδρο για το ανθρώπινο στέλεχος *A. phagocytophilum*. Σελ: 105

Γράφημα 14: Φυλογενετικό δένδρο σύγκρισης ανθρώπινων στελεχών *Anaplasma* sp. με βάση το γονίδιο 16s rRNA. Σελ: 108

Χάρτης 1: Διασπορά των IgG αντισωμάτων των αιμοδοτών έναντι του *A. phagocytophilum* στην Κρήτη. Σελ: 157

Χάρτης 2: Επιπολασμός σε δείγματα αιγών στην Κύπρο (cut-off: IgG \geq 1/128). Σελ: 158

Χάρτης 3: Επιπολασμός σε δείγματα προβάτων στην Κύπρο (cut-off: IgG \geq 1/128). Σελ: 158

Χάρτης 4: Επιπολασμός σε δείγματα βοοειδών στην Κύπρο (cut-off: IgG \geq 1/128). Σελ: 159

Χάρτης 5: Μοριακός έλεγχος των δειγμάτων (αίμα, γάλα) των προβάτων της περιοχής των Ανωγείων για αναπλάσματα. Σελ: 160

Χάρτης 6: Απεικόνιση των καταγεγραμμένων ανθρώπινων περιστατικών, των περιοχών στις οποίες ανιχνεύθηκε θετική PCR για τα αναπλάσματα και των περιοχών στις οποίες πραγματοποιήθηκε έλεγχος για IgG αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum*. Σελ: 161

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αναπλάσματα – Εισαγωγικά στοιχεία

Οι αναπλασμές (πρώην ερλιχίωσης) 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 είχαν 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 (Dumler και Bakken 1998).

Η οικογένεια *Anaplasmataceae* (πρώην *Ehrlichiae*) περιλαμβάνει υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια τα οποία προσβάλλουν τα λευκοκύτταρα του ανθρώπου και των ζώων. Στον κύκλο μετάδοσής τους εμπλέκονται διάφορα είδη θηλαστικών που λειτουργούν ως υπόδοχα, καθώς και είδη αρθροπόδων (κυρίως κρότωνες) που λειτουργούν ως μεταβιβαστές.

Πολλά είδη των αναπλασμάτων περνούν μέρος του κύκλου ζωής τους σε έναν ξενιστή, συνηθέστερα ένα σκληρό (hardshell) κρότωνα. Σε αντίθεση με άλλα είδη βακτηρίων της τάξης των Rickettsiales οποία οι κρότωνες λειτουργούν και σαν υπόδοχα αφού μεταδίδονται από γενιά σε γενιά, στην περίπτωση των αναπλασμάτων, δεν έχει μέχρι σήμερα, αποδειχθεί η διωθητική μετάδοση. Επομένως, ο ρόλος που διαδραματίζουν τα θηλαστικά σαν φυσικοί ξενιστές και σαν υπόδοχα στη διατήρηση και διαδοση των βακτηρίων αυτών στην φύση είναι πολύ σημαντικός (Dumler και Bakken 1998).

Ο όρος «ερλιχίωση» (ehrlichiosis) είναι ένας πολύ ασαφής όρος που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότινος για να χαρακτηρίσει την νόσο που εμφανίζεται μετά από μόλυνση από οποιοδήποτε από τα βακτήρια της οικογένειας των *Anaplasmataceae*. Η μεγάλη πλειοψηφία των βακτηρίων αυτής της οικογένειας ήταν πιο γνωστά ως αιτιολογικοί παράγοντες κτηνιατρικών νοσημάτων. Τα τελευταία χρόνια, με την καταγραφή ανθρώπινων λοιμώξεων, η έρευνα στράφηκε στη βελτίωση των μεθόδων διάγνωσης, της επιδημιολογικής επιτήρησης, της παθοφυσιολογίας και της παθογένεσης αυτών των αναδυόμενων ζωνοσόων. Τα τελευταία χρόνια έχει επίσης πραγματοποιηθεί σημαντική έρευνα για τη βελτίωση της ταξινόμησης και της τυποποίησης των αναπλασμάτων. Παρ' όλα αυτά, ακόμα και μετά την νέα ταξινόμηση των αναπλασμάτων και των ερλιχιών, τα κλινικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, οι παθογενετικοί μηχανισμοί που συνδέονται με κάθε παθογόνο και η διάκριση των λοιμώξεων μέσω της εργαστηριακής διάγνωσης θεωρούνται ζητήματα ανοικτά.

Η διαφορική διάγνωση δεν είναι εύκολη αφού τα κλινικά χαρακτηριστικά (πυρετός αγνώστου αιτιολογίας, θρομβοπενία, λευκοπενία, ή/και ήπια αύξηση των ηπατικών ενζύμων) δεν είναι ειδικά (Bakken και Dumler 2000). Επίσης, η εργαστηριακή διάγνωση η οποία γίνεται κυρίως ορολογικά, δεν είναι ειδική αφού παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις λόγω κοινών ανοσογόνων πρωτεϊνών με άλλα είδη της τάξης των Rickettsiales. Επιπλέον, η ανταπόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία, που συνήθως είναι η δοξυκυκλίνη, δεν είναι ενδεικτική, αφού σχεδόν όλα τα είδη των Rickettsiales, σε γενικές γραμμές ανταποκρίνονται στην ίδια θεραπεία (Bakken και Dumler 2000).



Ταξινόμηση

Το γένος *Ehrlichia* αρχικά κατατάχθηκε στην ομάδα Ehrlichiae, της οικογένειας Rickettsiaceae, της τάξης Rickettsiales. Το γένος περιελάμβανε αρχικά 7 αναγνωρισμένα είδη: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi*, *A. phagocytophilum* (πρώην *E. phagocytophila*), *E. risticii*, *E. ewingii*, και *E. sennetsu* (Dumler και Bakken 1998).

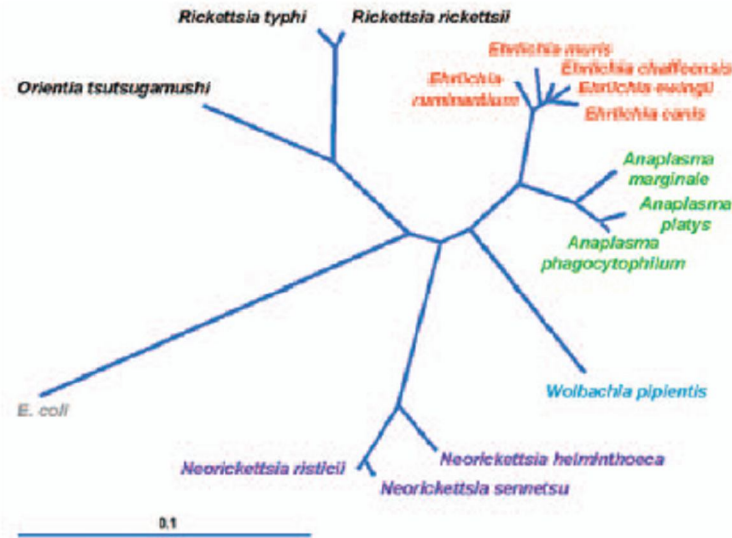
Επιπλέον είχαν προταθεί τα παρακάτω είδη που προκαλούν ασθένειες στα ζώα: «*E. platys*», «*E. bovis*», «*E. ovina*» και «*E. ondiri*». Τα ονόματα των τελευταίων οργανισμών βρίσκονται σε εισαγωγικά γιατί δεν έχουν προταθεί επίσημα σύμφωνα με τους κανόνες του Διεθνούς Κώδικα για την ονοματολογία των Βακτηρίων (ICNB) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?indexed=google&rid=icnb.TOC>).

Επειδή πολλοί από τους παράγοντες της ερlichίωσης ανακαλύφθηκαν πριν από τη ανάπτυξη σύγχρονων εργαλείων για τη γενετική ταξινόμηση, η ταξονομική δομή βασίστηκε σε διάφορα σχετικά υποκειμενικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, συμπεριλαμβανομένης της μορφολογίας, του τύπου κυττάρου που προσέβαλλε το κάθε παθογόνο, του είδους των ζώων, τις κλινικές εκδηλώσεις και ασαφείς ορολογικές διασταυρούμενες αντιδράσεις. Με την εισαγωγή των μοριακών φυλογενετικών εργαλείων, έγινε εμφανές ότι υπήρχε αταξία μεταξύ των οργανισμών που συμπεριελάμβαναν τα γένη της ομάδας. Πρόσφατα κατέστη δυνατή μία αναταξινόμηση αλλά και αλλαγή στην ονοματολογία καθώς και μία αναδιάρθρωση της δομής της μεγάλης οικογένειας των Rickettsiaceae. Σύμφωνα με αυτήν, τα είδη *Ehrlichia*, *Neorickettsia* και *Wolbachia* τοποθετήθηκαν στο γένος των Ehrlichieae. Η *E. sennetsu* και η *E. risticii* εντάχθηκαν στο γένος *Neorickettsia*, ενώ η *Cowdria ruminantium* στο γένος *Ehrlichia*. Κατέστη επίσης δυνατή η ομαδοποίηση των *E. phagocytophila*, *E. equi* και του ανθρώπινου κοκιοκυτταρικού παράγοντα της ερlichίωσης (HGE) σαν ένα ενιαίο είδος, οριζόμενο τώρα ως *A. phagocytophilum*,

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, αντίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

καθώς και η νέα τοποθέτηση των *E. platys* και *E. bovis* επίσης στο γένος *Anaplasma* μετονομαζόμενα σε *A. platys* και *A. bovis* (Dumler και λοιποί 2001).

Από τα παραπάνω είδη, την παθολογία του ανθρώπου ενδιαφέρουν κυρίως τα στελέχη *E. sennetsu*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* και το *A. phagocytophilum*. Η *E. sennetsu* που προκαλεί την ιαπωνική λοιμώδη μονοπυρήνωση ή γαγγλιακό πυρετό ήταν η πρώτη παθογόνος ερλίχια που περιγράφηκε στον άνθρωπο (Inokuma και λοιποί 2001), ενώ πολύ αργότερα, το 1986, περιγράφηκε η αμερικανική ερλιχίωση με την ανακάλυψη της *E. chaffeensis*. Ο μεταβιβαστής (*Lone star*) της *E. chaffeensis*, που μολύνει τα μονοκύτταρα στο περιφερικό αίμα και προκαλεί την ανθρώπινη μονοκυτταρική ερλιχίωση (HME), δεν υπάρχει στην Ευρώπη όπου δεν έχουν περιγραφεί κρούσματα μέχρι σήμερα (Dumler 2005). Στενά συγγενικό είδος με την *E. chaffeensis* είναι η *E. ewingii* η οποία μολύνει τα ουδετερόφιλα και προκαλεί την ανθρώπινη ερλιχίωση του Ewingii (HEE) κι η οποία συγγενεύει φυλογενετικά με το *A. phagocytophilum* (Buller και λοιποί 1999). Στην Ευρώπη έχει περιγραφεί η ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική ερλιχίωση (HGE, σήμερα αναπλάσμωση) για την οποία οι αιτιολογικοί παράγοντες που έχουν αναφερθεί είναι βακτήρια της γενωμικής ομάδας του *A. phagocytophilum* (Bakken και Dumler 2000).



Εικόνα 1: Φυλογενετική και ταξινομική διάταξη των ειδών της οικογένειας *Anaplasmataceae* (Dumler και λοιποί 2005).

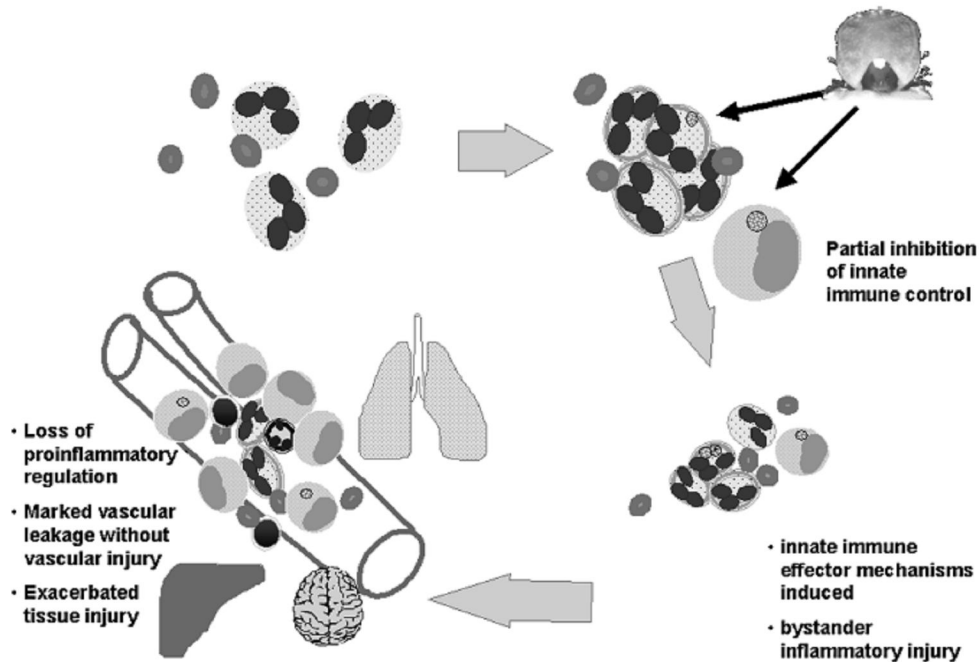
Βακτηριολογία

Τα αναπλάσματα, είναι μικρά, υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια με χαρακτηριστικά gram-αρνητικών βακτηρίων που όμως δεν βάφονται με τη χρώση Gram. Μολύνουν τα φαγοκύτταρα που παράγονται στον μυελό των οστών. Τα βακτήρια μέσα στο κύτταρο-στόχο (λευκοκύτταρο) έχουν τη μορφή λεπτών, μικρών στρογγυλών κόκκων διαμέτρου 1-3 μm και αποτελούνται από ένα κυψελοειδές τοίχωμα από το οποίο όμως λείπουν τα στοιχεία βιοσύνθεσης του λιποπολυσακχαρίτη (Lin και Rikihisa 2003).

Πολλαπλασιασμός

Αφού εισβάλλουν στα κύτταρα-ξενιστές, τα βακτήρια διαιρούνται μέσα σε κενοτόπια με απλή διχοτόμηση για να σχηματίσουν αποικίες γνωστές σαν «μούρα» («morula») (κύτταροπλασματικά έγκλειστα). Ο σχηματισμός του «μούρου» είναι ένα τυπικό χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας των βακτηρίων. Πρόσφατες έρευνες ανέδειξαν την

ύπαρξη πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος IV, που στόχο έχει την μεταφορά θρεπτικών συστατικών μεταξύ του βακτηρίου και του κυττάρου ξενιστή (Rikihisa 2003). Μετά τη μόλυνση ακολουθεί αναστολή της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος (φαγοκυττάρωση) (Ge και Rikihisa 2006), πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και προσβολή και άλλων οργάνων.



Εικόνα 2: Κύκλος των αναπλασμάτων από την αρχική προσβολή κυττάρων του αίματος μέχρι την τελική προσβολή οργάνων (Dumler 2005).

Ειδικά για το *A. phagocytophilum*, προτιμητέα κύτταρα-στόχοι είναι τα μυελογενή ή κοκκιοκύτταρα (όπως τα ουδετερόφιλα ή η κυτταρική σειρά HL-60 που χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες και είναι ανθρώπινα προμυελοκύτταρα από καυκάσια γυναίκα με λευχαιμία). Όταν τα κύτταρα διαφοροποιηθούν σε μονοκύτταρα τότε παύουν να υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό του *A. phagocytophilum*.



Ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση

Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με βάση το γονίδιο *msp2* έχει κατατεθεί η άποψη ότι το *A. phagocytophilum*, ο αιτιολογικός παράγοντας της ανθρώπινης κοκκιοκυτταρικής αναπλάσμωσης, έχει ηλικία 40-80 εκατομμύρια χρόνια (Foley και λοιποί 2008). Παρ' όλα αυτά, αρχικά, η ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση (HGA) προσδιορίστηκε το 1990 σε έναν ασθενή του Wisconsin που πέθανε από εμπύρετο νόσημα 2 εβδομάδες μετά από δήγμα από κρότωνο. Κατά τη διάρκεια του τελικού σταδίου της λοίμωξης, «συσσωματώματα» μικρών βακτηρίων ανιχνεύθηκαν μέσα σε ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος, τα οποία βακτήρια κατηγοριοποιήθηκαν σαν gram αρνητικοί κόκκοι. Αργότερα, προσεκτικότερη ανασκόπηση της κηλίδας του αίματος ανέδειξε προσβολή των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Ο ορολογικός και ανοσο-ιστοχημικός έλεγχος ήταν θετικοί για αντισώματα έναντι της *E. chaffeensis* (Chen και λοιποί 1994). Η *E. chaffeensis* μεταδίδεται μεταξύ άλλων στον άνθρωπο και τα σκυλιά από τον κρότωνο Lone Star και προκαλεί την ανθρώπινη μονοκυτταρική ερλιχίωση (HME) (Zhang και λοιποί 2007).

Τελικά η ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση για πρώτη φορά περιγράφηκε στις ΗΠΑ το 1994 (Bakken και λοιποί 1994).

Μετάδοση

Ο ρόλος των κροτώνων

Μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν, σε διάφορα μέρη του κόσμου, με σκοπό τη διερεύνηση των ενδιάμεσων και των φυσικών ξενιστών για το κάθε είδος της οικογένειας Anaplasmataceae (Ehrlichiae), έδειξαν ότι οι σημαντικότεροι μεταβιβαστές τους είναι οι κρότωνες της οικογένειας Ixodidae.

Στην Ευρώπη το *A. phagocytophilum* μεταδίδεται, μεταξύ άλλων, στον άνθρωπο, τα κυνοειδή, τα άλογα (Butler και λοιποί 2008) και τα πρόβατα (Matsumoto και λοιποί 2006) από τον κρότωνα *Ixodes ricinus*. Στην Αμερική ο κρότωνα *I. scapularis* είναι ο κύριος μεταβιβαστής στις βορειοανατολικές και βορειοδυτικές περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών (Pancholi και λοιποί 1995) κι ο *I. pacificus* σε περιοχές που βρέχονται από τον Ειρηνικό Ωκεανό (Richter και λοιποί 1996). Σε περιοχές της Ασίας πιθανός μεταβιβαστής θεωρείται ο κρότωνα *I. persulcatus* (Santos και λοιποί 2004). Σε αντίθεση με άλλα κροτανο-μεταδιδόμενα βακτήρια (όπως για παράδειγμα οι ρικέτσιες) για τα οποία συμβαίνει διωθητική (transovarial) μετάδοση του βακτηρίου, στην περίπτωση της αναπλάσμωσης δεν έχει αποδειχθεί τέτοιος τρόπος μετάδοσης. Επομένως η μόλυνση των κροτώνων είναι δυνατή μονάχα μετά από γεύμα αίματος σε κάποιο μολυσμένο θηλαστικό-ξενιστή (Dumler και Bakken 1998). Λόγω του μικρού 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 και λοιποί 2005).

Άλλοι τρόποι μετάδοσης

Λοίμωξη από το παθογόνο έχει αναφερθεί σε προσωπικό σφαγείων το οποίο τεμάχιζε μεγάλες ποσότητες φρέσκων κρεάτων. Πιθανότατα, ακόμα κι η έκθεση σε μολυσμένο αίμα είναι αρκετή για μόλυνση από τον HGE μέσω εκδορών του δέρματος ή μόλυνσης των βλεννογόνων (Bakken και Dumler 2006). Έχει επίσης αναφερθεί κι η μεταφορά του παθογόνου κατά τη μετάγγιση αίματος (Leiby και λοιποί 2002), κατά



τη διάρκεια μεταμόσχευσης (Thomas και λοιποί 2007), διαπλακουντικά (Horowitz και λοιποί 1998) κι ενδονοσοκομειακά (Krause και Wormser 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.

Επιδημιολογία – Γεωγραφική κατανομή

Στις ΗΠΑ, από το 1986, τουλάχιστον 1.979 ανθρώπινες περιπτώσεις HME και 2.189 περιπτώσεις HGA έχουν αναφερθεί στο CDC (Dumler και λοιποί 2007). Τα παραπάνω δεδομένα τοποθετούν την ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση (HGA) και την ανθρώπινη μονοκυτταρική ερλιχίωση (HME) ανάμεσα στις πιο κοινές κροτωνογενείς (tick-borne) λοιμώξεις στις ΗΠΑ, καταλαμβάνοντας την τρίτη και τέταρτη θέση αντίστοιχα, μετά από τη νόσο του Lyme και τον πυρετό των βραχωδών ορέων (Rocky mountain fever) (Demma και λοιποί 2005).

Αξίζει 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. Θα πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι οι τετρακυκλίνες δεν είναι ενεργές 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 (Parola και λοιποί 2005).

Στην Ευρώπη το *A. phagocytophilum* είχε αναγνωριστεί στα ζώα από τη δεκαετία του 1930 (Stuen 2007). Έχει ανιχνευτεί με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) σε κρότωνες του γένους *Ixodes* σε Γαλλία, Σλοβενία, Σουηδία,

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

Ολλανδία, Ιταλία, Βουλγαρία, Ρωσία και Γερμανία (Blanco και Oteo 2002). Πρώτη περίπτωση αναπλάσματος στον άνθρωπο αναφέρθηκε στη Σλοβενία το 1995 (Petronov και λοιποί 1997) και από τότε πάνω από 60 περιπτώσεις έχουν επιβεβαιωθεί εργαστηριακά (Ολλανδία, Σουηδία, Σλοβενία, Ισπανία, Αυστρία, Πολωνία, Γαλλία) (Blanco και Oteo 2002). Σε ασθενείς στην Ευρώπη έχουν αναφερθεί ποσοστά από 7.5% ως 24% συ-λοίμωξης από *A. phagocytophilum* και *B. burgdorferi* (Loebermann και λοιποί 2006).

Περιστατικά λοίμωξης από την HGA έχουν αναφερθεί στην Κίνα (Wen και λοιποί 2003), τη σιβηρική Ρωσία και την Κορέα (Dumler και λοιποί 2005).

Τελευταίες μελέτες αναφέρουν και τα αποδημητικά – μεταναστευτικά πουλιά στους πιθανούς φορείς μετάδοσης της νόσου (Daniels και λοιποί 2002).

Εποχιακή κατανομή

Συνηθέστερη εμφάνιση της νόσου είναι κατά την περίοδο Απριλίου-Οκτωβρίου (κορύφωση τον Ιούνιο), η οποία είναι η περίοδος κατά την οποία ωριμάζουν οι νύμφες σε κρότωνα. 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.

Παράγοντες κινδύνου

Ανάλυση των οροεπιδημιολογικών μελετών για το *A. phagocytophilum* αποκαλύπτει επιπολασμό της τάξεως του 5.6% στην Ευρώπη και 3% στη Βόρεια Αμερική. Υψηλότερα ποσοστά της τάξης του 9.1% στην Ευρώπη και 5.3% στη Βόρεια Αμερική αναφέρονται για πληθυσμούς υψηλού κινδύνου (ασθενείς με προϋπάρχουσα λοίμωξη από *B. burgdorferi*, με ιστορικό έκθεσης σε κρότωνα, έκθεσης σε γάτα ή



σκύλο, αγρότες, εργαζόμενους στα δάση) (Dumler 2005). Οι περισσότεροι ασθενείς που προσβάλλονται από τον HGE έχουν μολυνθεί μετά από έκθεση σε περιοχές όπου οι κρότωνες είναι ενδημικοί, και περίπου 60% των ασθενών αναφέρουν προηγούμενο δήγμα από κρότωνα.

Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε γνωστές ενδημικές περιοχές για κροτωνογενή νοσήματα, τα υψηλά ποσοστά προκαλούν προβληματισμό εάν ληφθεί υπόψιν την αντίληψη ότι η ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση θεωρείτο μία σχετικά σπάνια νόσος. Παρατηρείται μία απόκλιση ανάμεσα στα σχετικά υψηλά ποσοστά οροθετικότητας που προκύπτουν από τις οροεπιδημιολογικές μελέτες σε δείγμα υγιούς πληθυσμού και του ποσοστού των καταγεγραμμένων κλινικών περιστατικών η οποία εξηγείται είτε από το γεγονός ότι η νόσος υποδιαγιγνώσκεται είτε διαδράμει ασυμπτωματικά.

Ασυμπτωματικοί τίτλοι αντισωμάτων, ή διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα παθογόνα πιθανόν να οδηγήσουν σε λάθος διάγνωση.

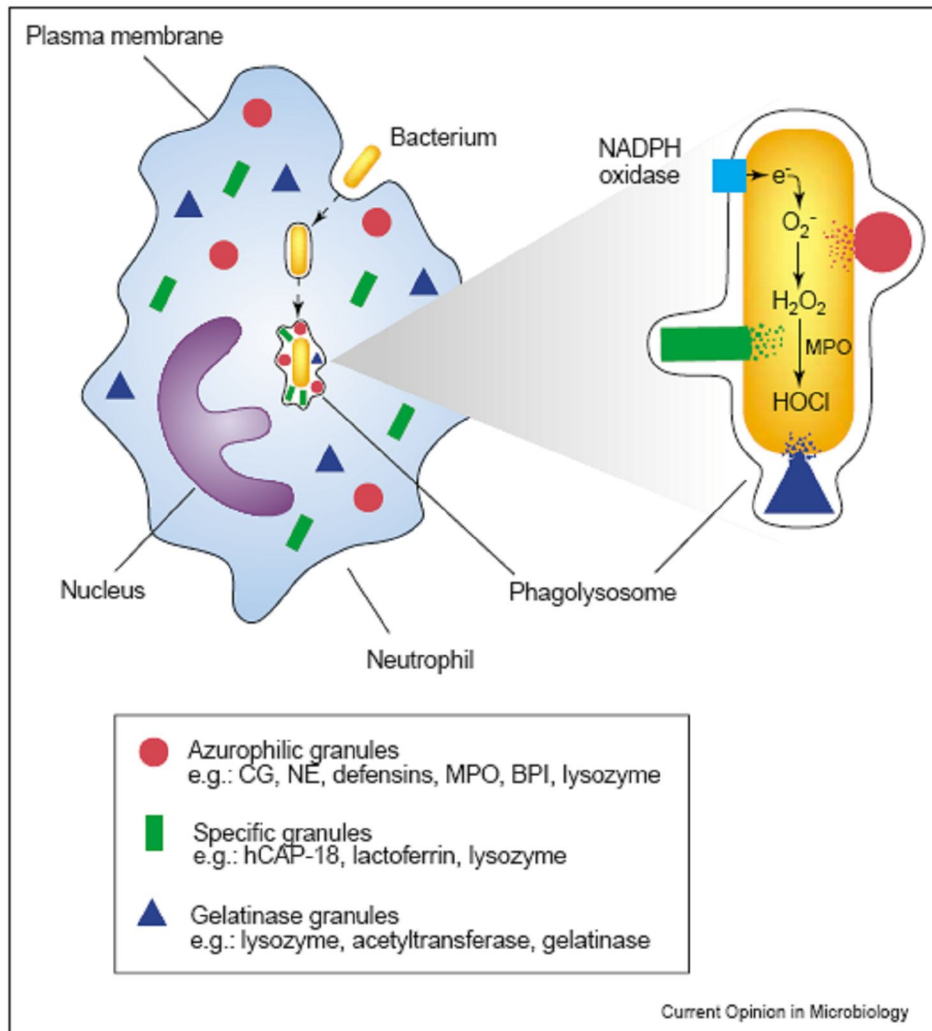
Μηχανισμοί παθογένειας του *A. phagocytophilum*

Αυτό το υποχρεωτικά ενδοκυττάριο βακτήριο είναι μοναδικό δεδομένου ότι αποικίζει τα πολυμορφοπύρρηνα λευκά αιμοσφαίρια (ουδετερόφιλα). Τα ουδετερόφιλα είναι η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην εισβολή παθογόνων. Αυτά τα βραχύβια φαγοκύτταρα (ημίσεια ζωή στο περιφερειακό αίμα 6-12 ώρες (Savill και λοιποί 1989; Akgul και λοιποί 2001)) καταπίνουν τους μικροοργανισμούς και τους καταστρέφουν με διάφορα μέσα, τα οποία περιλαμβάνουν σύντηξη του φαγοσώματος που περιέχει το βακτήριο, με τα όξινα λυσοσώματα καθώς και τη μεταφορά οξειδωτικών και πρωτεολυτικών ενώσεων στον αυλό του φαγοσώματος (Burg και Pillinger 2001). Οι ασθενείς που πάσχουν από ανεπάρκεια των ουδετεροφίλων ή δυσλειτουργία τους,

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

πάσχουν από επαναλαμβανόμενες, συχνά απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις, καταδεικνύοντας τη σημασία αυτών των κυττάρων στον έλεγχο της μόλυνσης.

Μία σειρά ερευνών έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για να αναδείξουν τη διαδικασία μέσω της οποίας το *A. phagocytophilum* μπορεί να επιζήσει μέσα στο ουδετερόφιλο (Choi και Dumler 2003). Φαίνεται ότι το βακτήριο αρχικά ενισχύει και στη συνέχεια καταστέλλει τη φυσιολογική λειτουργία της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου O_2^- στα ουδετερόφιλα έτσι ώστε να μπορεί να επιβιώσει. Παράλληλα, υποκινώντας την παραγωγή IL-8 προσελκύει νέα ουδετερόφιλα. Επιπλέον, φαίνεται να καθυστερεί την απόπτωση των φαγοκυττάρων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να καταστείλει την αντίδραση του οργανισμού σε παθογόνους οργανισμούς με συνέπεια την εμφάνιση ευκαιριακών λοιμώξεων. Το Σχήμα 1 αναπαριστά τη διαδικασία με την οποία το βακτήριο μπορεί να επιβιώσει της φαγοκυττάρωσης.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών φαγοκυττάρωσης που εξαρτώνται από το οξυγόνο. Οι μηχανισμοί χρησιμοποιούν τα περιεχόμενα 3 υπομονάδων: τα αζιροφιλικά κοκκία, τα ειδικά κοκκία και τα γελατινοειδή κοκκία που περιέχουν χαρακτηριστικές πρωτεάσες, αντιμικροβιακές πρωτεΐνες και πεπτίδια κι ένζυμα (Mayer-Scholl και λοιποί 2004).

Οι μηχανισμοί φαγοκυττάρωσης εξαρτώνται από το NADPH oxidase complex το οποίο συγκεντρώνεται στη μεμβράνη του φαγολυσωσώματος και παράγει ρίζες οξυγόνου οι οποίες ταχύτατα μετατρέπονται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το *A. phagocytophilum* έχει τη δυνατότητα να καταστέλλει το μηχανισμό αυτό επιβιώνοντας μέσα στο ουδετερόφιλο (Mayer-Scholl και λοιποί 2004).

Επιβίωση του *A. phagocytophilum*

Το *A. phagocytophilum* αποικίζει ουδετερόφιλα το οποίο εξηγείται, τουλάχιστον εν μέρει, από την έκφραση του P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) (Herron και λοιποί 2000) και των α1,3-fucosylated glycans (Goodman και λοιποί 1999) στις επιφάνειες των ουδετεροφίλων. Ο υποδοχέας PSGL-1 βρίσκεται στα κοκκιοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και σε υποσύνολα των λεμφοκυττάρων και παίζει ένα σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της λοίμωξης δεδομένου ότι διευκολύνει την πρόσδεση των λευκών αιμοσφαιρίων στο ενδοθήλιο των μολυσμένων ιστών.

Το *A. phagocytophilum* προσκολλάται στο PSGL-1 των ανθρώπινων ουδετεροφίλων και των κυττάρων HL-60 (Goodman και λοιποί 1999; Herron και λοιποί 2000). Η χρήση των PSGL-1 και των α1,3-fucosylated και α2,3-sialylated glycans από το *A. phagocytophilum* ως υποδοχείς για την προσκόλληση και είσοδο στο κύτταρο, εξηγούν όχι μόνο τον τροπισμό για τα ουδετερόφιλα, αλλά και τον τρόπο μέσω του οποίου το παθογόνο αποφεύγει τη φαγοκυττάρωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι το *A. phagocytophilum* κατορθώνει να επιβιώσει μέσα στο φαγόσωμα παρεμποδίζοντας τη σύντηξη φαγοσώματος-λυσosώματος. Η σύνδεση αυτή φυσιολογικά συμβαίνει μέσω του ενζύμου GTPase το οποίο δραστηριοποιείται στην επιφάνεια του φαγοσώματος. Το βακτήριο παρεμποδίζει τη διαδικασία αυτή (Gokce και λοιποί 1999), καθώς επίσης αλλάζει άρδην έναν ενδοκυττάριο κύκλο ο οποίος οδηγεί στην κατασκευή του φαγοσώματος. Το φαγόσωμα στο οποίο τελικά επιζεί το *A. phagocytophilum* δε μοιάζει ούτε με τα αρχικά ούτε με τα τελικά ενδοσώματα πράγμα το οποίο βοηθά το βακτήριο να αποφύγει τη διαδικασία θανάτωσης του από το ουδετερόφιλο.

Μέσα στο φαγόσωμα, το βακτήριο επεμβαίνει σε βασικούς μηχανισμούς με τους οποίους τα ουδετερόφιλα καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς. Βασικός μηχανισμός είναι η παραγωγή υπεροξειδίου (O_2^-) μέσα στο φαγόσωμα, μέσω μίας



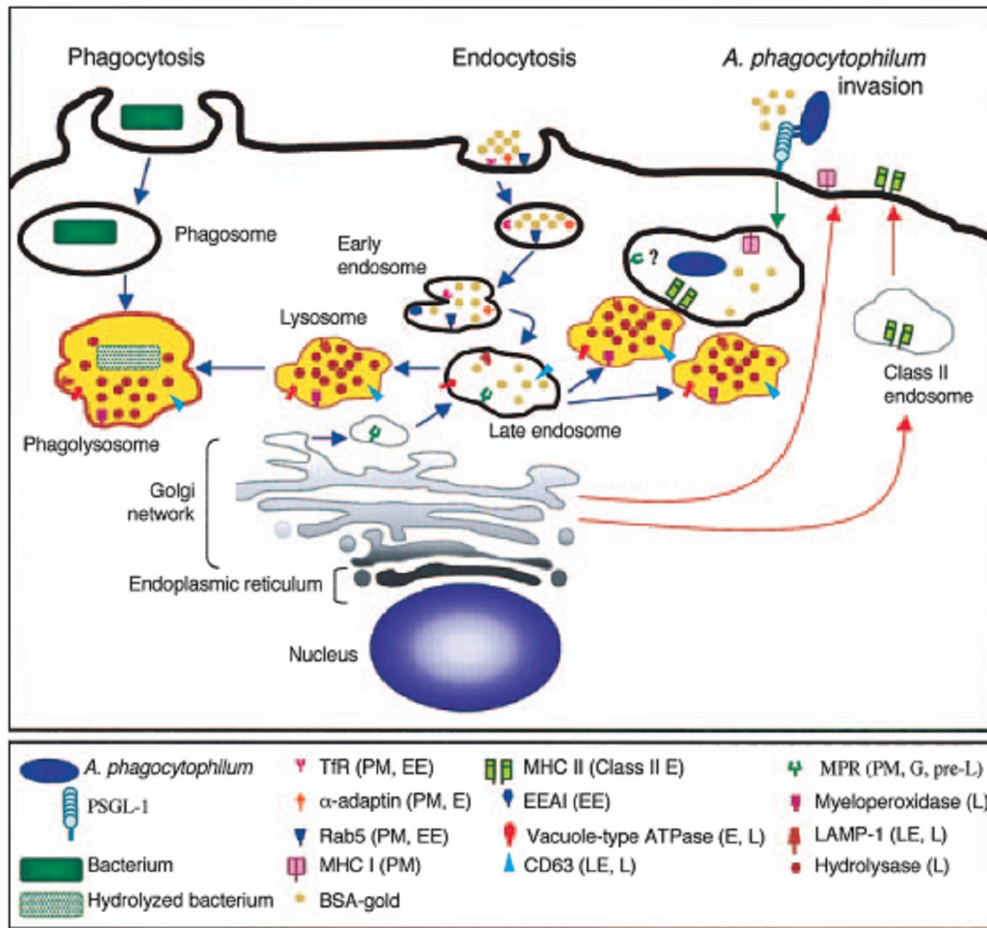
διαδικασίας ελεγχόμενης από την NADPH oxidase (Wientjes και Segal 1995; Leusen και λοιποί 1996; Babior 1999). Επιπλέον, η αλλαγή του pH που προκύπτει από την εισροή O_2^- προκαλεί απελευθέρωση πρωτεασών στο φαγόσωμα (Reeves και λοιποί 2002). Το O_2^- παράγεται μέσω μίας διαδικασίας ελεγχόμενης από την NADPH oxidase. Τα ουδετερόφιλα σε ασθενείς με αναπλάσμωση, εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού (Wang και λοιποί 2002; Carlyon και Fikrig 2003). Οι στρατηγικές που χρησιμοποιεί το *A. phagocytophilum* για την παρεμπόδιση της δράσης της οξειδάσης NADPH στοχοποιούν το ένζυμο στα στάδια της μεταγραφής, μετάφρασης κι ενεργοποίησης. Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο το *A. phagocytophilum* μπορεί ενδεχομένως να προστατευθεί από την οξειδωτική δράση είναι αδρανοποιώντας το O_2^- μέσω του ενζύμου υπεροξειδίου της δισμουτάσης (SOD), το οποίο καταλύει τη μετατροπή του O_2^- σε H_2O_2 και O_2 (Ohashi και λοιποί 2002). Άλλος μηχανισμός που σχετίζεται με την παθογένεια του *A. phagocytophilum* είναι η καθυστέρηση της απόπτωσης των ουδετεροφίλων.

Μετά την παραγωγή τους από το μυελό των οστών, τα ουδετερόφιλα έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής (6-12 ώρες) (Homburg και Roos 1996; Akgul και λοιποί 2001). Εντούτοις, η διάρκεια ζωής τους μπορεί να παραταθεί κατά τη διάρκεια μόλυνσης (Brach και λοιποί 1992; Colotta και λοιποί 1992; Moulding και λοιποί 1998). Παρά τη μικρή διάρκεια ζωής τους, τα ουδετερόφιλα είναι τα κατάλληλα κύτταρα ξενιστές για το *A. phagocytophilum* καθώς το παθογόνο αυτό παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους καθώς εμφανίζεται να καθυστερεί την απόπτωση των ουδετεροφίλων (Yoshiie και λοιποί 2000; Scaife και λοιποί 2003). Η διαδικασία φαίνεται να οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή κυτοκινών.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το *A. phagocytophilum* εκμεταλλεύεται την παραγωγή κυτοκινών.

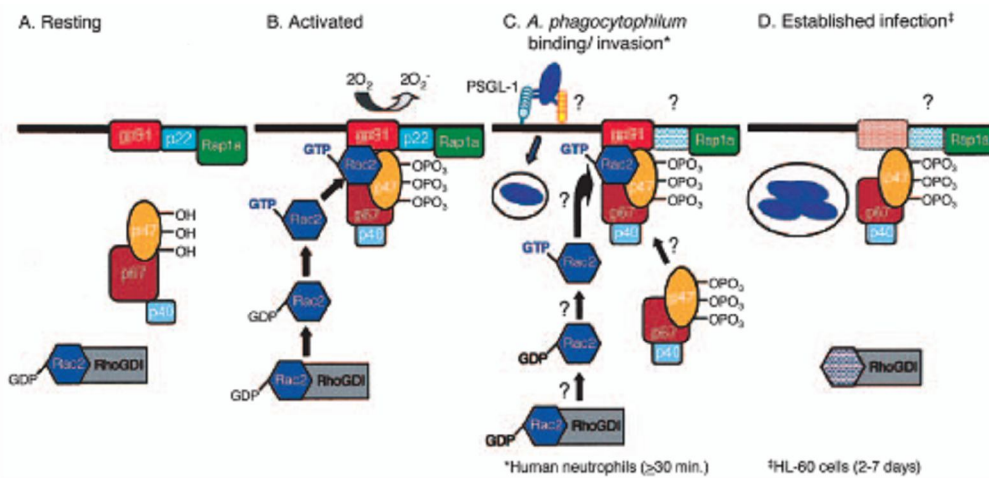
«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

Η μικροβιακή μόλυνση υποκινεί την παραγωγή κυτοκινών, με σκοπό τον έλεγχο της μόλυνσης. Οροί από ασθενείς με αναπλάσρωση καταδεικνύουν υψηλά επίπεδα στα IFN- γ IL-8, MIP -1a και -b, RANTES και IL-10 (Dumler και λοιποί 2000; Klein και λοιποί 2000; Akkoyunlu και λοιποί 2001). Ο IFN- γ προστατεύει από λοιμώξεις από υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια αλλά ταυτόχρονα αποδεικνύεται καταστρεπτικός για τα κύτταρα του ξενιστή (Fresno και λοιποί 1997). Πράγματι, στην ανθρώπινη αναπλάσρωση, η ιστοπαθολογία και η κλινική εικόνα είναι δυσμενέστερες από αυτές που θα αντιστοιχούσαν σε παρόμοιο βακτηριακό φορτίο (Walker και Dumler 1997; Dumler και Bakken 1998). Επιπλέον το *A. phagocytophilum* εκμεταλεύεται την αυξανόμενη παραγωγή του IL-8 για να διευκολύνει τη βακτηριακή διάδοση μέσω της προσέλκυσης ουδετεροφίλων στην περιοχή της μόλυνσης.



Σχήμα 2. Φυσιολογική διαδικασία φαγοκυττάρωσης, ενδοκύττωσης και παράδοσης μορίων MHC στην επιφάνεια των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης, οι μικροοργανισμοί εγκολπώνονται από τα φαγοσώματα, τα οποία ενώνονται στη συνέχεια με τα όξινα λυσοσώματα. Το φαγολυσόσωμα έχει ως αποτέλεσμα στην καταστροφή του μικροοργανισμού μέσω των υδρολασών. Κατά τη διάρκεια της ενδοκυττάρωσης, μακρομόρια (όπως το BSA-gold) λαμβάνονται και παραδίδονται αρχικά στα πρώιμα ενδοσώματα και στη συνέχεια στα ώριμα ενδοσώματα, ενώ ακολουθεί σύντηξη με λυσοσώματα και καταστροφή των μικροοργανισμών. Τα μόρια MHC I παραδίδονται από το δίκτυο Golgi στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και δε συμμετέχουν στην ενδοκυττάρωση. Τα μόρια MHC II κινητοποιούνται από το δίκτυο Golgi προς τα ενδοσώματα, τα οποία τελικά μεταφέρονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κάθε τύπος ενδοκυτταρικού διαμερίσματος μπορεί να προσδιοριστεί βάσει της παρουσίας συγκεκριμένων δεικτών (PM, plasma membrane; EE, early endosome; E, endosome; class II E, class II endosome; L, lysosome; LE, late endosome, G, Golgi apparatus; pre-L, prelysosome). Τα κόκκινα και μπλε βέλη

απεικονίζουν τις μεταφορές προς τα εμπρός και προς τα πίσω αντίστοιχα. Το πράσινο βέλος απεικονίζει την είσοδο του *A. phagocytophilum*, ο μηχανισμός της οποίας είναι ακόμη απροσδιόριστος. Το φαγόσωμα στο οποίο επιβιώνει το *A. phagocytophilum* είναι μοναδικό δεδομένου ότι παρότι δεν κατέχει τα χαρακτηριστικά είτε των πρώιμων είτε ώριμων ενδοσωμάτων, διατηρεί τα μόρια MHC I και MHC II και τη δυνατότητα να προσελκύσει μόρια BSA-gold. Αν και λυσοσώματα έχουν παρατηρηθεί γύρω από την περιφέρεια διαμερισμάτων που περιέχουν *A. phagocytophilum*, η σύντηξη με λυσοσώματα δε πραγματοποιείται. Το ερωτηματικό δίπλα στο MPR του φαγοσώματος με το *A. phagocytophilum* αναδεικνύει συγκρουόμενα στοιχεία σχετικά με τη θέση αυτού του δείκτη στο διαμέρισμα (Carlyon και Fikrig 2003).



Σχήμα 3. Αναστολή της NADPH oxidase από το *A. phagocytophilum*.

A. Σε ένα ουδετερόφιλο, τα συστατικά της NADPH oxidase είναι διασκορπισμένα.
B. Κατά την ενεργοποίηση, το Rac2 χωρίζει από τον ανασταλτικό παράγοντά του, το RhoGDI, μεταβάλλεται από τη μορφή GDP στην GTP και μεταφέρεται στην περιοχή της συναρμολόγησης της oxidase. Ταυτόχρονα, το p47phox φωσφορυλιώνεται και, μαζί με τα p67phox και p40phox, μεταφέρεται στην παραπάνω περιοχή. Η συναρμολογημένη oxidase μετατρέπει το μοριακό οξυγόνο σε O_2^- , το οποίο παράγεται εξωκυττάρια ή μέσα στον αυλό που περιέχει τον φυγοκυτταρωμένο μικροοργανισμό.



C. Τριάντα λεπτά μετά από την μόλυνση από το *A. phagocytophilum*, τα ουδετερόφιλα χάνουν την ικανότητα τους να παράγουν O₂⁻. Μερική αποσύνθεση του p22phox έχει αναφερθεί σε αυτό το χρονικό πλαίσιο. Παραμένει άγνωστο εάν το *A. phagocytophilum* αναστέλλει άλλα βήματα που προηγούνται της δράσης της NADPH oxidase. Είναι επίσης άγνωστο εάν το *A. phagocytophilum* δεσμεύει ένα μη-PSGL-1 ligand που μπορεί να συμμετέχει σε αυτήν την διαδικασία.

D. Ουδετερόφιλα ή κύτταρα HL-60 μολυσμένα με *A. phagocytophilum* καταδεικνύουν τις απώλειες αντιγράφων των rac2 και gp91phox και τις αντίστοιχες απώλειες πρωτεΐνης. Δεδομένου ότι τα Rac2 και gp91phox είναι απαραίτητα για τη δράση της NADPH oxidase, η απώλειά τους οδηγεί στην έλλειψη παραγωγής O₂⁻ από τα μολυσμένα κύτταρα (Carlyon και Fikrig 2003).

Κλινική εικόνα

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

Τα κλινικά συμπτώματα είναι μη-ειδικά. Συνηθέστερα συμπτώματα είναι ο πυρετός, η κεφαλαλγία, η μυαλγία, η ανορεξία και η ηπατοσπληνομεγαλία. Συχνά συμπτώματα είναι επίσης το ρίγος και/ή αρθραλγίες. Λιγότερο συχνά εμφανίζεται συμμετοχή του γαστροεντερικού συστήματος (ναυτία, εμετός, διάρροια), της αναπνευστικής οδού (βήχας, ARDS (σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας)), του ήπατος, ή του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σπάνια εμφανίζεται δερματικό εξάνθημα (με την περιγραφή του να ποικίλλει από ερυθριματώδη έως φλυκταινώδη εμφάνιση), αν και κάποιοι θεωρούν ότι η εμφάνιση εξανθήματος σχετίζεται με συνοδό λοίμωξη από άλλο παθογόνο. Έχει επίσης αναφερθεί περιστατικό με εικόνα άτυπης πνευμονίας (Dumler και λοιποί 2005).

Η περίοδος επώασης είναι 4-8 ημέρες (Lotric-Furlan και λοιποί 2003). Αυξημένη συχνότητα της νόσου παρατηρείται στους άνδρες. Οι ηλικίες που προσβάλλονται συνήθως είναι από 11-73 έτη (Bakken και Dumler 2006). Στο 50% των ασθενών

χρειάζεται εισαγωγή σε νοσοκομείο. Η νόσος μπορεί να έχει διάρκεια μερικές μόνο ημέρες, αλλά σε μερικούς ασθενείς, ελλείψει της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής, τα συμπτώματα δεν υποχωρούν ακόμα και για χρονικό διάστημα έως 60 ημέρες (Dumler 2005).

Σε ορισμένες μελέτες αναφέρεται ότι η βαρύτητα της νόσου σχετίζεται με την ουδετεροπενία, τη λευκοπενία, την αναιμία, την παρουσία των χαρακτηριστικών «μούρων» στα λευκοκύτταρα. Η ηλικία επηρεάζει επίσης τη σοβαρότητα της νόσου: ασθενείς για τους οποίους απαιτείται νοσηλεία να έχουν υψηλότερο μέσο όρο ηλικίας σε σχέση με τους ασθενείς που δεν χρειάζονται νοσηλεία. Συν-λοίμωξη με άλλα παθογόνα (π.χ. *B. burgdorferi*) μπορεί να προκαλέσει σοβαρότερα συμπτώματα (Nyarko και λοιποί 2006). Έχει αναφερθεί αυξημένος κίνδυνος λοίμωξης από το *A. phagocytophilum* σε ασθενείς με χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων και σε άστεγους (Brouqui και Raoult 2006).

Επιπλοκές δεν έχουν ακόμα περιγραφεί στην Ευρώπη, όπου τα συμπτώματα είναι ηπιότερα σε σχέση με τις ΗΠΑ. Οι επιπλοκές περιλαμβάνουν σηπτικό ή τοξικό σοκ, θρομβοφιλική διάθεση, άτυπη πνευμονία/ARDS, οξύ κοιλιακό σύνδρομο, ραβδομυόλυση, μυοκαρδίτιδα, οξεία νεφρική ανεπάρκεια, αιμορραγία, νευροπάθεια του βραχιόνιου πλέγματος, απομυελινωτική πολυνευροπάθεια, παράλυση κρανιακών νεύρων κι ευκαιριακές λοιμώξεις (μυκητίαση, ιογενής λοίμωξη). Έχει επίσης αναφερθεί και αιμορραγία των επινεφριδίων (Guarner και λοιποί 2008). Λοίμωξη από το *A. phagocytophilum* μπορεί να προκαλέσει μία σειρά άλλων εκδηλώσεων οι οποίες απαιτούν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος για να εκδηλωθούν, όπως είναι η αγγειίτιδα (Sweet syndrome) (Halasz και λοιποί 2005) και η νόσος του Kawasaki (Rathore και λοιποί 1993). Από την άλλη, αυτή η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε θεραπεία μίας άλλης



υποκείμενης νόσου όπως συνέβη σε έναν ασθενή με χρόνια λοίμωξη από ηπατίτιδα C ο οποίος προσβλήθηκε από το *A. phagocytophilum* (Byrnes και λοιποί 2007). Σπανιότερα, έχουν αναφερθεί η μυοκαρδίτιδα, η γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια, ηπατίτιδα, περιαγγειακή λεμφο-ιστοκυτταρική φλεγμονώδη διήθηση πολλαπλών οργάνων και σπληνική νέκρωση (Jahangir και λοιποί 1998; Bakken και Dumler 2000).

Υπολογίζεται ότι το ποσοστό θνητότητας από την ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση είναι 1%. Η χαμηλή πρόγνωση φαίνεται να σχετίζεται με την προχωρημένη ηλικία, τις συνυπάρχουσες χρόνιες ασθένειες (όπως ο διαβήτης, νόσοι κολλαγόνου, αγγειακές νόσοι, νόσοι που προκαλούν ανοσοκαταστολή), την καθυστερημένη διάγνωση ή την καθυστερημένη έναρξη αντιβιοτικής θεραπείας και τις ευκαιριακές λοιμώξεις (π.χ. *Candida*, κρυπτοκοκκική πνευμονία από τον ιό του έρπητα, ασπεργίλωση).

Male sex	53%
Fever	100%
Malaise	47%
Rigors, chills	27%
Myalgias	40%
Weakness	13%
Arthralgias	27%
Sweats	NA
Headache	93%
Anorexia	NA
Nausea	53%
Vomiting	20%
Megalies	20%
Abdominal pain	20%
Diarrhea	13%
Cough	20%
Pneumonia	13%
Confusion	NA
Seizure	NA
Vertigo	33%
Conjunctivitis	27%
Lymphadenopathy	13%
Rash	7%
Death	0%
Morulae	7%

Πίνακας 1: Κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις μετά από λοίμωξη από το *A. phagocytophilum*, σε 15 περιστατικά στην Ευρώπη (Blanco και Oteo 2002). NA: Χωρίς απάντηση.

Διάγνωση

Μη ειδικός εργαστηριακός έλεγχος

Από τη στιγμή κατά την οποία η κλινική εικόνα δε συνάδει με ειδική συμπτωματολογία, πρέπει οι εργαστηριακές εξετάσεις να είναι συγκεκριμένες κι εξειδικευμένες προς την κατεύθυνση της ανίχνευσης του παθογόνου. Τα κυριότερα εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν λευκοπενία, ουδετεροπενία, αυξημένα ηπατικά ένζυμα και χαμηλό αιματοκρίτη (Horowitz και λοιποί 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-Furlan και λοιποί 2002; Brouqui και λοιποί 2004).

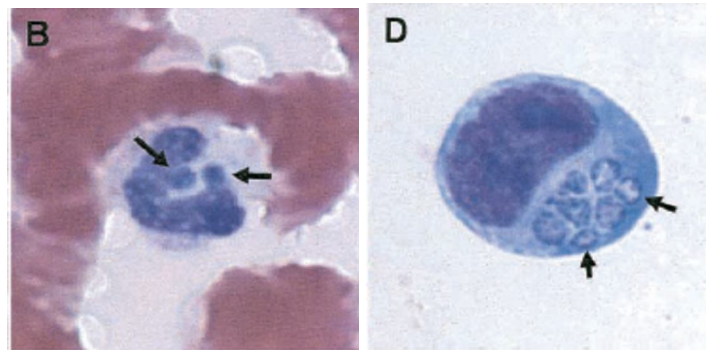
Ειδικός εργαστηριακός έλεγχος

Άμεση ανίχνευση

Μικροσκοπική ανίχνευση «μούρων»

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. Ο έλεγχος για «μούρα» είναι πολύ ειδικός αλλά με χαμηλή ευαισθησία γι αυτό άλλωστε τα «μούρα» ανιχνεύονται εξαιρετικά σπάνια μετά την πρώτη εβδομάδα της νόσου (Blanco και Oteo 2002). Τα «μούρα» μπορεί να έχουν πολλές διαφορετικές μορφές και μεγέθη, αλλά βάφονται διαφορετικά από το μολυσμένο ουδετερόφιλο. Το χρώμα με το οποίο βάφονται εξαρτάται από τη χρώση που χρησιμοποιείται, σκούρο μπλέ στην περίπτωση της χρώσης Giemsa, φούξια στην περίπτωση της χρώσης Diff-quick. Η χαρακτηριστική βασεοφιλική χρώση τους μπορεί να τα ξεχωρίσει από τα σώματα Dohle που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα. Η απουσία «μούρων» από το περιφερικό αίμα δε μπορεί να αποκλείσει μόλυνση από το *A. phagocytophilum*. Άλλωστε η ευαισθησία της μεθόδου σε σχέση με την καλλιέργεια είναι μόλις 60%.



Εικόνα 3: Μόλυνση κυττάρων με *A. phagocytophilum* B: Ουδετερόφιλα του περιφερικού αίματος. D: Κύτταρα HL-60 σε κυτταροκαλλιέργεια (Dumler και λοιποί 2007).

Γονοτυπική ανίχνευση (μέθοδος PCR)

Το ολικό αίμα μπορεί να ελεγχθεί και με μοριακές μεθόδους (PCR) για την ύπαρξη του παθογόνου (Parola και Raoult 2001; Fenollar και Raoult 2004). Διαφορετικοί εναρκτές έχουν χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν για να πολλαπλασιάσουν τμήματα

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

γονιδίων όπως το 16s rRNA, το *groEL*, γονίδια που κωδικοποιούν την 44kDa οικογένεια των αντιγονικών πρωτεϊνών, καθώς και τα γονίδια *erank-1* που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη ankyrin (Chen και λοιποί 1994; Edelman και Dumler 1996; Sumner και λοιποί 1997; Walls και λοιποί 2000). Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται σε 70-75% σε σχέση με την καλλιέργεια και τον ορολογικό έλεγχο (Bakken και λοιποί 2002) και είναι υψηλότερη στις περιπτώσεις όπου το δείγμα λαμβάνεται πριν από τη χορήγηση αντιβιοτικών.

Απομόνωση-Καλλιέργεια

Η πρώτη απομόνωση του *A. phagocytophilum* ανακοινώθηκε το 1996 (Goodman και λοιποί 1996). Η δυσκολία της μεθόδου αυτής συνίσταται στο ότι απαιτείται εργαστήριο με ασφάλεια επιπέδου 3 (Brouqui και λοιποί 2004). Χρησιμοποιείται η προμυελοκυτταρική σειρά HL-60 (ATCC CCL240). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό RPMI 1640 που περιέχει sodium pyruvate 100mM, 1% L-glutamine και 10% FBS, στους 37°C σε κλίβανο με 5% CO₂. Τρεις με επτά ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό γίνεται έλεγχος της μόλυνσης με χρώση Giemsa, Wright ή Diff-quick και παρατήρηση του «μούρου» (Goodman και λοιποί 1996). Η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνει εάν στον ασθενή δεν έχει χορηγηθεί αντιβιοτική θεραπεία πριν τη δειγματοληψία.

Έμμεση ανίχνευση

Η μέθοδος που ακολουθείται κατά κύριο λόγο είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Nicholson και λοιποί 1997). Απαιτούνται τουλάχιστον 2 δείγματα ορού, το 1^ο δείγμα κατά την έναρξη της νόσου και το 2^ο δείγμα 15-21 ημέρες μετά τον έλεγχο του πρώτου. Στην οξεία φάση της λοίμωξης αναμένονται αυξημένα IgM αντισώματα, τα



οποία υποχωρούν με την έναρξη της θεραπείας (1-2 εβδομάδες). Τα IgG αντισώματα αυξάνονται μετά τις 2 εβδομάδες. Τα IgM αντισώματα ανιχνεύονται στο 95% των περιπτώσεων των ασθενών. Τα IgG αντισώματα μπορεί να παραμείνουν ανιχνεύσιμα ακόμα και για πάνω από 6 μήνες, πάντα σε συνάρτηση με την οξύτητα της λοίμωξης (Aguero-Rosenfeld 2002). Έχουν καταγραφεί όμως και περιστατικά στα οποία ακόμη και 6 μήνες μετά τη λοίμωξη και την αποθεραπεία δεν ανιχνεύθηκαν διαγνωστικοί τίτλοι αντισωμάτων. Σε κάθε περίπτωση αυξημένη προσοχή θα πρέπει να δίδεται κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων λόγω πιθανών διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα παθογόνα, όπως τα *Coxiella burnetii*, *Rickettsia mooserii*, *Chlamydia* sp. και είδη των ερλιχιών (Blanco και Oteo 2002). Για το λόγο αυτό γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης κι εφαρμογής στη διάγνωση της τεχνικής του Western blot. Η παραπάνω μέθοδος μπορεί να λειτουργεί συμπληρωματικά με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού στη διάγνωση κι επιβεβαίωση της νόσου, χωρίς όμως ακόμα να έχει κατορθώσει να καθιερωθεί (Unver και λοιποί 2001).

Εκτός από τις παραπάνω τεχνικές, έχουν αναπτυχθεί κι ανοσοενζυμικές αντιδράσεις που στοχεύουν στην 44kDa αντιγονική πρωτεΐνη (Ravyn και λοιποί 1998). Όμως, συχνές είναι οι διασταυρούμενες αντιδράσεις, κυρίως με την *Ehrlichia chaffeensis*.

Θα πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι καμία από τις παραπάνω τεχνικές δεν είναι 100% ευαίσθητη. Στον Πίνακα 2 φαίνεται η ευαισθησία της κάθε μίας από τις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην διάγνωση του *A. phagocytophilum* σε διαφορετικές φάσεις εξέλιξης της νόσου. Από τον πίνακα φαίνεται ότι στα αρχικά στάδια της νόσου (0-14 ημέρα από την έναρξη των συμπτωμάτων) ο ορολογικός έλεγχος με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού έχει χαμηλή (0-7 ημέρα) ή μέτρια ευαισθησία (8-14 ημέρα). Στα αρχικά στάδια της νόσου η διάγνωση είναι δύσκολη, αφού αφ' ενός τα αντισώματα δεν είναι ανιχνεύσιμα κι αφ' ετέρου οι άλλες

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

διαγνωστικές μέθοδοι, όπως η μικροσκόπηση κι η καλλιέργεια εμφανίζουν μέτρια ευαισθησία. Η μέθοδος της PCR εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία στα πρώτα στάδια της νόσου (0-7 ημέρα) που όμως μειώνεται στα επόμενα στάδια (μετά την 8^η ημέρα). Μετά την 8^η ημέρα μειώνεται επίσης η πιθανότητα να ανιχνευθούν τα βακτήρια «μούρα» στα μολυσμένα ουδετερόφιλα σε επίχρισμα αίματος, ενώ χαμηλή ευαισθησία εμφανίζει κι η απομόνωση και καλλιέργεια στην κυτταρική σειρά HL-60.

Duration of illness (days)	Blood smear microscopy	HL-60 cell culture	PCR	Serologic test (IFA)
0-7	Medium	Medium	High	Low
8-14	Low	Low	Low	Medium
15-30			Low	High
31-60				High
>60				High

Πίνακας 2: Ευαισθησία των προτεινόμενων μεθόδων για την εργαστηριακή ανίχνευση του *A. phagocytophilum* (Bakken και Dumler 2006).

Ορισμός κρούσματος (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. Θετική 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. Θετική PCR χωρίς εύρεση αλληλουχίας ή
4. Παρουσία του «μούρου» σε επίχρισμα αίματος.

http://www.cdc.gov/ncepi/diss/nmdss/casedef/ehrlichiosis_2008.htm),

(CAFE' (Consensus Approach for Ehrlichiosis))

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 δήγματος από κρότωνα, θα πρέπει να χορηγείται δοξυκυκλίνη προφυλακτικά (Zeidner και λοιποί 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, αν και η καταγεγραμμένη εργαστηριακή και κλινική εμπειρία με ριφαμπικίνη είναι περιορισμένη (Horowitz και λοιποί 2001). Παρ' όλα αυτά έγκυες γυναίκες στις οποίες χορηγήθηκε ριφαμπικίνη έδειξαν καλή ανταπόκριση. Η χλωραμφενικόλη εμφανίζεται να είναι ανεργή έναντι του *A. phagocytophilum*. Σε γενικά πλαίσια, η θεραπευτική επίδραση της δοξυκυκλίνης και ριφαμπικίνης γίνεται εμφανής από την υπόχωρηση

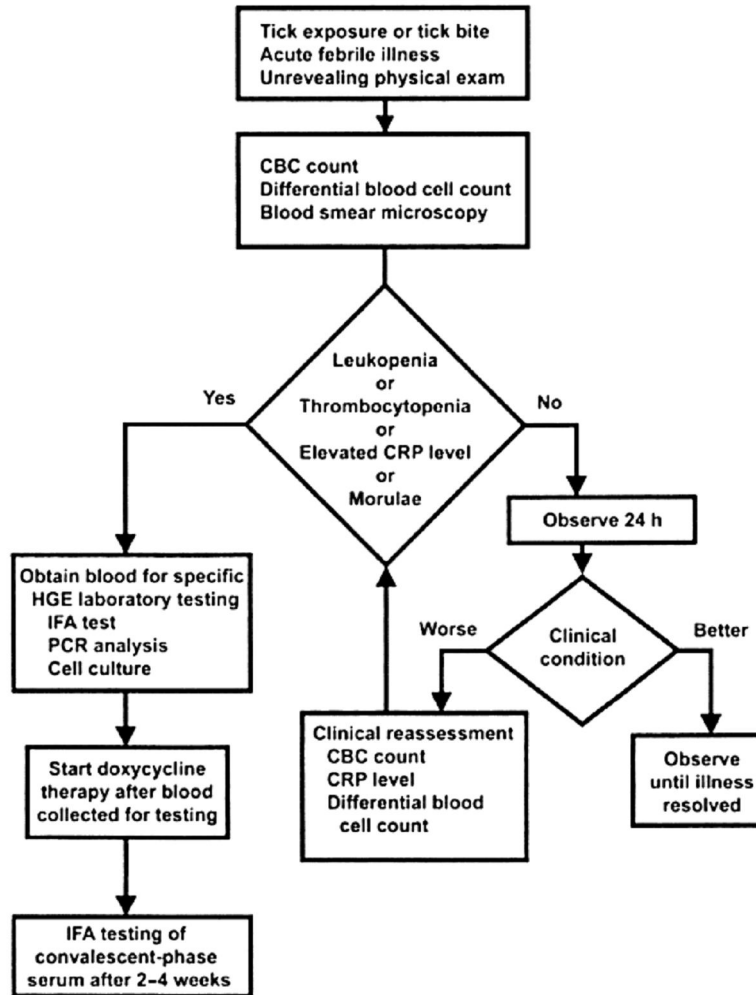
«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

του πυρετού και τη βελτίωση της κλινικής εικόνας μέσα στις επόμενες 24 ώρες. Εναλλακτική θεραπεία θα πρέπει να αναζητηθεί εάν τα συμπτώματα επιμένουν μετά από 48 ώρες θεραπείας. Σε περίπτωση μη ενδεδειγμένης θεραπευτικής αγωγής ή διάρκειας θεραπείας έχει αναφερθεί υποτροπή (Horowitz και λοιποί 1998).

Antibiotic	Dose (adults)	Dose (children)	Duration (days)
Doxycycline hyclate	100 mg i.v. ^a or p.o. ^b q 12 h	2.2 mg/kg p.o. q 12 h ^c	5–14 ^d
Tetracycline hydrochloride	500 mg p.o. q 6 h	25–50 mg/kg/day p.o. in 4 divided doses ^c	5–14 ^d
Rifampin	300 mg p.o. q 12 h	10 mg/kg p.o. q 12 h	7 days

Πίνακας 3: Προτεινόμενη θεραπεία για ενήλικες και παιδιά για λοίμωξη από το *A. phagocytophilum*. a: ενδοφλέβια χορήγηση, b: χορήγηση από του στόματος, c: μέχρι την απυρεξία και για 3 επιπλέον ημέρες, d: για 14 ημέρες σε περίπτωση υποψίας συλλοίμωξης από *B. burgdorferi*. (Bakken και Dumler 2006).

Συνέχεια των παραπάνω, έχει προταθεί ένας αλγόριθμος για την προσέγγιση ασθενών με ιστορικό δήγματος από κρότωνα και πυρετό αγνώστου αιτιολογίας.



Σχήμα 4: Εργαστηριακή, κλινική και θεραπευτική προσέγγιση ασθενούς με ιστορικό έκθεσης σε κρότωνες και πυρετό αγνώστου αιτιολογίας (Bakken και Dumler 2006).

Αντοχή στα αντιβιοτικά

Εκτός από τη δοξυκυκλίνη, η οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω θεωρείται η θεραπευτική αγωγή εκλογής, περιορισμένη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στον τομέα εναλλακτικής θεραπείας. Η εναλλακτική θεραπεία απευθύνεται κυρίως σε ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζουν παρενέργειες από τη χορήγηση δοξυκυκλίνης, σε παιδιά ή σε έγκυες γυναίκες.

Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν, έχει μελετηθεί η αντοχή του *A. phagocytophilum* σε αντιβιοτικά όπως ριφαμπικίνη (rifampicin), οφλοξασίνη (ofloxacin), λεβοφλοξασίνη (levofloxacin), τροβαφλόξασίνη (trovafloxacin), αμοξικιλίνη (amoxicillin), κεφτριαξόνη (ceftriaxone), χλωραμφενικόλη (chloramphenicol), ερυθρομικίνη (erythromycin), αζιθρομικίνη (azithromycin), κλαριθρομικίνη (clarithromycin), αμικασίνη (amikacin), γενταμικίνη (gentamicin), μοξιφλοξασίνη (moxifloxacin), σεθρομικίνη (cethromycin) και σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin). Σύμφωνα με τις έρευνες αυτές, η μοξιφλοξασίνη βρέθηκε να είναι πιο αποτελεσματική από την σιπροφλοξασίνη, αλλά ακόμα κι από τη δοξυκυκλίνη. Η υψηλή ενεργότητα της σιπροφλοξασίνης, μοξιφλοξασίνης και δοξυκυκλίνης ενάντια στο *A. phagocytophilum* πιθανότατα οφείλεται σε υψηλότερη ενδοκυττάρια συγκέντρωση των αντιβιοτικών αυτών, όσο και στην πολύ υψηλή συγκέντρωσή τους στους ιστούς. Για την τροβαφλοξασίνη ανιχνεύθηκε πολύ μικρή MIC, με την ουσία αυτή όμως να παρουσιάζει το μειονέκτημα της ηπατοτοξικότητας. Η γενταμικίνη, η αμπικιλίνη, η αζιθρομικίνη και η σεθρομικίνη δε παρουσίασαν κάποια σημαντική ενεργότητα ενάντια στο παθογόνο (Horowitz και λοιποί 2001; Hunfeld και λοιποί 2004).

Οι παρακάτω πίνακες είναι ενδεικτικοί κάποιων ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί στον τομέα της αντοχής διάφορων αντιβιοτικών ουσιών έναντι του *A. phagocytophilum*.



Antibiotic	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
Doxycycline	≤0.125	0.125–0.5
Rifampin	≤0.125	≤0.125
Ofloxacin	≤2	≤2
Levofloxacin	≤1	≤1
Trovafloxacin	≤0.032	≤0.032
Amoxicillin	≥32	≥32
Ceftriaxone	≥64	≥64
Chloramphenicol	>16	>8 ^b
Erythromycin ^a	>8	>8
Azithromycin	>8	>8
Clarithromycin	>10	>10
Amikacin	>16	>16

Πίνακας 4α: Ενεργότητα διάφορων αντιβιοτικών ουσιών έναντι του *A. phagocytophilum* σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 8 στελέχη των ΗΠΑ. MIC: Minimum inhibitory concentration, MBC: Minimum bacteriostatic concentration (Horowitz και λοιποί 2001).

Antimicrobial agent	MIC (mg/l)		
	Test range	Webster strain (human isolate, USA)	
		MIC range	Median MIC
Ampicillin	0.5–64	>64	>64
Gentamicin	0.25–512	8–16	8
Doxycycline	0.125–32	≤0.125–0.25	≤0.125
Azithromycin	0.0002–0.5	>0.5	>0.5
Cethromycin	0.0002–0.5	>0.5	>0.5
Ciprofloxacin	0.0625–4	0.125–0.25	0.125
Moxifloxacin	0.03–4	≤0.03	≤0.03

Πίνακας 4β: Ενεργότητα διάφορων αντιβιοτικών ουσιών έναντι του *A. phagocytophilum* σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 1 στέλεχος των ΗΠΑ. MIC: Minimum inhibitory concentration (Hunfeld και λοιποί 2004).

Αναπλάσωση στα ζώα

Λοίμωξη από αναπλάσματα (αναπλάσωση – anaplasmosis) μπορεί να προκαλέσει νόσο και στα ζώα εκτός από τον άνθρωπο. Η πρώτη αναφορά για αναπλάσωση στα ζώα έγινε κατά τη διάρκεια μιας πειραματικής μελέτης στη Σκωτία, όπου σε πρόβατα που βοσκούσαν σε λιβάδια που παρασιτούσαν κρότωνα, καταγράφηκε πυρετός

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

αγνώστου αιτιολογίας (Gordon W.S. 1932). Τα παθογόνα μεταβιβάζονται μέσω των κροτώνων. Τα σπονδυλωτά και οι κρότωνες με παρατεταμένη βακτηριαιμία μπορούν να θεωρηθούν ως φυσικές δεξαμενές των παθογόνων (Dumler και λοιποί 2001; Kocan και λοιποί 2003; Rikihisa 2003). Είδη αναπλασμάτων (γένος *Anaplasma*) που σχετίζονται με τη νόσο στα ζώα είναι τα *A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, *A. bovis* και *A. platys* (Hechemy και λοιποί 2006).

A. phagocytophilum

Επιδημιολογία

Το *A. phagocytophilum* έχει ανιχνευθεί με PCR σε θηλαστικά και κρότωνες σχεδόν σε όλες τις Ευρωπαϊκές χώρες (Strle 2004). Το *A. phagocytophilum* έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπους και διάφορα είδη ζώων όπως τα σκυλιά, τα πουλιά, τα μηρυκαστικά και τα τρωκτικά (Kuttler 1984; Engvall και Egenvall 2002; Kocan και λοιποί 2003; Lew και λοιποί 2003) αλλά και σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας όπως τα πρόβατα και τα βοοειδή (de la Fuente και λοιποί 2005). Σύμφωνα με μελέτες τα πρόβατα είναι φυσικοί ξενιστές του παθογόνου. Αντισώματα έναντι του παθογόνου έχουν ανιχνευθεί επίσης στους λαγούς (Groen και λοιποί 2002).

Μετάδοση

Όπως αναφέρθηκε και σε προγενέστερο κεφάλαιο, ο κρότωνας του είδους *Ixodes ricinus* φαίνεται να είναι ο κύριος μεταβιβαστής του *A. phagocytophilum* στην Ευρώπη (Strle 2004). Η ανίχνευση του *A. phagocytophilum* στον κρότωνα *I. ricinus* στην Ευρώπη ποικίλλει από περιοχή σε περιοχή αλλά και μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης του κρότωνα (Walker και λοιποί 2001). Εντούτοις, το *A. phagocytophilum* έχει ανιχνευθεί και σε άλλους κρότωνες, όπως αυτοί του είδους *Haemaphysalis*



punctata (MacLeod 1962), *I. persulcatus* (Alekseen και λοιποί 1998), *I. trianguliceps* (Ogden και λοιποί 1998) και *Rhipicephalus sanguineus* (Alberti και λοιποί 2005), όμως η επιδημιολογική σημασία και ο ρόλος των παραπάνω ειδών κροτώνων στη μετάδοση δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα αποδημητικά πουλιά μπορούν να καταστούν σημαντικά στη διασπορά μολυσμένων κροτώνων του είδους *I. ricinus* στην Ευρώπη (Alekseen και λοιποί 2001; Bjoersdorff και λοιποί 2001; de la Fuente και λοιποί 2005; Skoracki και λοιποί 2006).

Κλινική εικόνα λοίμωξης

Οι χαρακτηριστικότερες κλινικές κι εργαστηριακές εκδηλώσεις στα μολυσμένα θηλαστικά είναι υψηλός πυρετός, ανορεξία, μειωμένη παραγωγή γάλακτος, αποβολές, μειωμένη γονιμότητα ουδετεροπενία και θρομβοκυτοπενία (Woldehiwet και λοιποί 1993; Engvall και Engvall 2002). Στα πρόβατα μπορεί αποτελέσει το υπόβαθρο για άλλες μολύνσεις, όπως ο σταφυλόκοκκος. Η παρουσία διαφορετικών στελεχών του παθογόνου ακόμη και στο ίδιο κοπάδι μπορεί να προκαλέσει διαφορές και στις κλινικές εκδηλώσεις. Λοίμωξη από το παθογόνο σπάνια μπορεί να αποβεί μοιραία εκτός κι αν υπάρξει επιπλοκή από άλλες λοιμώξεις (Stuen και λοιποί 2002).

Εργαστηριακή διάγνωση

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του *A. phagocytophilum* σε κατοικίδια ζώα είναι η PCR (Stuen και λοιποί 2003; Matsumoto και λοιποί 2006) και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Rajput και λοιποί 2005; Amusatogui και λοιποί 2006).

A. platys, A. bovis, A. ovis, A. marginale, A. centrale

Επιδημιολογία

Η παρουσία των παραπάνω ειδών αναπλασμάτων έχει καταγραφεί σε διάφορες χώρες της Ευρώπης, μεταξύ άλλων και στη νότια Ευρώπη (Torina και λοιποί 2008) (Kocan και λοιποί 2004; de la Fuente και λοιποί 2006; Naranjo και λοιποί 2006). Τα παθογόνα έχουν καταγραφεί τόσο σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας (αίγες, πρόβατα, βοοειδή) (Zaugg και λοιποί 1996), όσο και σε άγρια θηλαστικά (ελάφι, αντιλόπη) (Kuttler 1984).

Μετάδοση

Τα παραπάνω παθογόνα μεταβιβάζονται κατά κύριο λόγο με τους κρότωνες του είδους *R. bursa* (de la Fuente και λοιποί 2007) αλλά πιθανότατα και με άλλα είδη κροτώνων όπως ο *Dermacentor andersoni*, κατά κύριο λόγο στην Αμερική (Friedhoff 1997).

Κλινική εικόνα λοίμωξης

Το *A. platys* μολύνει τα αιμοπετάλια του σκυλιού. Προκαλεί τη μολυσματική κυνοειδή κυκλική θρομβοκυτοπενία (ICCT). Η νόσος είναι συχνά ασυμπτωματική αλλά τα θρομβοκυτοπενικά ζώα μπορεί αιμοραγήσουν κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης ή από ένα κτύπημα (Waner και λοιποί 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 (Rikihisa 2006), αλλά έχει εντοπιστεί και σε άλλα μηρυκαστικά επίσης (Naranjo και λοιποί 2006). Η νόσος χαρακτηρίζεται από πυρετό, αναιμία, ίκτερο, απώλεια όρεξης, επιδείνωση της φυσικής κατάστασης του ζώου και δυσφορία στην αναπνοή (Razmi



και λοιποί 2006). Το *A. centrale* προσβάλλει μόνο τα βοοειδή και αν και τα συμπτώματα είναι ηπιότερα, μπορεί να προκαλέσει έναν μέτριο βαθμό αναιμίας.

Η πρόβεια αναπλάσμωση σχετίζεται συνηθέστερα με την αιμολυτική αναιμία στις αίγες. Παρ' όλα αυτά το *A. onis* μπορεί να μολύνει τα πρόβατα ειδικά όταν τα ζώα βρίσκονται σε συνθήκες στρες ή υπό την επίδραση άλλων παραγόντων (Splitter και λοιποί 1956; Friedhoff 1997). Το *A. onis* προσβάλλει τα ερυθρά αιμοσφαίρια των προβάτων, των αιγών και των άγριων μηρυκαστικών (de la Fuente και λοιποί 2006), σε αντίθεση με το *A. phagocytophilum* που προσβάλλει τα ουδετερόφιλα (Herron και λοιποί 2005).

Εργαστηριακή διάγνωση

Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εργαστηριακή διάγνωση να είναι η PCR (Petrovec και λοιποί 2003; Naranjo και λοιποί 2006) και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Torina και λοιποί 2007).

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

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 της νόσου και δεν έχει μελετηθεί ο κύκλος μετάδοσης.

Στην Ελλάδα η νόσος δεν καταγράφεται και υποδιαγιγνώσκεται. Ο αιτιολογικός παράγοντας δεν έχει απομονωθεί ούτε από τον άνθρωπο, ούτε από φυσικά υπόδοχα, ξενιστές ή μεταβιβαστές. Όσον αφορά στην Κύπρο, δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου στοιχεία.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της έρευνας ήταν η μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των αναπλασμάτων στην Ελλάδα και την Κύπρο, στον άνθρωπο, σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας, σε άγρια θηλαστικά, καθώς κι η αναζήτηση πιθανών μεταβιβαστών των αναπλασμάτων. Παρόμοιες μελέτες δεν είχαν πραγματοποιηθεί στην Ελλάδα και την Κύπρο στο παρελθόν.

Ειδικότερα οι στόχοι της έρευνας ήταν:

A) Ο προσδιορισμός του οροεπιπολασμού των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε υγιή ανθρώπινο πληθυσμό (αιμοδότες στην Κρήτη, γενικός πληθυσμός στην Κύπρο) και ο εντοπισμός ενδημικών περιοχών.

B) Ο προσδιορισμός του οροεπιπολασμού των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας.

Γ) Η γονοτυπική ανίχνευση αναπλασμάτων (*Anaplasma sp.*) σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές, με στόχο τον προσδιορισμό του βαθμού διασποράς των αναπλασμάτων στους φυσικούς ξενιστές και τη μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας μετάδοσης.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβάστες και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

Δ) Η συστηματική αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών και η μελέτη της κλινικής εκδήλωσης της νόσου.

Ε) Η ταυτοποίηση και σύγκριση των αναπλάσμάτων που ανιχνεύτηκαν σε όλους τους παράγοντες της αλυσίδας μετάδοσης (πιθανά υπόδοχα, μεταβιβάστες, ασθενείς).

Η μελέτη διεξήχθη σε 2 φάσεις: Η πρώτη φάση της μελέτης (φάση Α) περιελάμβανε την οροεπιδημιολογική μελέτη σε αντιπροσωπευτικό δείγμα ανθρώπινου υγιούς πληθυσμού καθώς επίσης και σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας, για το *A. phagocytophilum*. Περιελάμβανε επίσης την αναζήτηση και γονοτυπική ανίχνευση *Anaplasma sp.* σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβάστες.

Στη Β φάση της μελέτης, μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της Α' φάσης, εντοπίστηκαν περιοχές με υψηλό επιπολασμό για το *A. phagocytophilum* και/ή για *Anaplasma sp.*, στις οποίες έγινε αναλυτική επιδημιολογική διερεύνηση, ενεργητική και συστηματική αναζήτηση κλινικών μορφών αναπλάσματος, αλλά και διερεύνηση του επιδημιολογικού κύκλου μετάδοσης.

Πιο αναλυτικά:

Φάση Α

1) Οροεπιδημιολογική μελέτη.

Α) Προσδιορισμός του οροεπιπολασμού των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε υγιή ανθρώπινο πληθυσμό.

Στην Κρήτη, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τυχαίο δείγμα αιμοδοτών καθώς και σε τυχαίο δείγμα γενικού πληθυσμού σε ενδημική περιοχή (Ανώγεια). Στην Κύπρο, η μελέτη περιελάμβανε 2 διαφορετικές ομάδες υγιούς πληθυσμού: την ομάδα υψηλού και την ομάδα του χαμηλού κινδύνου έκθεσης στο παθογόνο.



B) Προσδιορισμός του οροεπιπολασμού των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας.

Ο ορολογικός έλεγχος έγινε σε τυχαίο αντιπροσωπευτικό δείγμα ορών από παραγωγικά ζώα (αιγοπρόβατα και βοοειδή), που προσδιορίστηκε με stratified random sampling method.

2) Γονοτυπική ανίχνευση αναπλάσμάτων (*Anaplasma sp.*) σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές.

Αναζητήθηκαν πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές κι έγινε προσπάθεια γι ανίχνευση στελεχών των αναπλάσμάτων σε αυτά, στην Ελλάδα και την Κύπρο, με στόχο τον προσδιορισμό του βαθμού μόλυνσης και διασποράς των αναπλάσμάτων σε αυτά και την αποσαφήνιση του ρόλου τους στην επιδημιολογική αλυσίδα.

Φάση Β

1) Εντοπισμός περιοχών υψηλού κινδύνου.

Ενεργή αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών.

Σκοπός της μελέτης ήταν η καταγραφή κλινικών περιστατικών και η μελέτη της κλινικής εκδήλωσης της νόσου, καθώς κι η ανίχνευση *Anaplasma spp.* σε ασθενείς. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε καταγραφή της κλινικής συμπτωματολογίας, επιδημιολογικών και εργαστηριακών δεδομένων σε ασθενείς στους οποίους επιβεβαιώθηκε νόσος από ανάπλασμα. Όπου ήταν δυνατόν, πραγματοποιήθηκε επίσης διερεύνηση του περιβάλλοντος του ασθενούς με σκοπό την καταγραφή και μελέτη πιθανών φυσικών ξενιστών.

2) Μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση.

Μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας μετάδοσης.

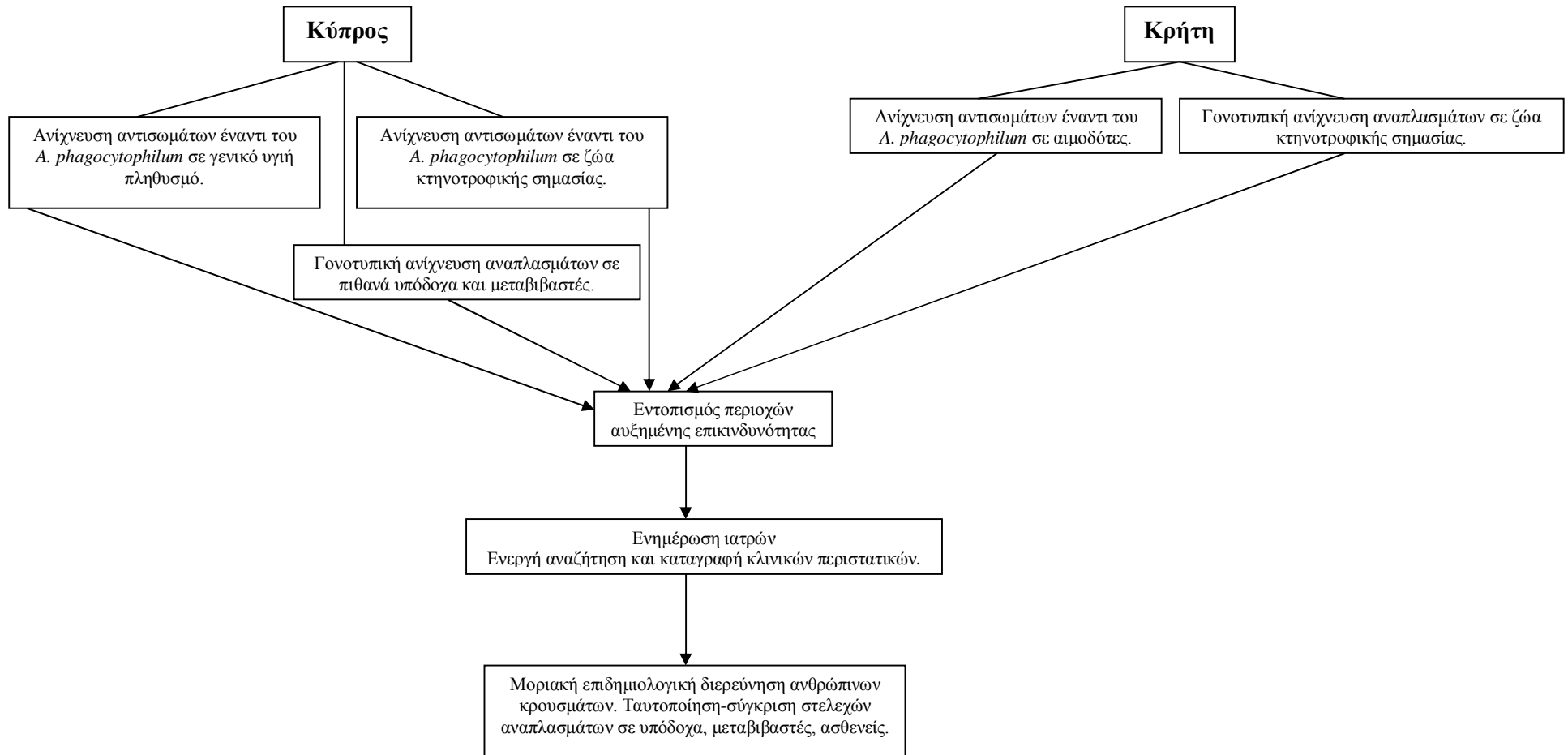
Πραγματοποιήθηκε, επίσης, μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση των κρουσμάτων αναπλάσματος που καταγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Ταυτοποιήθηκαν και

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

χαρακτηρίστηκαν στελέχη που ανιχνεύθηκαν σε όλους τους παράγοντες της αλυσίδας μετάδοσης (πιθανά υπόδοχα, μεταβιβαστές, ασθενείς). Συγκρίθηκαν τα στελέχη με τη χρήση μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης.

Η μελέτη ολοκληρώθηκε 3 χρόνια μετά την έναρξη της στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ιωάννη Τσελέντη.

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



Διάγραμμα 1: Πορεία ενεργειών που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Περιοχές μελέτης.

Κρήτη

Η Κρήτη είναι το μεγαλύτερο νησί στην Ελλάδα και το δεύτερο μεγαλύτερο (μετά από την Κύπρο) της ανατολικής Μεσογείου. Βρίσκεται στο νότιο άκρο του Αιγαίου πελάγους, περίπου 160 χλμ νότια της ελληνικής ηπειρωτικής χώρας και καλύπτει μια περιοχή 8.336 km². Το νησί έχει μήκος 260 χλμ και ποικίλλει σε πλάτος από 60 χλμ (που μετριούνται από το ακρωτήριο Δίον στο ακρωτήριο Λίθινο), σε 12 χλμ μόνο στον ισθμό της Ιεράπετρας στην ανατολική Κρήτη. Η ακτογραμμή της παρουσιάζει βαθύ γεωγραφικό διαμελισμό, δίνοντας στο νησί πάνω από 1.000 χλμ ακτών.

Ο πληθυσμός της νήσου είναι 601.131 άνθρωποι το μεγαλύτερο μέρος του οποίου είναι συγκεντρωμένο στις 5 μεγάλες πόλεις: Ηράκλειο (142.112), Χανιά (55.838), Ρέθυμνο (32.694), Άγιος Νικόλαος (17.000), Σητεία (8.900).

Το νησί είναι εξαιρετικά ορεινό και μία υψηλή σειρά βουνών το διασχίζει από τη δυσμάς προς ανατολάς, διαμορφωμένη από τρεις οροσειρές: τα Λευκά Όρη (2.452 μ), την οροσειρά της Ίδης (Ψηλορείτης 2.456 μ) και το όρος Δίκη (2.148 μ).

Η Κρήτη ανήκει στη Μεσογειακή κλιματολογική ζώνη που δίνει τον κύριο χαρακτήρα στο κλίμα της έτσι ώστε να χαρακτηρίζεται ως εύκρατο. Η ατμόσφαιρα μπορεί να είναι αρκετά υγρή, ανάλογα με την εγγύτητα στη θάλασσα. Ο χειμώνας είναι αρκετά ήπιος και υγρός με αρκετές βροχοπτώσεις – περισσότερες στα δυτικά τμήματα της Κρήτης. Η χιονόπτωση είναι σπάνια στις πεδινές εκτάσεις, αλλά αρκετά συχνή στις ορεινές περιοχές. Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, οι μέσες θερμοκρασίες είναι 25 με 30 βαθμοί Κελσίου, οπωσδήποτε χαμηλότερες από αυτές της ηπειρωτικής Ελλάδας. Στη νότια ακτή, συμπεριλαμβανομένης της πεδιάδας της Μεσσαράς και των Αστερούσιων ορέων, απολαμβάνουν σε σχέση με την υπόλοιπη



μεγαλόνησο περισσότερες ηλιόλουστες ημέρες και πιο υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού.

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης επιλέχθηκε μία περιοχή (Ανώγεια) στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες από ζώα και ανθρώπινο πληθυσμό. Ο λόγος για τον οποίο επελέγη η συγκεκριμένη περιοχή είναι ότι στο παρελθόν πραγματοποιήθηκαν μελέτες οι οποίες ανέδειξαν την ύπαρξη κροτωνογενών νοσημάτων στην ευρύτερη περιοχή (Antoniou και λοιποί 1995; Antonίου και λοιποί 2002). Τα Ανώγεια απέχουν 52 χλμ. από το Ρέθυμνο και 36 χλμ. από το Ηράκλειο και βρίσκονται σε υψόμετρο 700-790 μ. στη ράχη ενός υψώματος που λέγεται Αρμί (Κορυφογραμμή). Το κλίμα είναι ιδιαίτερα ψυχρό, λόγω υψομέτρου, με πολλά χιόνια το χειμώνα και χαμηλές θερμοκρασίες καλοκαίρι. Τα Ανώγεια Μυλοποτάμου Ρεθύμνου αποτελούν την πρωτεύουσα του ομώνυμου δήμου με 2454 κατοίκους. Κύρια ενασχόληση των κατοίκων των Ανωγείων είναι η κτηνοτροφία, αφού διατηρούν πάνω από 80.000 αιγοπρόβατα.

(Πηγές: Ελληνική Στατιστική υπηρεσία <http://www.statistics.gr/>, Βικιπαίδεια <http://el.wikipedia.org/wiki/Κρήτη>, Γαλακτοκομικός Συνεταιρισμός και Κτηνοτροφικός Σύλλογος Ανωγείων).

Κύπρος

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 χλμ βόρεια της Αιγύπτου, 105 χλμ δυτικά της Συρίας, 380 χλμ ανατολικά του νησιού της Ρόδου και 800 χλμ ανατολικά από την ηπειρωτική Ελλάδα. Το γεγονός αυτό της προσδίδει όχι μόνο τεράστια γεωπολιτικοστρατηγική σημασία, αλλά και σημαντικότερο ρόλο στην επιδημιολογία πολλών ζωο-ανθρωπονόσων.

Είναι το τρίτο σε έκταση νησί της Μεσογείου, μετά τη Σικελία και τη Σαρδηνία καλύπτοντας μία έκταση 9.251 τετραγωνικών χιλιομέτρων.

Ο πληθυσμός της Κύπρου στο τέλος του 2004, σύμφωνα με στοιχεία της Στατιστικής Υπηρεσίας, ήταν περίπου 651.100 με το μεγαλύτερο μέρος του να είναι συγκεντρωμένο στα μεγάλα αστικά κέντρα, ήτοι στις 4 μεγάλες πόλεις: στην πρωτεύουσα Λευκωσία με πληθυσμό περίπου 219.200, στη Λεμεσό, με πληθυσμό περίπου 172.200, στη Λάρνακα με πληθυσμό περίπου 77.000 και στην Πάφο με πληθυσμό γύρω στις 51.300. Επιπλέον των μόνιμων Ελληνοκυπρίων κατοίκων, στο νησί κατοικούν περίπου και 98-100.000 ξένοι υπήκοοι.

Η επιφάνεια του νησιού καλύπτεται από δύο οροσειρές, ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλεται η πεδιάδα της Μεσαορίας. Η μεγαλύτερη οροσειρά, αυτή του Τροόδου 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 1.951 μέτρα. Η δεύτερη οροσειρά, αυτή του Πενταδακτύλου εκτείνεται κατά μήκος των βόρειων ακτών και έχει μέγιστο υψόμετρο τα 1.024 μέτρα. Ολόκληρο σχεδόν το νησί περιβάλλεται από παράκτιες κοιλάδες, και το 46,8% του εδάφους είναι καλλιεργήσιμο.

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 Σεπτεμβρίου και ο βροχερός αλλά ήπιος χειμώνας, από τα μέσα του Νοέμβρη 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 υψηλότερη βροχόπτωση αφορά στις ορεινές περιοχές και η χαμηλότερη στις πεδιάδες.



Τον Ιούλιο και τον Αύγουστο οι μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες κυμαίνονται από 29°C στην κεντρική πεδιάδα έως 22°C στην κορυφή του Τροόδου, ενώ οι μέσες μέγιστες θερμοκρασίες τους μήνες αυτούς είναι 36°C και 27°C, αντίστοιχα.

Τον Ιανουάριο οι μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες είναι 10°C στην κεντρική πεδιάδα και 3°C στην κορυφή του Τροόδου, με μέσες ελάχιστες τιμές τους 5 και 0 βαθμούς Κελσίου αντίστοιχα.

(Πηγές: Στατιστική υπηρεσία Κύπρου: http://www.pio.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf/publications_gr/, Κτηνιατρικές υπηρεσίες Κύπρου <http://www.moa.gov.cy/moa/vs/vs.nsf/>, Βικιπαίδεια <http://el.wikipedia.org/wiki/Κύπρος>).

Οροεπιδημιολογική μελέτη.

Προσδιορισμός του οροεπιπολασμού των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε ανθρώπινο πληθυσμό.

Το υλικό αποτέλεσαν δείγματα ορών από υγιή πληθυσμό (αιμοδοτές) και από πληθυσμό υψηλού κινδύνου (κτηνοτρόφοι, άνθρωποι με συχνή επαφή με ζώα ή/και κρότωνες). Οι οροί των αιμοδοτών συλλέχθηκαν από τις μονάδες αιμοδοσίας των νοσοκομείων και επιλέγησαν τυχαία. Οι οροί του πληθυσμού υψηλού κινδύνου συλλέχθηκαν από την περιοχή των Ανωγείων, όσον αφορά στην Κρήτη, και από περιοχές της Κύπρου όπου καταγράφηκαν ανθρώπινα περιστατικά ή/και ανιχνεύθηκε το υπό μελέτη παθογόνο. Κάθε ορός συνοδευόταν από δελτίο με δημογραφικά στοιχεία του δότη (ηλικία, φύλο, επάγγελμα, διαμονή). Όσον αφορά στην Κρήτη, η δειγματοληψία οδήγησε στη συλλογή 496 δειγμάτων αίματος από υγιείς αιμοδοτές και 119 δειγμάτων από υγιή πληθυσμό περιοχής υψηλού κινδύνου. Όσον αφορά στην Κύπρο, συλλέχθηκαν 375 δείγματα ορών με βάση τα οποία προσδιορίστηκε ο

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

επιπολασμός της νόσου κι εντοπίστηκαν περιοχές υψηλού κινδύνου (με τη βοήθεια Προγράμματος Μηχανογραφημένης Χαρτογράφησης).

Οροεπιδημιολογική μελέτη σε δείγματα αιμοδοτών στην Κρήτη.

Δείγματα ορών από 496 υγιείς αιμοδότες συλλέχθηκαν τυχαία ανά ηλικία και φύλο από τις τράπεζες αίματος των 5 μεγαλύτερων νοσοκομείων (Γενικό Νοσοκομείο Ρεθύμνης, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου, Γενικό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου, Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Χανίων) των 4 νομαρχιακών διαμερισμάτων (Ρέθυμνο, Ηράκλειο, Λασιθί, Χανιά), κατά την περίοδο Αύγουστος 2005 – Αύγουστος 2006. Όλοι οι αιμοδότες ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης, προτού να σταλούν τα δείγματά τους στο εργαστήριό μας. Η συλλογή δειγμάτων συνοδεύθηκε από ένα ερωτηματολόγιο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1) όπου καταγράφηκαν η περιοχή της κατοικίας, η ηλικία, το φύλο και η απασχόληση για κάθε έναν από τους αιμοδότες που συμμετείχαν. Οι περιοχές της κατοικίας ταξινομήθηκαν ως αστικές, ημι-αστικές ή αγροτικές. Σχετικά με την περιοχή των Ανωγείων, πραγματοποιήθηκε οροεπιδημιολογική μελέτη σε δείγματα από κατόχους ζώων (πληθυσμός υψηλού κινδύνου) και σε γενικό υγιή πληθυσμό. Οι οροί αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι τον έλεγχο τους.

Οροεπιδημιολογική μελέτη στον ανθρώπινο πληθυσμό στην Κύπρο.

Κατά τη χρονική περίοδο Ιούνιος – Σεπτέμβριος 2006, διεξήχθη δειγματοληψία σε υγιή ανθρώπινο πληθυσμό με στόχο, να εκτιμηθεί ο επιπολασμός του παθογόνου. Οι συμμετέχοντες ήταν είτε αγρότες, είτε εργαζόμενοι στα αγροκτήματα, είτε είχαν κάποιας μορφής επαφή με ζώα κτηνοτροφικής σημασίας ή/και κρότωνα, ψείρες, γάτες, αρουραίους, περιστέρια, κότες. Επίσης, λήφθηκαν δείγματα από πληθυσμό ο



οποίος δεν δήλωσε καμία σχέση με αγροτοκτηνοτροφικές εργασίες και ο οποίος κατοικούσε σε περιοχές χαμηλού κινδύνου (low-risk regions), αλλά και από πληθυσμό από περιοχές στις οποίες καταγράφηκαν ανθρώπινα κρούσματα αναπλάσμων, προσδιορίστηκαν περιοχές υψηλού κινδύνου (high-risk regions).

Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για το σκοπό της έρευνας, και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους πριν από την δειγματοληψία.

Για καθένα δείγμα συμπληρώθηκε επιδημιολογικό δελτίο με στοιχεία όπως ημερομηνία, φύλο, ηλικία, τόπος κύριας και δευτερεύουσας κατοικίας, κύρια και δευτερεύουσα εργασία, επαφή με ζώα και κρότωνες, ατομικό ιστορικό ή κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε τυποποιημένο επιδημιολογικό δελτίο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2).

Όλα τα δείγματα φυλλάσσονταν στους -20°C μέχρι να ελεγχθούν.

Κατά την συλλογή αλλά και κατά την επεξεργασία των δειγμάτων από τον πληθυσμό της Κρήτης και της Κύπρου τηρήθηκαν οι κανόνες της ιατρικής δεοντολογίας και ό,τι είναι σύμφωνο με την νομοθεσία περί προσωπικών δεδομένων.

Οροεπιδημιολογική μελέτη σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας στην Κρήτη και την Κύπρο.

Ειδικότερα για την Κύπρο, 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.

Σύμφωνα με τις πληροφορίες που μας παρήχαν οι κτηνιατρικές υπηρεσίες Κύπρου, ο πληθυσμός ζώων κτηνοτροφικής σημασίας στην Κύπρο προσδιορίστηκε σε περίπου 272.000 αίγες, 220.000 πρόβατα και 62.000 βοοειδή. Με βάση το στατιστικό πρόγραμμα ανάλυσης SPSS v.16, το μέγεθος του τυχαίου ζωικού δείγματος

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας ένα κατ' εκτίμηση ποσοστό 5% (\pm 3% για τα πρόβατα και τις αίγες και \pm 4% για τα βοοειδή).

Η επιλογή των εκτροφών καθώς και των ζώων από τα οποία θα λαμβάνετο δείγμα, έγινε τυχαία, τόσο στην περίπτωση της Κύπρου, όσο και των Ανωγείων.

Το όργανο G.P.S χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δειγματοληψία για την καταγραφή του στίγματος του κάθε δείγματος.

Όσον αφορά την Κύπρο, πραγματοποιήθηκε συλλογή τυχαίου αντιπροσωπευτικού δείγματος ορών από αιγοπρόβατα και βοοειδή κατά την περίοδο Μάρτιος 2005 – Μάρτιος 2006, από 38 διαφορετικές περιοχές των 5 νομαρχιακών διαμερισμάτων της Κύπρου (Λευκωσία, Λεμεσός, Αμμόχωστος, Λάρνακα, Πάφος).

Όσον αφορά στην περιοχή των Ανωγείων, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από 244 πρόβατα από κτηνοτροφικές μονάδες της ευρύτερης περιοχής με τη βοήθεια εξειδικευμένων κτηνιάτρων. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε την περίοδο Μάρτιος 2008 – Μάιος 2008.

Από κάθε εκτροφή εξετάζονταν 10 ζώα, ανεξαρτήτως του είδους για τυχόν παρασιτισμό τους από κρότνες. Ένα τυποποιημένο ερωτηματολόγιο – επιδημιολογικό δελτίο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3), με ειδικό κωδικό για κάθε ζώο, συμπληρωνόταν για κάθε δείγμα (ορός, γενική αίματος) που λαμβανόταν, και περιείχε στοιχεία σχετικά με την ηλικία, την υγεία (προσβολή από κάποιο παθογόνο, αγκαξία, άμβλωση), την ημερομηνία συλλογής, την κτηνοτροφική μονάδα, την περιοχή, το είδος του ζώου, τυχόν μετακινήσεις του, τον παρασιτισμό από κρότνες ή άλλα εκτοπαράσιτα, τον αριθμό των κροτώνων που αφαιρέθηκαν, το είδος τους και το στάδιο του βιολογικού τους κύκλου. Η συλλογή των κροτώνων, όπου αυτοί υπήρχαν, γινόταν όπως περιγράφεται παρακάτω. Για την περιοχή των Ανωγείων, από κάθε φάρμα πραγματοποιούνταν και δειγματοληψία ποσότητας γάλακτος. Το γάλα



φυλασσόταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια (50ml falcons) στους -20°C μέχρι την επεξεργασία τους.

Γονοτυπική ανίχνευση αναπλασμάτων (*Anaplasma sp.*) σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές.

Δειγματοληψία από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας και σκυλιά.

Η δειγματοληψία στα ζώα κτηνοτροφικής σημασίας περιγράφεται σε προγενέστερο υποκεφάλαιο. Όσον αφορά στα σκυλιά, 139 δείγματα (ολικό αίμα) ελήφθησαν από σκυλιά τα οποία βρίσκονταν σε κάθε φάρμα από την οποία πραγματοποιούνταν δειγματοληψία από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας. Τα σκυλιά εξετάζονταν για την ύπαρξη κροτώνων οι οποίοι συλλέγονταν όπως περιγράφεται παρακάτω.

Δειγματοληψία από άγρια ζώα – πουλιά.

Δείγματα από αγρινά συλλέχθηκαν κι εξετάστηκαν από το Νοέμβριο του 2002 μέχρι το Δεκέμβριο του 2006, προερχόμενα κυρίως από την περιοχή του δάσους της Πάφου. Επίσης, δείγματα από άγρια ζώα (αλεπού, λαγός) συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Κύπρου κατά την περίοδο Ιανουάριος 2004 – Δεκέμβριος 2005. Μικρή ποσότητα αίματος συλλέχθηκε από καθένα από αυτά επάνω σε ειδικά για την περίπτωση φίλτρα (Whatman® paper) τα οποία αποθηκεύτηκαν έπειτα σε αποστειρωμένα σωληνάρια (eppendorfs) στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Καταγράφηκαν στοιχεία για το φύλο, την ηλικία και τη θέση που βρέθηκε ή/και που παγιδεύτηκε το κάθε ζώο. Εκτοπαράσιτα τα οποία εντοπίζονταν στα ζώα αφαιρούνταν και αποθηκεύονταν όπως περιγράφεται παρακάτω.

Στα πουλιά (ενδημικά, επιδημικά, μεταναστευτικά), πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία κατά την περίοδο Οκτώβριος 2004 – Οκτώβριος 2006, στην Κύπρο.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

Στοιχεία σχετικά με το κάθε πουλί καταγράφονταν και ποσότητα αίματος συλλέχθηκε και αποθηκεύθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα πουλιά στη συνέχεια αφήνονταν ελεύθερα. Τα πουλιά ελέγχονταν για την παρουσία εκτοπαρασίτων τα οποία αφαιρούνταν και αποθηκεύονταν όπως περιγράφεται παρακάτω.

Ενεργή αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών αναπλάσμωσης.

Αναζητήθηκαν περιστατικά ασθενών με εμπύρετο και δήγμα κρότωνα ή έκθεση σε κρότωνα (ή άλλο εκτοπαράσιτο).

Τα δείγματα ορών που έρχονταν για έλεγχο στο εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας και Ζωονόσων της Ιατρικής Σχολής με το παραπάνω επιδημιολογικό ιστορικό και ήταν αρνητικά για αντισώματα έναντι των παθογόνων *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii* και *Rickettsia mooserii* ελέγχονταν για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum*. Στα περιστατικά που ανιχνεύθηκαν έγινε προσπάθεια για καταγραφή αναλυτικού ιστορικού.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης ελέχθηκαν 164 δείγματα. Πιθανή αναπλάσμωση θεωρήθηκε η καταγραφή παρατεταμένου εμπυρέτου με/ή χωρίς εξάνθημα, ιστορικό επαφής με κρότωνα ή ζώο κτηνοτροφικής ή μη σημασίας με συνοδή έντονη κεφαλαλγία. Επιπρόσθετα συμπτώματα τα οποία ελήφθησαν υπ' όψιν ήταν μυαλγίες κι αύξηση των τίτλων ηπατικών ενζύμων.

Από όλους τους ασθενείς ελήφθησαν τουλάχιστον 2 δείγματα αίματος, ένα για ορολογικό έλεγχο κι ένα ολικό αίμα για καλλιέργεια και PCR. Κατεβλήθη προσπάθεια τα δείγματα να ληφθούν πριν τη χορήγηση αντιβιοτικής θεραπείας. Σε περίπτωση θετικού δείγματος, 2 νέα δείγματα αποστέλλονταν με διαφορά 21 ημερών από τα πρώτα, για επανέλεγχο.



Η περίοδος μελέτης των δειγμάτων ήταν Φεβρουάριος 2006 – Φεβρουάριος 2009. Καταγράφηκαν συνολικά 12 περιστατικά αναπλάσμωσης, σε Κρήτη και Κύπρο. Ο εργαστηριακός έλεγχος των δειγμάτων αίματος που συλλέχθηκαν (ορός, ολικό αίμα) για αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* και για την ανίχνευση DNA του *A. phagocytophilum* και των αναπλασμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παρακάτω. Τα περιστατικά περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**.

Εργαστηριακός έλεγχος δειγμάτων.

Ο έλεγχος των ορών για την ανίχνευση IgG και IgM αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του DNA από τα δείγματα ολικού αίματος, τα φίλτρα καθώς και τα αρθρόποδα εφαρμόστηκε με τη χρήση του DNA blood mini kit της QIAGEN (Hilden, Germany). Πριν την εξαγωγή του DNA τα φίλτρα κόπηκαν σε μικρότερα κομμάτια ενώ τα αρθρόποδα ταυτοποιήθηκαν μέχρι το είδος και τεμαχίστηκαν. Εφαρμόστηκε η μέθοδος της PCR για τη ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων. Στα δείγματα ολικού αίματος των ζώων κτηνοτροφικής σημασίας και των ασθενών εφαρμόστηκε και sequencing analysis για τον χαρακτηρισμό των παθογόνων.

Επεξεργασία δειγμάτων ορού, ολικού αίματος, γάλακτος.

Τα ληφθέντα δείγματα (ορός, ολικό αίμα) φυγοκεντρώνταν στις 5000 g για 10 λεπτά στους 4°C, οι οροί μεταφερόταν σε σωληνάρια τα οποία φυλλάσσονταν στους -20°C, ενώ από τις γενικές αίματος αφαιρούνταν σε στείρες συνθήκες οι λευκοκυτταρικές στοιβάδες (buffy coat), οι οποίες τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια τα

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

οποία φυλλάσσονταν στους -80°C . Όσον αφορά στα δείγματα γάλακτος, πραγματοποιούνταν φυγοκέντρωση στις 21000 g για μισή ώρα και στη συνέχεια αφαιρούνταν η υπερκείμενη κρέμα και το ίζημα τα οποία μεταφέρονταν σε νέα αποστειρωμένα σωληνάρια (15ml falcons). Τα συλλεχθέντα δείγματα ξεπλένονταν με 2 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις ίδιες στροφές μέσα σε διάλυμα PBS. Το τελικό ίζημα μεταφερόταν σε νέα αποστειρωμένα σωληνάρια (1.5 ml eppendorfs) και φυλασσόταν στους -20°C για την εξαγωγή του DNA (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5).

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 επωάζονταν με 490μλ PBS + 10μλ FBS στους 4°C για ένα βράδυ. Το FBS χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή των αναστολεων της PCR οι οποίοι υπάρχουν στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Την επόμενη ημέρα τα σωληνάρια φυγοκεντρούνταν στις 2800 g στροφές για 5 λεπτά για να διαχωριστεί το αίμα από το φίλτρο. Διακόσια (200) μλ 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 .

Επεξεργασία εκτοπαρασίτων.

Πριν από την επεξεργασία, τα εκτοπάρσιτα 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, απολυμόνονταν χρησιμοποιώντας αιθανόλη 70% και τεμαχίζονταν σε μικρά κομμάτια μέσα σε διάλυμα 200μλ PBS. Ποσότητα από τα



τεμαχισμένα εκτοπαράσιτα χρησιμοποιήθηκε για να φτιαχθούν pools (200μλ τελικός όγκος) βάση του είδους, γένους και ζώου-ξενιστή προέλευσης. Τα pools αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την εξαγωγή DNA. Τα σωληνάκια με την υπόλοιπη ποσότητα εκτοπαράσιτων αποθηκεύτηκαν στους -80°C για τυχόν απομόνωση του παθογόνου.

Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA).

Ανθρώπινα δείγματα.

Όλοι οι ανθρώπινοι οροί ελέγχθηκαν με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας διαγνωστικό kit του εμπορίου (Focus diagnostics, ΗΠΑ) για την ανίχνευση IgM και IgG αντισωμάτων ενάντια στο βακτηρίδιο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα θεωρήθηκαν θετικά με cut-off $\geq 1/40$ και $\geq 1/128$ για τα IgM και IgG αντισώματα, αντίστοιχα.

Όλες οι αντικειμονόφορες πλάκες εξετάζονταν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM 4000B, Γερμανία) σε μεγένθυση x 100. Θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν βακτήρια με χρώμα πράσινου μήλου (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4).

Δείγματα ζώων κτηνοτροφικής σημασίας.

Οι οροί ελέγχθηκαν για την ανίχνευση IgG αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* με τη χρήση του kit της VMRD (Veterinary Medical Research & Development, ΗΠΑ). Συγκεκριμένα, σε αντικειμενοφόρους πλάκες με μονιμοποιημένο το αντιγόνο του συγκεκριμένου παθογόνου μικροοργανισμού προστέθηκε ο ορός του ζώου σε διαφορετικές αραιώσεις και μαρκαρίστηκε με φθορίζον-σημασμένο αντι-αντίσωμα (fluorescein-labeled anti-conjugate). Ανάλογα με είδος του ζώου στο οποίο αντιστοιχούσε το εξεταζόμενο δείγμα,

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβάστες και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

χρησιμοποιούνταν το αντίστοιχο IgG αντι-αντίσωμα (αντι-βοοειδές Sc-2796, αντι-πρόβατο Sc-2779, αντι-αίγα Sc-2777, Santa Cruz biotechnologies, Καλιφόρνια, ΗΠΑ). Με αρχική αραίωση του εξεταστέου ορού 1/50 (με PBS) και διαδοχικές αραιώσεις υποδιπλασιασμού, θετικό θεωρήθηκε το δείγμα με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/100$.

Όλες οι αντικειμονόφορες πλάκες «διαβάζονταν» σε μικροσκόπιο φθορισμού όπως περιγράφεται παραπάνω (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4).

Εκχύλιση DNA.

Από τα 12 δείγματα ασθενών, τα 244 δείγματα από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας στην Κρήτη, τα 1017 δείγματα από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας στην Κύπρο, τα 139 δείγματα από σκυλιά, τα 910 δείγματα από φίλτρα, τα 50 δείγματα γάλακτος και τα 3079 εκτοπαράσιτα έγινε εκχύλιση DNA προκειμένου να γίνει γονοτυπική ανίχνευση *Anaplasma* sp. Όλες οι εξαγωγές του DNA πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN, Hilden, Γερμανία) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5). 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.

Γενωμικός πολλαπλασιασμός (PCR).

Για την ανίχνευση του DNA των αναπλάσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές **EHR16SD** και **EHR16SR**. Για την περαιτέρω διερεύνηση των ειδών των αναπλάσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές **HS1**, **HS6**, **MSP4AP5**, **MSP4AP3**,



HSPB, HSPC, MSP43 και MSP45. Οι αλληλουχίες των εναρκτών καθώς και τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν συνοψίζονται στον Πίνακα 5.

Όνομα εναρκτή	Στέλεχος	Γονίδιο	Αλληλουχία εναρκτή	Αναφορά
EHR16SD	Anaplasma species	<i>16s rRNA</i>	GGT-ACC-YAC-AGA-AGA-AGT-CC	(Brouqui και λοιποί 2001)
EHR16SR	Anaplasma species	<i>16s rRNA</i>	TAG-CAC-TCA-TCG-TTT-ACA-GC	(Brouqui και λοιποί 2001)
HS1	<i>A. phag.</i>	<i>groel</i>	TGGGCTGGTA(A/C)TGAAAT	(Sumner και λοιποί 1997)
HS6	<i>A. phag.</i>	<i>groel</i>	CCICCIGGIACIA(C/T)ACCTTC	(Sumner και λοιποί 1997)
MSP4AP5	<i>A. phag.</i>	<i>msp4</i>	ATGAATTACAGAGAATTGCTTAGG	(de la Fuente και λοιποί 2007)
MSP4AP3	<i>A. phag.</i>	<i>msp4</i>	TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG	(de la Fuente και λοιποί 2007)
HSPB	Anaplasma species	<i>groel</i>	TTA(GA)AA(GATC)CC(GATC)CCCAT(GATC)CC(GATC)CCCATGCC	(Lew και λοιποί 2003)
HSPC	Anaplasma species	<i>groel</i>	AAATGGCGAATGTTGT(TA)GT(TC)AC	(Lew και λοιποί 2003)
MSP43	Anaplasma species	<i>msp4</i>	CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC	(de la Fuente και λοιποί 2007)
MSP45	Anaplasma species	<i>msp4</i>	GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC	(de la Fuente και λοιποί 2007)

Πίνακας 5: Εναρκτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση DNA των αναπλασμάτων στα υπό μελέτη δείγματα. *A. phag:* *A. phagocytophilum*.

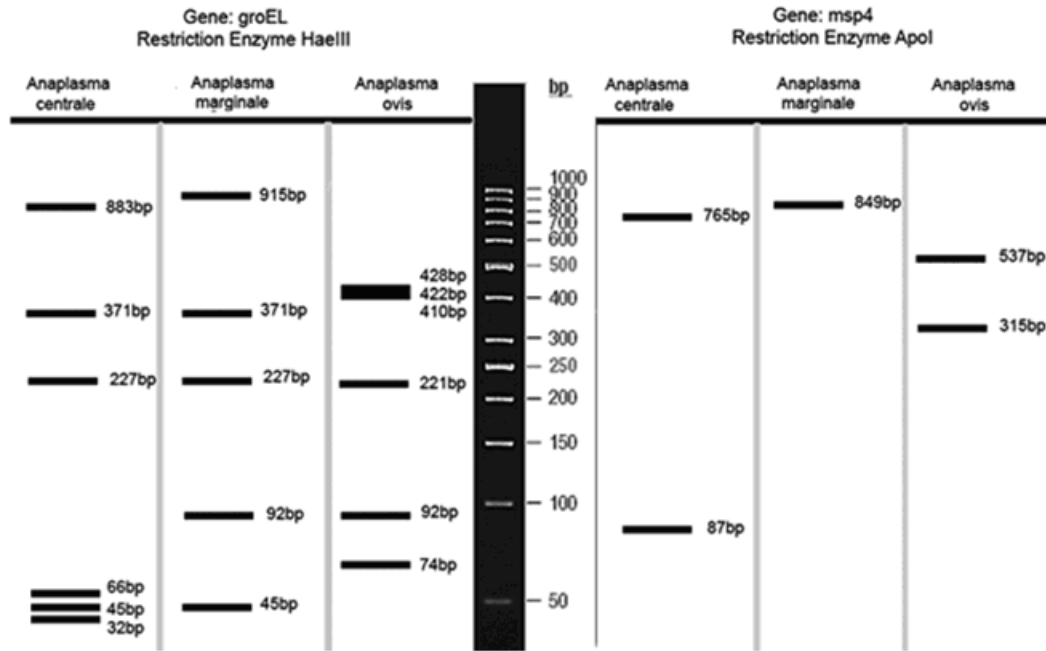
Όλοι οι γονιδιακοί πολλαπλασιασμοί πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο PCR cyler DNA MyCycler (BIORAD). Απεσταγμένο νερό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

σε κάθε ομάδα δειγμάτων που εξετάστηκε. Το πρώτο θετικό δείγμα που ανιχνεύθηκε χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως θετικός μάρτυρας για την αντίστοιχη αντίδραση.

Πρόβλεψη RFLP αποτυπωμάτων (patterns) με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής – RFLP ανάλυση.

Για την καλύτερη μελέτη της ποικιλομορφίας των γονιδίων *groEL* και *msp4* των αναπλασμάτων (*A. onis*, *A. centrale*, *A. marginale*), χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία βιοπληροφορικής για να προβλεφθεί ένα πιθανό αποτύπωμα (pattern) με τη μέθοδο της RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), το οποίο θα ήταν συγκεκριμένο για κάθε είδος αναπλάσματος. Οι ακολουθίες του DNA για τα γονίδια *groEL* και *msp4* των αναπλασμάτων ανακτήθηκαν από τη δημόσια βάση δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Η ποικιλομορφία των ακολουθιών των γονιδίων εξετάστηκε μεταξύ των διαφορετικών ειδών (και για τα δύο γονίδια *groEL* και *msp4*) και για τα διαφορετικά γένη των ίδιων ειδών (μόνο για *msp4*), χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα MegAlign Lasergene v.7.1 (DNASTAR, Μάντισον, ΗΠΑ). Με βάση τον βαθμό συντήρησης των ακολουθιών των γονιδίων έγινε έρευνα για περιοριστικά ένζυμα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε κάθε γονίδιο και θα μπορούσαν να παρέχουν ένα διακριτικό αποτύπωμα με τη μέθοδο της RFLP. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε, το Seqbuilder του προγράμματος Lasergene v.7.1 (DNASTAR, Μάντισον, ΗΠΑ). Τα περιοριστικά ένζυμα που επιλέχθηκαν τελικά ήταν τα *HaeIII* (Fermentas) και *ApoI* (New England Biolabs) για τα γονίδια *groEL* και *msp4* αντίστοιχα.



Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση του προσδοκώμενου προφίλ με βάση το κόψιμο των γονιδίων *groEL* και *msp4* με τα περιοριστικά ένζυμα *HaeIII* και *ApoI*, αντίστοιχα. Ο 50bp Ladder (GeneRuler™, Fermentas, Καναδάς) απεικονίζεται σαν οδηγός.

Το πρωτόκολλο της ενζυμικής πέψης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο: 16μl νερό (nuclease-free water), 2μl 10X διάλυμα (διάλυμα R για το ένζυμο *HaeIII* και NEBuffer 3 για το), 1μl του καθαρισμένου προϊόντος της PCR (η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω) και 0.5μl του αντίστοιχου ενζύμου. Ακολουθούσε ήπια ανάδευση κι επώαση για 1 ώρα στους 37°C για το ένζυμο *HaeIII* και για 1 ώρα στους 50°C για το ένζυμο *ApoI*.

Ηλεκτροφόρηση.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 1-2%, αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος των βάσεων που αναμενόταν. Τα DNA ladders που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο 100 bp MassRuler™ Express DNA Ladder (Fermentas, Καναδάς) για προϊόντα μέχρι 1000 βάσεις και ο 1 kb DNA Ladder

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

(Promega, ΗΠΑ) για προϊόντα από 1000 βάσεις και πάνω, σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Ακολουθούσε επώαση 30-90 λεπτών σε χρώση GelStar® (Lonza, ΗΠΑ) προετοιμασμένη σε διάλυμα 1 x TAE, παρόμοιο με αυτό που χρησιμοποιούνταν για την προετοιμασία του πηκτώματος. Το DNA απεικονιζόταν κάτω από υπέρυθρο (UV) φως (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6).

Αλληλουχοποίηση (sequencing analysis).

Τα θετικά προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το kit QIAquick PCR product purification kit (QIAGEN, Hilden, Γερμανία) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η αλληλουχοποίηση πραγματοποιήθηκε με μηχάνημα sequencer CEQ 8000 Beckman Coulter (Bioanalytica, Γενότυπος, Αθήνα). Οι ακολουθίες που εξήχθησαν συγκρίθηκαν με τη βάση δεδομένων της βιβλιοθήκης GenBank/EMBL (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Επεξεργασία κι ανάλυση αποτελεσμάτων.

Φυλογενετική ανάλυση.

Τα εξαχθέντα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση χρησιμοποιώντας τα προγράμματα ClustalW2 (multisequence alignment program), nucleotide BLAST, Chromas v.1.49 και Lasergene v.7.1 (DNASTAR, Μάντισον, ΗΠΑ).

Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA v.4.0.2. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Neighbor-Joining (NJ) με διόρθωση παραμέτρων Kimura 2. Για να αξιολογηθεί η ακρίβεια και η σταθερότητα των κατασκευασμένων δέντρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης bootstrap 1000 επαναλήψεων.

**Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.**

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS v.16. Χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά πακέτα ANOVA και το Student's t-test και υπολογίστηκαν τιμές για το χ^2 καθώς και τα ποσοστά σημαντικότητας (p values). Ως ποσοστό σημαντικότητας ορίστηκε $p \leq 0.05$.

Γεωγραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων.

Το γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών (GIS) ArcView v.3.2 χρησιμοποιήθηκε για την χαρτογράφηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τον έλεγχο των αιμοδοτών για την περιοχή της Κρήτης. Το γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών (GIS) Arcview v.9.1 χρησιμοποιήθηκε για να χαρτογραφήσει τα εξαχθέντα αποτελέσματα από τον έλεγχο των ζώων και του ανθρώπινου πληθυσμού της περιοχής των Ανωγείων. Το πρόγραμμα MapInfo v.9.0 χρησιμοποιήθηκε για να χαρτογραφήσει τα εξαχθέντα αποτελέσματα από τον έλεγχο ζώων και του ανθρώπινου πληθυσμού για την περιοχή της Κύπρου. Το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS3 extended χρησιμοποιήθηκε για την τελική επεξεργασία των γραφημάτων και των χαρτών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οροεπιδημιολογική μελέτη.

Οροεπιδημιολογική μελέτη σε δείγματα αιμοδοτών στην Κρήτη.

Με βάση τον πληθυσμό του κάθε νομού το δείγμα ήταν αντιπροσωπευτικό: νομός Ηρακλείου 189 δείγματα, νομός Ρεθύμνης 87 δείγματα, νομός Χανίων 18 δείγματα, νομός Λασηθίου 92 δείγματα. Από το σύνολο των συμμετεχόντων, οι 309 ήταν άνδρες (62,3%) και οι 184 γυναίκες (37,1%). Διακρίθηκαν 6 ηλικιακές ομάδες: <21 (29 δείγματα), 21-30 (127 δείγματα), 31-40 (159 δείγματα), 41-50 (129 δείγματα), 51-60 (38 δείγματα) και >60 (6 δείγματα).

Με βάση το επιδημιολογικό δελτίο που συνόδευε το κάθε δείγμα ορού, έγινε κατάταξη των ορών σε 2 κατηγορίες, αυτούς που προέρχονταν από άτομα τα οποία με βάση το επάγγελμα τους ή την απασχόληση τους δεν είχαν καθόλου επαφή ή μικρή πιθανότητα επαφής με ζώα, και αυτούς που προέρχονταν από άτομα των οποίων το επάγγελμα συνεπάγεται μεγάλη πιθανότητα επαφής με ζώα. Στην 1^η κατηγορία κατατάχθηκαν οι υπάλληλοι γραφείων και όλοι οι διανοητικά εργαζόμενοι, ενώ στην 2^η κατηγορία οι αγρότες, κτηνοτρόφοι, οι εργαζόμενοι στην επεξεργασία και μεταποίηση κρέατος και γενικά οι χειρωνακτικά εργαζόμενοι ιδίως σε εξωτερικούς χώρους ή την ύπαιθρο. Στην 1^η κατηγορία κατατάχθηκαν 364 οροί ενώ στην 2^η 84 οροί. Επιπλέον, τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ανάλογα με τον τόπο διαμονής των αιμοδοτών και διακρίθηκαν σε 3 ομάδες: αστική (253 δείγματα), ημιαστική (100 δείγματα) και αγροτοκτηνοτροφική (96 δείγματα).

Θα πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι οι κατατάξεις με βάση το επάγγελμα και τον τόπο διαμονής δεν μπορεί να είναι απόλυτες, διότι λόγω της ιδιαιτερότητας της κουλτούρας του πληθυσμού της Κρήτης, ένας υπάλληλος γραφείου στην πόλη το απόγευμα μπορεί να δουλεύει στα χωράφια του στο χωριό.



Οι οροί θεωρούνταν ορολογικά θετικοί με cut-off points 1/40 και 1/128 για τα IgM and IgG αντισώματα, αντίστοιχα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων εμφάνισε μία οροθετικότητα της τάξης του 42% με cut-off 1/64. Διπλασιάζοντας το cut-off στο 1/128, η οροθετικότητα (seroprevalence) μειώθηκε στο 21.4%. Από τα εξετασθέντα δείγματα το 8.4% ήταν θετικό και για τα IgG και για τα IgM αντισώματα, ενώ το 32.7% των δειγμάτων ήταν θετικό είτε για τα IgG είτε για τα IgM αντισώματα χρησιμοποιώντας τα cut-offs 1/128 και 1/40, αντίστοιχα.

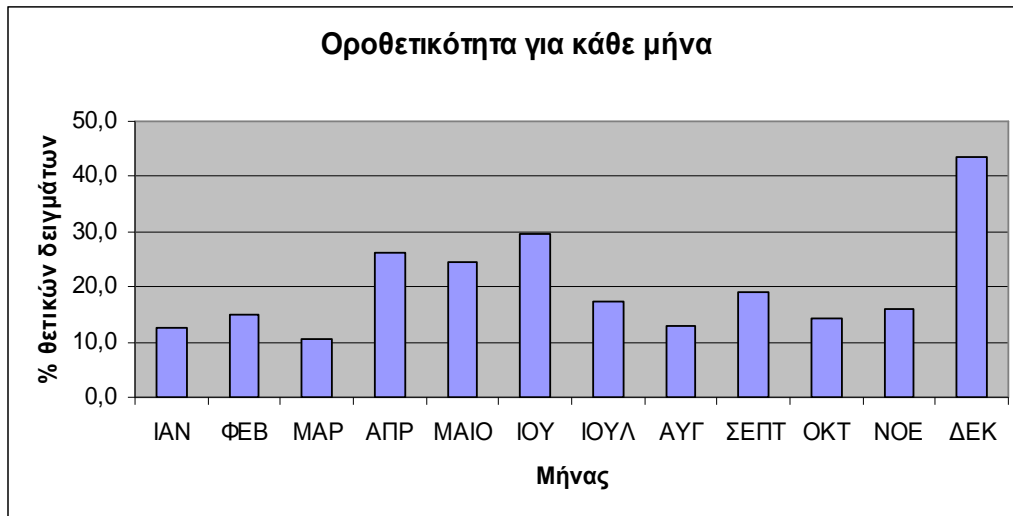
Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπολογίστηκε ($p=0.08$) με βάση το διαχωρισμό σε αστικές, ημι-αστικές και αγροτικές περιοχές.

Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπολογίστηκε ($p=0.53$) με βάση το επάγγελμα, όπως και κατά τη σύγκριση των δύο φύλων ($p=0.52$) (Chochlakis και λοιποί 2008).

Η κατανομή των IgG αντισωμάτων για τις διαφορετικές ομάδες ηλικίας, το φύλο, για τις 3 διαφορετικές περιοχές κατοικίας (αστική, ημι-αστική και αγροτική) και τη φύση του επαγγέλματος (επαγγέλματα με χαμηλή και υψηλή πιθανότητα επαφής με το βακτηρίδιο) περιγράφονται στον Πίνακα 6. Αντιστοίχως, τα Γραφήματα 1-6 αποικονίζουν την κατανομή των G αντισωμάτων στους αιμοδότες. Στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7 απεικονίζεται σε χάρτη η διασπορά των αντισωμάτων των αιμοδοτών, στην Κρήτη.

	Ομάδες								Αριθμός θετικών δειγμάτων (%)
Τίτλοι (1)		0 (%)	64 (%)	128 (%)	256 (%)	512 (%)	1024 (%)	2048 (%)	
A	<21	20 (69)	5 (17)	0	2 (7)	1 (3)	0	1 (3)	4 (13.8)
	21-30	77 (61)	22 (17)	16 (13)	1 (0.8)	8 (6)	3 (2)	0	28 (22)
	31-40	86 (54)	35 (22)	22 (14)	10 (6)	3 (2)	3 (2)	0	38 (23.9)
	41-50	76 (59)	27 (21)	13 (10)	9 (7)	2 (1.5)	2 (1.5)	0	26 (20.2)
	51-60	22 (58)	9 (24)	2 (5)	2 (5)	2 (5)	0	1 (2.5)	7 (18.4)
	>60	3 (50)	3 (50)	0	0	0	0	0	0
B	Χαμηλή πιθανότητα επαφής	209 (57)	80 (22)	38 (10)	21 (6)	9 (2.5)	4 (1)	3 (0.8)	75 (20.6)
	Υψηλή πιθανότητα επαφής	54 (64)	12 (14)	8 (9.5)	2 (2.4)	4 (5)	4 (5)	0	18 (21.4)
Γ	Αστικά	150 (59)	52 (20)	25 (10)	11 (4)	7 (3)	6 (2)	2 (0.8)	51 (20.2)
	Ημιαστικά	62 (62)	22 (22)	12 (12)	4 (4)	0	0	0	16 (16)
	Αγροτικά	52 (54)	19 (20)	11 (11)	6 (6)	6 (6)	2 (2)	0	25 (26)
Δ	Άνδρες	184 (60)	58 (19)	31 (10)	14 (4.5)	14 (4.5)	6 (2)	2 (0.6)	67 (21.7)
	Γυναίκες	101 (55)	44 (24)	22 (12)	11 (6)	2 (1)	3 (1.6)	1 (0.4)	39 (21.2)
E	Σύνολο	286 (58)	102 (20.5)	53 (11)	25 (5)	16 (3)	9 (2)	3 (0.5)	106 (21.4)

Πίνακας 6: Οροθετικότητα για τις ομάδες του πληθυσμού των αιμοδοτών της Κρήτης (cut-off: IgG \geq 1/128). A: Ηλικιακές ομάδες, B: Ομάδες διαχωρισμένες βάσει επαγγέλματος, Γ: Ομάδες διαχωρισμένες βάσει τόπου κατοικίας, Δ: Φύλο, E: Σύνολο ελεγχθέντων δειγμάτων.

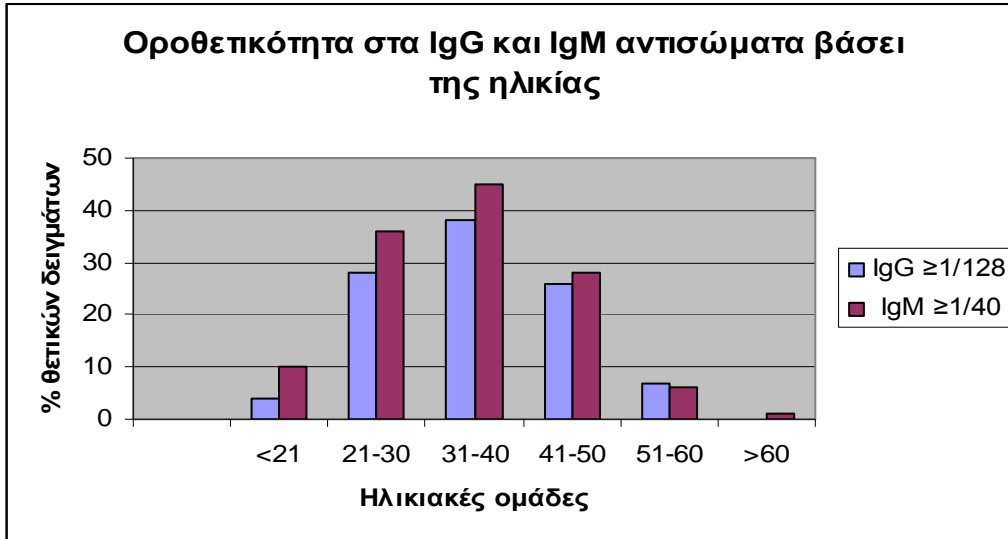


Γράφημα 1: Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση το μήνα (cut-off: IgG \geq 1/128).

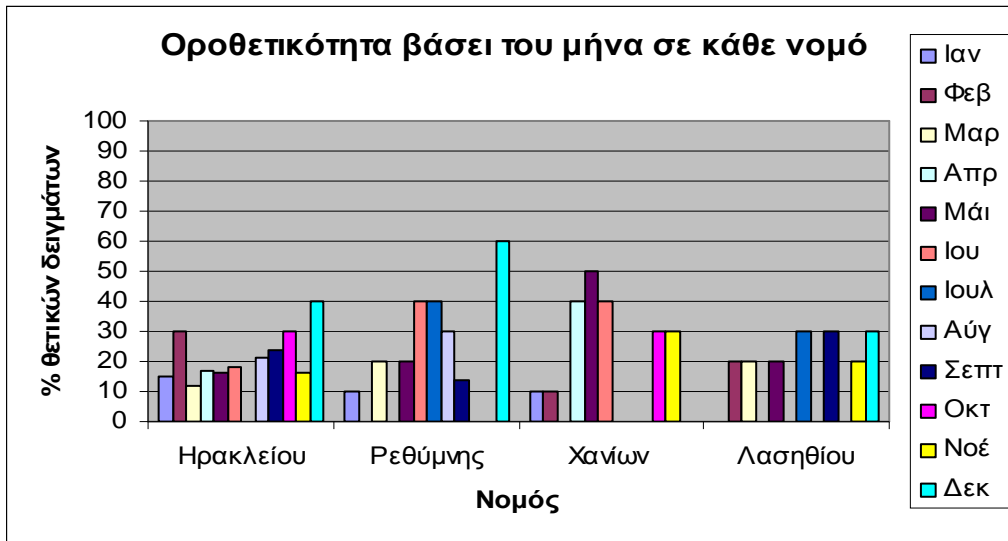


Γράφημα 2: Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση το επάγγελμα (cut-off: IgG \geq 1/128).

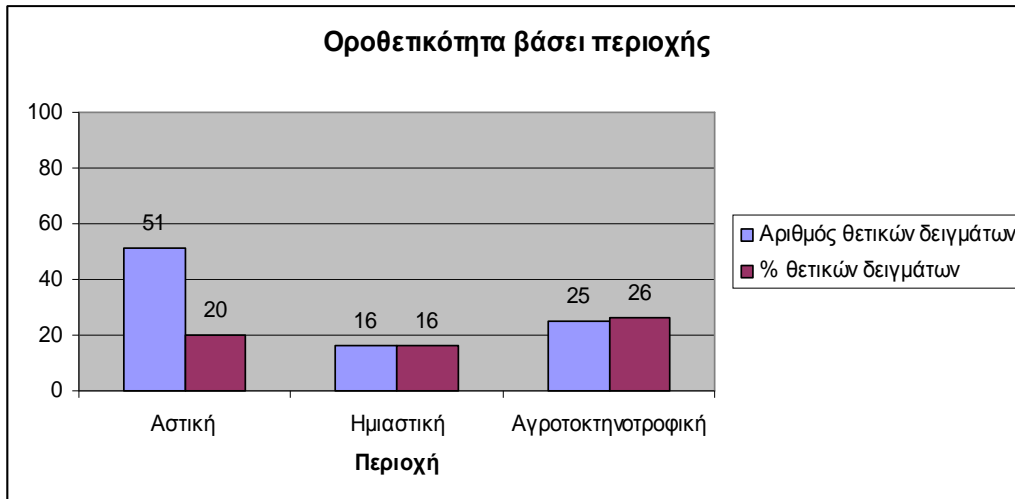
«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»



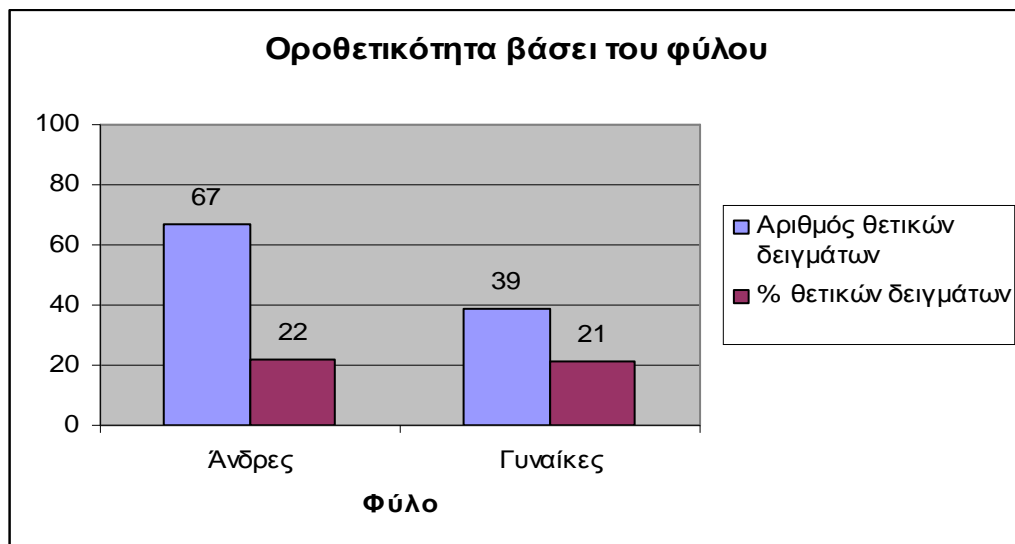
Γράφημα 3: Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση την ηλικία.



Γράφημα 4: Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση τον νομό και το μήνα (cut-off: IgG $\geq 1/128$).



Γράφημα 5: Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση την περιοχή (cut-off: IgG \geq 1/128).



Γράφημα 6: Οροθετικότητα στο δείγμα των αιμοδοτών με βάση το φύλο (cut-off: IgG \geq 1/128).

Οροεπιδημιολογική μελέτη στον ανθρώπινο πληθυσμό σε περιοχή υψηλού κινδύνου στην Κρήτη.

Συνολικά μελετήθηκαν 119 δείγματα υγιούς πληθυσμού στην περιοχή των Ανωγειών.

Υπολογίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ηλικιακών ομάδων <21 και

31-40 ($p=0.00$) και <21 και 21-30 ($p=0,009$). Δεν υπολογίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υπολοίπων ηλικιακών ομάδων, όπως και μεταξύ των 2 φύλων ($p=0,95$). Τα αποτελέσματα αποδίδονται στους Πίνακες 7, 8.

Φύλο		Ηλικιακές ομάδες						Σύνολο δειγμάτων
		<21	21-30	31-40	41-50	51-60	>61	
Ανδρες	Σύνολο δειγμάτων	10	10	20	10	8	8	66
	(%)	8,4	8,4	16,8	8,4	6,72	6,72	55,46
Γυναίκες	Σύνολο δειγμάτων	4	14	8	11	8	8	53
	(%)	3,36	11,76	6,72	9,24	6,72	6,72	44,53
Σύνολο δειγμάτων		14	24	28	21	16	16	119
	(%)	11,76	20,17	23,53	17,6	13,4	13,4	100

Πίνακας 7: Συνολικός αριθμός δειγμάτων υγιούς πληθυσμού της περιοχής των Ανωγείων ανά φύλο και ηλικιακή ομάδα.

	Σύνολο	Φύλο		Ηλικιακές ομάδες					
		Ανδρες	Γυναίκες	<21	21-30	31-40	41-50	51-60	>61
Θετικά	59	30	29	5	12	14	11	8	10
(%)	49,6	45,5	54,7	35,7	50	50	52,4	50	62,5

Πίνακας 8: Θετικά δείγματα για τα IgG αντισώματα του υγιούς πληθυσμού της περιοχής των Ανωγείων ανά φύλο και ηλικιακή ομάδα (cut-off: IgG \geq 1/128).

Οροεπιδημιολογική μελέτη στον ανθρώπινο πληθυσμό στην Κύπρο.

Συνολικά εξετάσθηκαν 375 δείγματα στην Κύπρο κι υπολογίστηκε οροθετικότητα της τάξεως του 31% (118/375) έναντι του *A. phagocytophilum*. Η μέση ηλικία των οροθετικών ατόμων ήταν 46 έτη ($SD\pm 14.1$ έτη), ενώ καμία στατιστική διαφορά ($p > 0.05$) δεν υπολογίστηκε με τη σύγκριση με τη μέση ηλικία των οροαρνητικών συμμετεχόντων (47 έτη, $SD\pm 12.3$ έτη). Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.047$) υπολογίστηκε κατά τη σύγκριση των δύο φύλων. Οι ηλικιακές ομάδες 21-30 και 31-40 αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.049$), ενώ καμία διαφορά δεν

παρατηρήθηκε για τις υπόλοιπες ηλικιακές ομάδες. Ούτε η έκθεση στον περιορισμό ($p=0.32$), ή η κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος ($p=0.96$) είτε η επαφή με τα ζώα ($p=0.42$) δεν συνεπάγονταν οποιοδήποτε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Συνεπώς, η επαφή με οποιαδήποτε από τα ζώα (βοοειδή ($p=0.38$), σκυλιά ($p=0.67$), αρουραίοι ($p=0.59$), γάτες ($p=0.50$), κουνέλια ($p=0.66$), κότες ($p=0.82$), περιστέρια ($p=0.63$)), ή εκτοπαράσιτα (κρότωνες ($p=0.62$), ψείρες ($p=0.54$)), δεν παρουσίασε οποιαδήποτε στατιστικά σημαντική διαφορά. Όλα τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους Πίνακες 9, 10 και στα Γραφήματα 7-9.

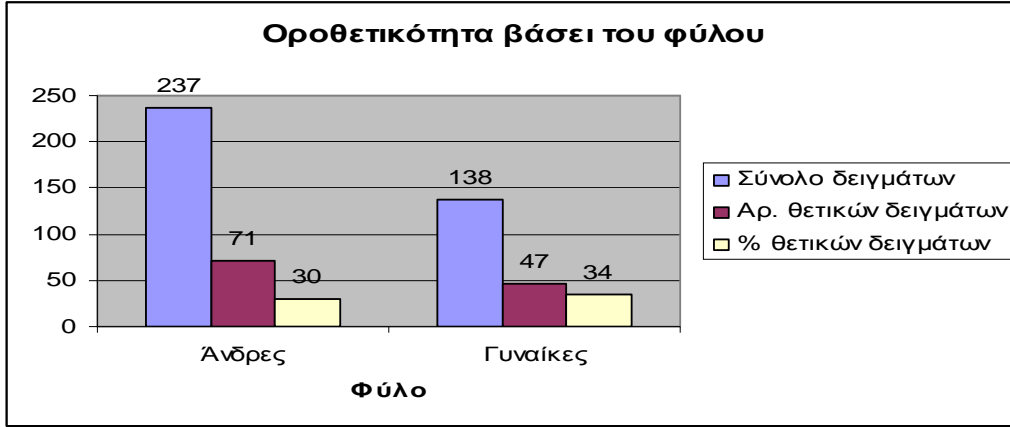
ΕΠΑΡΧΙΑ	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΘΕΤΙΚΑ (%)
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	123	35 (28)
ΛΕΜΕΣΟΣ	70	25 (36)
ΛΑΡΝΑΚΑ	80	20 (25)
ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΣ	58	18 (31)
ΠΑΦΟΣ	44	20 (45)
ΣΥΝΟΛΟ	375	118 (31)

Πίνακας 9: Ορολογικός έλεγχος ανθρώπινου πληθυσμού στην Κύπρο.

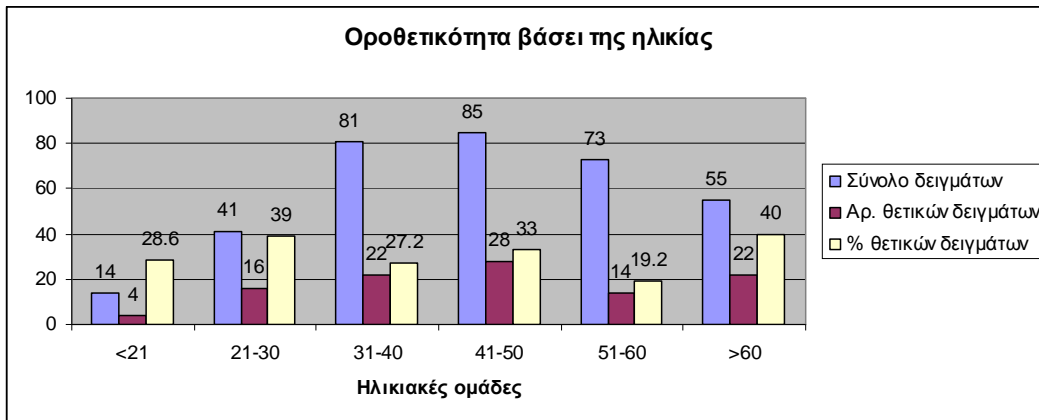
ΕΠΑΡΧΙΑ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΑΠΟ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ		ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΑΠΟ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	
	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΘΕΤΙΚΑ (%)	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΘΕΤΙΚΑ (%)
ΛΕΥΚΩΣΙΑ	47	11 (23)	76	24 (32)
ΛΕΜΕΣΟΣ	39	17 (44)	31	8 (26)
ΛΑΡΝΑΚΑ	69	17 (25)	11	3 (27)
ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΣ	54	18 (33)	4	0
ΠΑΦΟΣ	18	10 (56)	26	10 (38)
ΣΥΝΟΛΟ	227	73 (32)	148	45 (30)

Πίνακας 10: Ορολογικός έλεγχος ανθρώπινου πληθυσμού της Κύπρου μετά από τη κατηγοριοποίηση σε 2 ομάδες, υψηλού και χαμηλού κινδύνου.

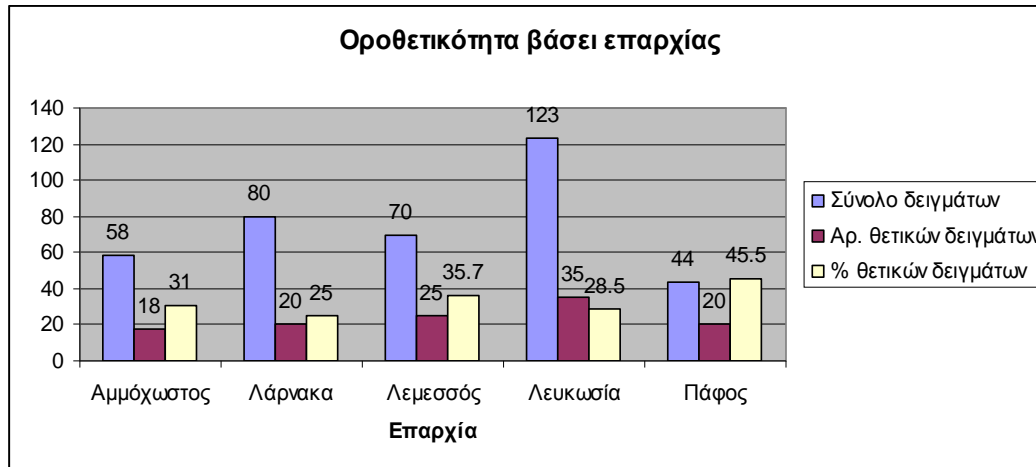
«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»



Γράφημα 7: Οροθετικότητα στο δείγμα του πληθυσμού στην Κύπρο με βάση το φύλο (cut-off: IgG \geq 1/128).



Γράφημα 8: Οροθετικότητα στο δείγμα του πληθυσμού στην Κύπρο με βάση την ηλικία (cut-off: IgG \geq 1/128).



Γράφημα 9: Οροθετικότητα στο δείγμα του πληθυσμού στην Κύπρο με βάση την επαρχία (cut-off: IgG \geq 1/128).

Αναζήτηση αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε δείγματα ορών ζώων κτηνοτροφικής σημασίας.

Έγινε αιμοληψία από αντιπροσωπευτικό τυχαίο δείγμα ορών από κτηνοτροφικής σημασίας ζώα. Συνολικά ελήφθησαν 1017 δείγματα ορών από 346 αίγες, 333 πρόβατα και 338 βοοειδή σε όλη την Κύπρο. Από τα 1017 δείγματα ζώων που ελέγχθηκαν, τα 366 (36%) βρέθηκαν θετικά στα IgG αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum*. Πιο συγκεκριμένα, η οροθετικότητα ήταν 18% για τις αίγες, 31% για τα πρόβατα και 57% για βοοειδή (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 8, 9). Όσον αφορά στα μικρά μηρυκαστικά, η οροθετικότητα ήταν σημαντικά υψηλότερη στα πρόβατα απ' ό,τι στις αίγες ($\chi^2 = 14.89$, $p < 0.05$). Εντούτοις, η οροθετικότητα ήταν σημαντικά υψηλότερη στα μεγάλα μηρυκαστικά (βοοειδή) απ' ό,τι στα μικρά μηρυκαστικά (πρόβατα και αίγες).

Η υψηλή οροθετικότητα αναδεικνύει την αυξημένη πιθανότητα επαφής με το *A. phagocytophilum* και τον υψηλό βαθμό έκθεσης παρά επιβεβαιώνει μόλυνση από το παθογόνο. Όλα τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 11.

Επαρχία	Είδος ζώου							
	Σύνολο δειγμάτων	Θετικά (%)	Αίγες		Πρόβατα		Βοοειδή	
			Σύνολο δειγμάτων	Θετικά (%)	Σύνολο δειγμάτων	Θετικά (%)	Σύνολο δειγμάτων	Θετικά (%)
Λευκωσία	310	84 (27)	107	18 (17)	75	14 (18)	128	58 (45)
Λεμεσός	158	79 (50)	97	25 (26)	41	18 (44)	20	18 (90)
Λάρνακα	301	100 (33)	42	3 (7)	109	34 (31)	150	92 (61)
Αμμόχωστος	102	57 (56)	16	8 (50)	56	21 (38)	30	24 (80)
Πάφος	146	45 (31)	84	10 (12)	52	21 (40)	10	4 (40)
Σύνολο	1017	366 (36)	346	62 (18)	333	100 (36)	338	193 (57)

Πίνακας 11: Ορολογικός έλεγχος των ζώων κτηνοτροφικής σημασίας στις 5 επαρχίες της Κύπρου για αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* (cut-off: IgG \geq 1/128).

Για την αρτιότερη μελέτη των εξαχθέντων αποτελεσμάτων, δημιουργήθηκε ο Πίνακας 12 ο οποίος συγκεντρώνει διάφορες μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ευρώπη, όσον αφορά στο έλεγχο δειγμάτων ζώων κτηνοτροφικής σημασίας για αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum*.



Χώρα	Είδος ζώου	Αριθμός δειγμάτων	Μέθοδος	Cut-off	Οροθετικότητα	Έτος	Βιβλ.
Ιταλία	Αιγοπρόβατα	269	IFA	1/50	13%	2007	Torina και λοιποί
Ιταλία	Αιγοπρόβατα Πρόβατα	50 8	IFA	1/50	26% 25%	2005	de la Fuente και λοιποί
Ισπανία	Βοοειδή Πρόβατα Αίγες	456 389 207	IFA	1/40	3.07% 0.51% 0.48%	2006	Amusatogui και λοιποί
Νορβηγία	Πρόβατα	76	IFA	?	60%	2002	Stuen και λοιποί
Ισπανία - Ιταλία	Πρόβατα Αιγοπρόβατα	5 33	IFA	1/50	40% 73%	2006	Naranjo και λοιποί
Κύπρος	Αίγες Πρόβατα Βοοειδή	346 343 338	IFA	1/100	18% 31% 57%	2007	Παρούσα μελέτη

Πίνακας 12: Οροθετικότητα έναντι του *A. phagocytophilum* σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας σε διάφορες μελέτες στην Ευρώπη.

Γονοτυπική ανίχνευση αναπλασμάτων (*Anaplasma sp.*) σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές.

Γονοτυπική ανίχνευση των αναπλασμάτων σε πιθανά-ζώα υπόδοχα.

Δείγματα προβάτων στην Κρήτη.

Όσον αφορά στην Κρήτη (Ανώγεια), τα συλλεχθέντα δείγματα αίματος (244) ελέγχθηκαν σαν pools (19) σε αντίθεση με τα συλλεχθέντα δείγματα γάλακτος (50) που ελέγχθησαν ένα προς ένα. Όλα τα pools των δειγμάτων αίματος βρέθηκαν θετικά έναντι των αναπλασμάτων, σε αντίθεση με τα δείγματα γάλακτος όπου το ποσοστό

θετικότητας ήταν 16% (8/50). Θα πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, το γάλα περιέχει αναστολείς της πολυμέρασης της PCR οι οποίοι είναι πιθανόν να μην απομακρυνθούν οριστικά παρά τη διαδικασία που προηγείται. Τα αποτελέσματα του ελέγχου συνοψίζονται στον Πίνακα 13 και στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10.

	Αίμα	Γάλα
Σύνολο	19	50
<i>Θετικά</i>	19	8
(%)	100	16

Πίνακας 13: Έλεγχος με PCR των δειγμάτων γάλακτος κι αίματος των προβάτων της περιοχής των Ανωγείων.

Τα θετικά δείγματα ελέχθηκαν με τη μέθοδο της RFLP για να γίνει ταυτοποίηση του παθογόνου. Με βάση το profil το οποίο κατασκευάστηκε (Σχήμα 5), το παθογόνο σε όλα τα θετικά δείγματα αναγνωρίστηκε ως το *A. ovis*. Σε ένα από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας η οποία ήταν 100% όμοια με την αλληλουχία του *A. ovis* που ανιχνεύθηκε στα δείγματα των ζώων κτηνοτροφικής σημασίας στην Κύπρο (βλέπε επόμενο κεφάλαιο).

Δείγματα ζώων κτηνοτροφικής σημασίας στην Κύπρο.

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. Υπολογίστηκε ότι δεν υπήρχε διαφορά στον επιπολασμό μεταξύ των αιγών και των προβάτων ($\chi^2 = 0.35, p = 0.56$). Παρά την υψηλή οροθετικότητα στα βοοειδή, κανένα θετικό PCR δεν ανιχνεύθηκε σε αυτό το είδος (Πίνακας 14).



	Είδος ζώου					
	Πρόβατα		Αίγες		Βοοειδή	
Επαρχία	Αριθμός pools	Θετικά pools (%)	Αριθμός pools	Θετικά pools (%)	Αριθμός pools	Θετικά pools (%)
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 14: Έλεγχος με PCR των δειγμάτων των ζώων κτηνοτροφικής σημασίας στις 5 επαρχίες στην Κύπρο.

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) (de la Fuente και λοιποί 2005), 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) (Pinyosong και λοιποί 2008), AY530806 (*A. platys* 16s rRNA γονίδιο) (Aguirre και λοιποί 2006), AF303467 (*A. platys* 16s rRNA γονίδιο) (Inokuma και λοιποί 2002) κι ανιχνεύθηκε μόνο στη Λευκωσία.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

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) (Liu και λοιποί 2005), AJ633051 (*A. onis*, απομόνωση Zhangjiachuan) (Liu και λοιποί 2005), AJ633048 (*A. marginale*, απομόνωση Lushi) (Liu και λοιποί 2005), AF414869 (*A. centrale* από τη Νότια Αφρική) (Lew και λοιποί 2003) και AF414875 (*A. marginale* από το Ισραήλ) (Lew και λοιποί 2003).

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 15. Στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12 απεικονίζονται οι περιοχές στις οποίες ανιχνεύθηκαν θετικά PCR σε δείγματα ζώων, ανθρώπινα περιστατικά και ο οροεπιπολασμός στον ανθρώπινο πληθυσμό έναντι του *A. phagocytophilum*.

Γενότυπος	Genbank accession number	Αλληλουχία	Λευκωσία	Λάρνακα	Λεμεσός	Πάφος	Αμόχωστος	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 15: Κατανομή των γενοτύπων στις 5 επαρχίες και στα 2 είδη ζώων. A. sp: *Anaplasma species*, A. platys: *Anaplasma platys*, A. p.: *Anaplasma phagocytophilum*.

Χρησιμοποιώντας τα προγράμματα GIS και SPSS, και λαμβάνοντας υπ' όψιν τόσο τα αποτελέσματα της οροεπιδημιολογικής μελέτης όσο και τα αποτελέσματα της PCR,

ορισμένες γεωγραφικές περιοχές ορίστηκαν ως «υψηλού κινδύνου». Όσον αφορά στις αίγες, ορίστηκαν 2 περιοχές (Σωτήρα στην Αμμόχωστο και Μαλλιά στη Λεμεσό), 3 στα πρόβατα (Αυγόρου και Ξυλοφάγου στην Αμμόχωστο, Κελοκέδαρα στην Πάφο) και 4 στα βοοειδή (Άχνα στην Αμμόχωστο, Δρομολάξια, Μενέου και Ξυλοτύμπου στη Λάρνακα) (Chochlakis και λοιποί 2008).

Δείγματα σκυλιών.

Όσον αφορά στα δείγματα από σκυλιά, συνολικά ελέγχθηκαν 139 δείγματα από τις φάρμες από τις οποίες πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας, στην Κύπρο. DNA έναντι των αναπλασμάτων δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα (Πίνακας 16).

Επαρχία	Αριθμός pools	Θετικά pools (%)
<i>Λευκωσία</i>	5	0 (0)
<i>Λεμεσός</i>	2	0 (0)
<i>Λάρνακα</i>	3	0 (0)
<i>Πάφος</i>	2	0 (0)
<i>Αμμόχωστος</i>	1	0 (0)
Σύνολο	13	0 (0)

Πίνακας 16: Έλεγχος με PCR των δειγμάτων των σκυλιών στην Κύπρο.

Δείγματα άγριων ζώων και πτηνών.

Συνολικά ελέγχθηκαν 910 δείγματα αίματος (φίλτρα) από άγρια θηλαστικά και πτηνά. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR για την ανίχνευση *Anaplasma* sp, 247 δείγματα από λαγούς, 32 δείγματα από αλεπούδες, 74 από αγρινά και 557 δείγματα από πτηνά. Στα αγρινά που αποτελούν προστατευόμενο είδος στην Κύπρο, το 9% (7/74) των δειγμάτων ήταν θετικά για αναπλάσματα. Το ποσοστό είναι σχετικά μικρό, συγκρινόμενο με τα αντίστοιχα ποσοστά στις αίγες και τα πρόβατα. Στα πουλιά, ελέγχθηκαν 131 pools που αντιστοιχούσαν σε 557 δείγματα από φίλτρα

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

συγκεντρωμένα από 51 είδη πουλιών. Το ποσοστό θετικότητας ήταν αρκετά υψηλό (37%) αναδεικνύοντας ίσως, τη σημαντικότητα των επιδημικών, αποδημητικών και ενδημικών πουλιών στη διασπορά των αναπλάσμάτων.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 17.

	Είδος ζώου							
	Λαγός		Αλεπού		Άγρινο		Πτηνά	
Επαρχία	Αριθμός pools	Θετικά pools (%)	Αριθμός pools	Θετικά pools (%)	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά δείγματα (%)	Αριθμός pools	Θετικά pools (%)
Λευκωσία	8	7 (88)	3	3 (100)			60	20 (30)
Λεμεσός	7	2 (29)	2	2 (100)			30	11 (37)
Λάρνακα	7	6 (86)	2	2 (100)			30	11 (37)
Πάφος	6	0 (0)	2	0 (0)	74	7 (9)	6	4 (67)
Αμμόχωστος	3	0 (0)	1	0 (0)			5	3 (60)
Σύνολο	31	15 (48)	10	7 (70)	74	7 (9)	131	49 (37)

Πίνακας 17: Έλεγχος με PCR των φίλτρων των άγριων ζώων στην Κύπρο.

Γονοτυπική ανίχνευση των αναπλασμάτων σε αρθρόποδα-μεταβιβαστές.

Παρασιτισμός

Από το σύνολο των ζώων τα οποία μελετήθηκαν στην Κύπρο και τα Ανώγεια, συνολικά συλλέχθηκαν 3079 κρότωναες.

Από τα είδη των ζώων κτηνοτροφικής σημασίας τα οποία μελετήθηκαν, συνολικά συλλέχθηκαν 1761 κρότωναες, εκ των οποίων οι 1606 συλλέχθηκαν από ζώα της Κύπρου και οι 155 από ζώα της περιοχής των Ανωγείων.

Η ταυτοποίηση κατέληξε στα ακόλουθα 7 είδη κροτώνων: *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma marginatum rufipes*, *Ixodes gibossus*.

Είδος κρότωνα	Κύπρος				Ανώγεια
	Είδος ζώου				
	Αίγα	Αγελάδα	Σκύλος	Πρόβατο	Πρόβατο
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	42	4	83	34	10
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			1023	41	5
<i>Rhipicephalus bursa</i>	323	2		5	140
<i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	17	37	1	140	
<i>Hyalomma marginatum rufipes</i>		1			
<i>Hyalomma marginatum marginatum</i>				7	
<i>Ixodes gibossus</i>	1				
Σύνολο	383	44	1107	227	155

Πίνακας 18: Συλλεχθέντες κρότωναες από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας.

Από τα άγρια ζώα (θηλαστικά και πτηνά), έγινε συλλογή 1318 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*. Ο παρασιτισμός στα πουλιά ήταν ελάχιστος αφού 15 κρότωναες συλλέγησαν, όλοι του είδους *I. ventalloi* και όλοι από πέρδικα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 19.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

ΕΙΔΟΣ ΕΚΤΟΠΑΡΑΣΙΤΟΥ	ΑΓΡΙΝΟ	ΛΑΓΟΣ	ΑΛΕΠΟΥ	ΠΕΡΔΙΚΑ	ΑΛΛΑ ΑΓΡΙΑ ΠΤΗΝΑ	ΣΥΝΟΛΟ
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	276					276
<i>Haemaphysalis punctata</i>	15					15
<i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	83					83
<i>Hyalomma marginatum marginatum</i>	1					1
<i>Rhipicephalus bursa</i>	216	4				220
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	46	265	175			486
<i>Rhipicephalus pusillus</i>		15				15
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		106	4			110
<i>Ixodes gibbosus</i>	23	1	19			43
<i>Ixodes ventralloi</i>		45	6	15		66
<i>Ctenocephalides canis</i>		9	100			109
<i>Ctenocephalides felis</i>		36	18			54
<i>Xenopsylla cheopis</i>		1				1
ΣΥΝΟΛΟ	663	482	322	15	0	1482

Πίνακας 19: Παρασιτισμός άγριων θηλαστικών και πτηνών.

Μελέτη των εκτοπαρασίτων με μοριακές μεθόδους.

Δεν ανιχνεύθηκε θετικό PCR στους κρότωνα που συλλέγησαν από ζώα κτηνοτροφικής σημασίας στην περιοχή των Ανωγείων, αλλά και στην Κύπρο η θετικότητα περιορίστηκε σε χαμηλά επίπεδα. Κάπως υψηλότερη (ανάλογα με το είδος του κρότωνα και το είδος ζώου) ήταν η θετικότητα όπως παρατηρήθηκε στους κρότωνα των άγριων ζώων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους Πίνακες 20, 21.

Περιοχή	Είδος ζώου	Είδος κρότωνα																	
		<i>H. anatolicum excavatum</i>			<i>R. sanguineus</i>			<i>R. bursa</i>			<i>R. turanicus</i>			<i>H. marginatum marginatum</i>			<i>I. gibbosus</i>		
		Pools	Θετικά	%	Pools	Θετικά	%	Pools	Θετικά	%	Pools	Θετικά	%	Pools	Θετικά	%	Pools	Θετικά	%
Κύπρος	Αίγες	3	0	0				37	0	0	9	0	0				1	0	0
	Πρόβατα	11	0	0	5	0	0	3	0	0	5	0	0	8	0	0			
	Βοοειδή	3	0	0				35	0	0	4	0	0				1	0	0
	Σκυλιά	1	0	0	110	12	11				10	0	0						
Ανόγεια	Πρόβατα				1	0	0	14	0	0	1	0	0						

Πίνακας 20: Έλεγχος με PCR των συλλεχθέντων εκτοπαρασίτων από τα ζώα κτηνοτροφικής σημασίας.

Είδος εκτοπαρασίτου	Είδος ζώου							
	Αγρινό		Λαγός		Αλεπού		Πέρδικα	
	Σύνολο pools	Θετικά pools (%)	Σύνολο pools	Θετικά pools (%)	Σύνολο pools	Θετικά pools (%)	Σύνολο pools	Θετικά pools (%)
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	24	6 (24)						
<i>Haemaphysalis punctata</i>	2	0						
<i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	9	0						
<i>Hyalomma marginatum marginatum</i>	1	0						
<i>Rhipicephalus bursa</i>	23	0	1	0				
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	5	0	32	3 (9)	18	1 (5)		
<i>Rhipicephalus pusillus</i>			2	0				
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			12	1 (7)	1	0		
<i>Ixodes gibbosus</i>	3	0	1	0	2	0		
<i>Ixodes ventralloi</i>			9	1 (11)	1	0	2	0
<i>Ctenocephalides canis</i>			1	0	11	0		
<i>Ctenocephalides felis</i>			4	1 (25)	5	1 (20)		
<i>Xenopsylla cheopis</i>			1	0				
ΣΥΝΟΛΟ	67	6 (9)	63	6 (9)	38	2 (5)	2	0

Πίνακας 21: Έλεγχος με PCR των συλλεχθέντων εκτοπαρασίτων από τα άγρια ζώα και πτηνά της Κύπρου.

Ενεργή αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών.

Κατά την περίοδο Φεβρουάριος 2006 – Φεβρουάριος 2009, έφθασαν στο εργαστήριο δείγματα ορού ή/και ολικού αίματος από 164 ασθενείς με ιστορικό εμπυρέτου και πιθανής έκθεσης σε κρότωνα. Έγινε διερεύνηση κροτωνο-ματαδιδόμενων νοσημάτων. Σε 34 από τους παραπάνω ασθενείς ετέθη διάγνωση (διαγνωστικά αντισώματα ή/και θετική PCR) για τα παθογόνα *C. burnetii*, *R. conorii* και *R. mooserii*. Στους υπόλοιπους 130 ασθενείς έγινε διερεύνηση για λοίμωξη από *Anaplasma* sp. Δείγματα ορών από τους παραπάνω ασθενείς ελέγχθηκαν για αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum*. Δείγματα ολικού αίματος ελέγχθηκαν για τη γονοτυπική ανίχνευση *Anaplasma* sp. Με βάση τα κριτήρια που τέθηκαν, επιβεβαίωση της λοίμωξης από ανάπλασμα (διαγνωστικοί τίτλοι ή/και θετική PCR)

έγινε σε 12 ασθενείς. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, η κλινική παρουσίαση και τα εργαστηριακά αποτελέσματα των 12 αυτών κλινικών περιστατικών, παρουσιάζονται στους Πίνακες 22, 23. Στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11 απεικονίζεται η διασπορά τόσο των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* στα ζώα κτηνοτροφικής σημασίας, όσο και τα ανθρώπινα περιστατικά που καταγράφηκαν στην Κύπρο.

Από τους 12 ασθενείς, οι ήταν 6 κάτοικοι Χανίων κι οι 6 κάτοικοι Κύπρου και νοσηλεύθηκαν με κλινικές εκδηλώσεις και εργαστηριακά συμπεράσματα υποδηλωτικά λοίμωξης από ανάπλασμα. Ένα περιστατικό καταγράφηκε το Φεβρουάριο 2006, 4 το Σεπτέμβριο 2006, 1 τον Απρίλιο 2007, 2 το Μάιο 2007, 1 τον Ιούνιο 2007, 2 τον Αύγουστο 2007 και 1 το Σεπτέμβριο 2007. Η μέση ηλικία ήταν 33,1 έτη και κυμαινόταν από 22 μηνών έως 69 έτη. Οι 5 ασθενείς ήταν άνδρες. Από τους 6 ασθενείς, οι 4 ανέφεραν επαφή με ζώα έναν μήνα πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων. Τρεις δήλωσαν ότι αφαίρεσαν κρότωνα. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε ταξιδέψει πρόσφατα εκτός Κρήτης ή Κύπρου.

Τα συμπτώματα προϋπήρχαν 2 ημέρες έως 3,5 μήνες πριν από την εισαγωγή στο νοσοκομείο. Κατά την εισαγωγή και οι 12 ασθενείς ήταν εμπύρετοι (38°C – 40°C) και οι 2 από αυτούς εμφάνισαν ρίγος. Άλλα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν: εξάνθημα (4/12), πονοκέφαλος (4/12), αδυναμία (2/12), κακουχία (4/12), σπληνομεγαλία (4/12), λεμφαδενοπάθεια (3/12), κοιλιακό άλγος (1/12), νυχτερινή εφίδρωση (1/12), διάρροια (1/12), βήχας (1/12), επιπεφυκίτιδα (1/12) και γαστρεντερικές διαταραχές (1/12).

Ο μη ειδικός εργαστηριακός έλεγχος έδειξε υψηλούς τίτλους γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) (10/12), αυξημένες τρανσαμινάσες (9/12), αυξημένη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) (8/12), αυξημένη ταχύτητα καθίζησης (ESR) (4/12),



υπερ-χολερυθρουναϊμία (1/12), θρομβοπενία (4/12), ουδετεροπενία (3/12) και λευκοπενία (2/6).

Από τους ασθενείς ελήφθησαν δείγματα αίματος (ορός, ολικό αίμα) πριν τη χορήγηση αντιβιοτικών. Οι καλλιέργειες αίματος ήταν αρνητικές για τα κοινά παθογόνα σε όλους τους ασθενείς. Σε δύο ασθενείς ανιχνεύθηκαν τίτλοι αντισωμάτων διαγνωστικοί για λοίμωξη από *R. conorii*. Σε 9 ασθενείς ανιχνεύθηκαν ειδικά αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum*. Και στους 9 ασθενείς ανιχνεύθηκαν IgM αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* με τους τίτλους να κυμαίνονται από 1/20 έως 1/320. Σε 3 ασθενείς ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα έναντι του παθογόνου (τίτλοι 1/64 – 1/128). Μόνο σε δύο ασθενείς ανιχνεύθηκαν IgM και IgG αντισώματα έναντι του παθογόνου. Σε όλα τα περιστατικά η PCR ήταν θετική στο πρώτο δείγμα ολικού αίματος κι ανιχνεύθηκε DNA των αναπλασμάτων (*Anaplasma* sp.). Η σύγκριση των ανιχνευθέντων αλληλουχιών ανέδειξε 85 – 100% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των αναπλασμάτων στη βάση δεδομένων του NCBI.

Θεραπεία χορηγήθηκε σε όλους τους ασθενείς από την ημέρα της εισαγωγής. Σε 4 ασθενείς χορηγήθηκε δοξυκυκλίνη (doxycycline) και σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin), σε 2 ασθενείς δοξυκυκλίνη και αμοξυκυλίνη με κλαβουλανικό οξύ (amoxicillin/clavulanate), σε 1 ασθενή κεφταζιδίνη (ceftazidime) και δοξυκυκλίνη, σε 2 ασθενείς δοξυκυκλίνη, σε 1 ασθενή δοξυκυκλίνη και κεφτριαξόνη (ceftriaxone). Σε 1 ασθενή η σιπροφλοξασίνη αντικαταστάθηκε από χλωραμφενικόλη (chloramphenicol) την 3^η ημέρα της νοσηλείας. Κατάσταση απυρεξίας παρατηρήθηκε μετά από 5 ημέρες κατά μέσο όρο (3-10 ημέρες) από την έναρξη της θεραπείας. Η διάρκεια νοσηλείας κυμάνθηκε από 5-17 μέρες (Chochlakis και λοιποί 2008; Psaroulaki και λοιποί 2008).

Από τα 12 περιστατικά που καταγράφηκαν αξίζει να δοθεί παραπάνω έμφαση σε 5 από αυτά, τα οποία αφορούν στο πρώτο περιστατικό αναπλάσματος που περιγράφηκε σε Ελλάδα και Κύπρο (Περιστατικό 5), σε ένα περιστατικό με συν-λοίμωξη από *A. phagocytophilum* και EBV (Περιστατικό 1), σε ένα περιστατικό με συν-λοίμωξη από *A. phagocytophilum* και *R. conorii* (Περιστατικό 2), σε ένα περιστατικό στο οποίο λοίμωξη από *A. phagocytophilum* οδήγησε σε εκδήλωση της νόσου του Kawasaki (Περιστατικό 6), καθώς και στο πρώτο περιστατικό λοίμωξης ανθρώπου από *A. onis* που έχει καταγραφεί σε παγκόσμιο επίπεδο (Περιστατικό 4).

Περιστατικό 1

Πρόκειται για ένα κορίτσι 8 ετών που νοσηλεύθηκε στην Παιδιατρική κλινική του νοσοκομείου Αρχιεπίσκοπος Μακάριος τον Μάιο 2007 λόγω υψηλού πυρετού, μέχρι 40°C, για 6 ημέρες πριν την εισαγωγή. Από ιδιώτη ιατρό είχε αρχικά χορηγηθεί αμοξικιλίνη, εντούτοις ο πυρετός επέμεινε και το παιδί εμφάνισε κοιλιακό άλγος και κεφαλαλγία.

Στην εξέταση κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο καταγράφηκαν μικροί ψηλαφητοί αυχενικοί λεμφαδένες. Δύο δείγματα ολικού αίματος και ορών ελήφθησαν, ένα κατά την εισαγωγή και το δεύτερο 15 ημέρες αργότερα. Οι εργαστηριακές εξετάσεις ήταν φυσιολογικές και η καλλιέργεια αίματος ήταν αρνητική. Ανιχνεύθηκαν αντισώματα IgG και IgM ενάντια στον ιό Epstein Barr (EBV) αλλά όχι έναντι του κυτταρομεγαλοϊού (CMV), αδενοϊού και εντεροϊού. Ανιχνεύθηκαν τίτλοι αντισωμάτων διαγνωστικοί έναντι του *A. phagocytophilum* και για τα δύο δείγματα ορών (1^ο δείγμα: IgM 1/160, IgG -, 2^ο δείγμα: IgM 1/320, IgG 1/64). Ανιχνεύθηκαν επίσης τίτλοι αντισωμάτων έναντι της *R. conorii* (IgM 1/400, IgG 1/240) αλλά όχι για την *R. typhi* και *C. burnetti*. Η PCR στο πρώτο δείγμα ήταν θετική για DNA των



αναπλασμάτων και αρνητική για όλα τα υπόλοιπα παθογόνα. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος της PCR (Genbank accession number FJ040196) βρέθηκε να έχει 85% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των αναπλασμάτων (*Anaplasma* sp.) στη βάση δεδομένων του NCBI.

Η θεραπεία ρυθμίστηκε βάσει της συμπτωματολογίας. Λόγω της επιμονής του πυρετού και του πονοκεφάλου, πραγματοποιήθηκε βυθοσκόπηση (fundoscopy) την 3^η ημέρα της εισαγωγής, η οποία αποκάλυψε ήπιο οίδημα οπτικής θηλής (papilloedema) στον αριστερό οφθαλμό. Η μαγνητική (MRI) εγκεφάλου, η αξονική ακτινογραφία και το υπερηχογράφημα κοιλίας δεν αποκάλυψαν παθολογικά ευρήματα. Ο πυρετός επέμεινε για συνολικά 12 ημέρες. Το οίδημα οπτικής θηλής υποχώρησε αυτόματα μερικές εβδομάδες αργότερα. Σε επανεξέταση 4 μήνες αργότερα η ασθενής ήταν σε καλή φυσική κατάσταση, ενώ τα IgM αντισώματα ενάντια στον ιό Epstein Barr παρέμειναν έντονα θετικά. Η περίπτωση περιγράφηκε ως επανενεργοποίηση του ιού Epstein Barr πιθανώς μετά από ταυτόχρονη μόλυνση από ένα άλλο παθογόνο (*A. phagocytophilum*).

Περιστατικό 2

Μία γυναίκα 47 ετών παρουσιάστηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρνακας τον Απρίλιο 2007 με ιστορικό πυρετού 6 ημερών (μέχρι 38°C), γενική δυσφορία, νυχτερινή εφίδρωση και βήχα. Από την έναρξη του πυρετού χορηγήθηκε αμοξυκιλίνη και κλαβουλανικό οξύ (clavulanic acid) (500 + 125 mg) από ιατρό παθολόγο, εντούτοις ο πυρετός δεν υποχώρησε.

Κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο, κανένα εύρημα δεν καταγράφηκε στη φυσική εξέταση. Ο μη ειδικός εργαστηριακός έλεγχος αποκάλυψε κανονικά επίπεδα δεικτών κι ενζύμων. Η LDH ήταν ελαφρώς αυξημένη (314 U/L). Κατά τον ορολογικό έλεγχο

σε δείγμα ορού που ελήφθη κατά την εισαγωγή, ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι της *R. conorii* (IgG 1/480, IgM 1/400) αλλά όχι έναντι των *A. phagocytophilum*, *R. mooserii*, *C. burnetii* και *Brucella*. Σε δείγμα αίματος η PCR ήταν θετική για το *A. phagocytophilum* και αρνητική για όλα τα υπόλοιπα παθογόνα. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος της PCR (Genbank accession number FJ040195) βρέθηκε να έχει 89% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των αναπλασμάτων στη βάση δεδομένων του NCBI.

Μετά από χορήγηση δοξκυκλίνης ο πυρετός υποχώρησε μέσα στις επόμενες 10 ημέρες. Κατά τον επανέλεγχο, όλες οι τιμές ήταν φυσιολογικές εκτός από την LDH που παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (314 U/L).

Περιστατικό 4

Γυναίκα 27 ετών εισήλθε τον Μάιο 2007 στο νοσοκομείο της Αμμοχώστου με πυρετό 11 ημερών (μέχρι 39.5°C). Δεν υπήρχε ιστορικό άμεσης επαφής με κατοικίδια ζώα ή κρότωνες, εντούτοις ο τόπος κατοικίας της ήταν σε μία αγροτοκτηνοτροφική περιοχή με έντονη παρουσία αιγοπροβάτων. Στη φυσική εξέταση παρατηρήθηκε ηπατοσπληνομεγαλία με ψηλαφητούς λεμφαδένες. Δείγματα αίματος (ορός, ολικό αίμα) ελήφθησαν κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο, 7 ημέρες και 3 μήνες αργότερα.

Ο μη ειδικός εργαστηριακός έλεγχος έδειξε μέτρια αναιμία (HB 11.5 g/dl), θρομβοπενία (PLT 95000), αυξημένες τρανσαμινάσες (AST 178 u/L, ALT 313 u/L), γGT (79 u/L), LDH (698 u/L) και αυξημένη CRP (10.4 mg/dl) και ESR (80 mm/hr). Η αξονική τομογραφία και το ηλεκτροκαρδιογράφημα ήταν φυσιολογικά, όπως και οι καλλιέργειες αίματος, ο έλεγχος για αντισώματα έναντι των CMV, EBV, ηπατίτιδα, HIV, μυκόπλασμα, ιό του κοξάκι (coxsackie), αδενοϊό, παρβοϊό (parvovirus) και



ρευματοειδούς παράγοντα. Ο εργαστηριακός έλεγχος για αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* έδειξε τους εξής τίτλους: IgG: 0, 0, 1/128 και IgM: 1/20, 1/20, 1/20 για τα αντίστοιχα 3 δείγματα ορών. Ο έλεγχος με την PCR του ολικού αίματος του πρώτου δείγματος ήταν θετικός. Η ανιχνευθήσα αλληλουχία (Genbank accession number EU448141) ήταν 100% όμοια με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των αναπλάσμάτων στη βάση δεδομένων του NCBI.

Στην ασθενή χορηγήθηκε δοξυκυκλίνη (200 mg/day για 11 ημέρες), κεφτριαξόνη (ceftriaxone) (2 g/day για 5 ημέρες) και ιμιπενέμη-σιλαστατίνη (imipenem-cilastatin) (1500 mg/day για 1 ημέρα). Η νοσηλεία διήρκησε 17 ημέρες.

Περιστατικό 5

Κορίτσι 9 ετών εισήχθη στο τμήμα παιδιατρικής του νοσοκομείου Αρχιεπίσκοπος Μακάριος στη Λευκωσία, τον Φεβρουάριο 2006 με ιστορικό επαναλαμβανόμενου πυρετού μέχρι 38°C για 3.5 μήνες. Η ασθενής νοσηλεύθηκε σε επαρχιακό νοσοκομείο για πρώτη φορά τον Οκτώβριο 2005 όπου έλαβε δοξυκυκλίνη και κεφτριαξόνη για συνολικά 10 ημέρες και απυρέτησε. Οι γονείς της ανέφεραν ότι είχαν απομακρύνει έναν κρότωνα από το λαιμό της ενώ έπαιζε με το σκυλί τους μερικές εβδομάδες πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων. Το παιδί δεν παραπονέθηκε για κανένα άλλο σύμπτωμα. Η φυσική εξέταση δεν ανέδειξε κάποια παθολογία. Δύο δείγματα αίματος (ορός, ολικό αίμα) ελήφθησαν, 1 κατά την εισαγωγή και ένα 15 ημέρες αργότερα.

Η εξέταση του περιφερικού αίματος αποκάλυψε μια έντονη κοκκιοποίηση των ουδετερόφιλων με αριστερή στροφή. Οι δείκτες των ηπατικών ενζύμων ήταν ελαφρώς αυξημένοι, όπως ήταν και η CRP (13.7mg/dl, αρνητική <0.5) και η ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων (ESR 58mm.). Ο εργαστηριακός έλεγχος για αντιπυρηγικά αντισώματα, αντισώματα αντι-DNA και ρευματοειδή παράγοντα ήταν

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

αρνητικός. Ο ορολογικός έλεγχος για αντισώματα έναντι του CMV, του απλού έρπητα (HSV1), του EBV, του ιού της ανεμοβλογιάς (VZV), του παρβοϊού και του αδενοϊού ήταν, αρνητικός, όπως ήταν και ο μοριακός έλεγχος. Τα δείγματα αίματος ελέγχθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό και PCR (όπως περιγράφεται σε προγενέστερο κεφάλαιο) για *Brucella*, *A. phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella henselae* και *Bartonella quintana*. Δεν ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* αλλά ο έλεγχος του πρώτου δείγματος με την PCR ήταν θετικός. Η αλληλουχία της PCR (Genbank accession number DQ822072) βρέθηκε να έχει 98% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένες, στο NCBI, αλληλουχίες στελεχών που αντιστοιχούν στο *A. phagocytophilum*. Ο υπόλοιπος εργαστηριακός έλεγχος ήταν αρνητικός.

Η καλλιέργεια αίματος, ο μικροσκοπικός έλεγχος και η καλλιέργεια ούρων ήταν αρνητικοί. Η βιοψία μυελού των οστών δεν ανέδειξε παθολογία. Η μαγνητική τομογραφία θώρακος και κοιλίας και το υπερηχογράφημα καρδιάς (echocardiogram) ήταν φυσιολογικά. Στην ασθενή χορηγήθηκε δοξκυκλίνη και ο πυρετός υποχώρησε 9 ημέρες αργότερα.

Περιστατικό 6

Ένα κορίτσι ηλικίας 22 μηνών εισήχθη στην Παιδιατρική κλινική του νοσοκομείου Αρχιεπίσκοπος Μακάριος στη Λευκωσία τον Αύγουστο 2007 λόγω πυρετού, αναφυλαξίας και λεμφαδενοπάθειας τις τελευταίες 3 ημέρες. Στη φυσική εξέταση καταγράφηκαν διογκωμένοι αυχενικοί λεμφαδένες, ήπια (non-exudative) επιπεφυκίτιδα, εξάνθημα και ερυθματώδης (erythematous) στοματοφάρυγγας. Το ηλεκτροκαρδιογράφημα ήταν φυσιολογικό.



Κατά τη διάρκεια της νοσηλείας, δείγματα αίματος (ορός, ολικό αίμα) ελήφθησαν την 1^η, 3^η, 8^η και 10^η ημέρα νοσηλείας.

Κατά την εισαγωγή τα ηπατικά ένζυμα (ALP 278 U/L, γGT 153 U/L, AST 255 U/L, ALT 434 U/L, LDH 642 U/L) η άμεση (3.8 mg/dl) και ολική χολερυθρίνη (6.2 mg/dl), το ESR (61 mm) και η CRP (12 mg/dl) ήταν αυξημένα.

Ο μοριακός και ανοσολογικός έλεγχος για CMV, EBV, εντεροϊό, αδενοϊό, παρβοϊό και μυκόπλασμα ήταν αρνητικός, όπως και η καλλιέργεια αίματος. Δεν ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι των *C. burnetti* φάση II, *R. conorii* και *R. typhi*, και οι αντίστοιχοι έλεγχοι με PCR ήταν αρνητικοί. Αντιθέτως, στο πρώτο δείγμα, ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* (IgG -, IgM 1/20) μαζί με θετική PCR. Η αλληλουχία που ανιχνεύθηκε (Genbank accession number EU448141) είχε 100% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των αναπλάσμάτων. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται σε προγενέστερο κεφάλαιο.

Στο παιδί χορηγήθηκε αρχικά κεφουροξίμη (cefuroxime) ενδοφλεβίως (IV). Η επιμονή του πυρετού για περισσότερο από 5 ημέρες, η ανάπτυξη βαθέως πορφυρού χρώματος χειλιών (red cracked lips) και η αποφολίδωση της περιπρωκτικής περιοχής (desquamation of the perianal area) πρόσθεσαν την νόσο του Kawasaki και το σύνδρομο Stevens Johnson στη διαφορική διάγνωση. Χορηγήθηκε ανοσοσφαιρίνη ενδοφλεβίως (IVIG) (2 g/kg) την 3^η ημέρα νοσηλείας. Παρά το γεγονός ότι τα ηπατικά ένζυμα, η χολερυθρίνη και η CRP επανήλθαν βαθμιαία στα φυσιολογικά επίπεδα, η κλινική εικόνα της ασθενούς δε βελτιώθηκε, με τον πυρετό και τα εξανθήματα να επιμένουν ενώ ανευρέθησαν και δείκτες υποδηλωτικοί ηπατικής δυσλειτουργίας, όπως ο αυξημένος χρόνος προθρομβίνης και η χαμηλή λευκωματίνη. Στην πορεία το βρέφος εμφάνισε διάταση του εντέρου και διάρροια και μεταφέρθηκε στη μονάδα εντατικής παρακολούθησης όπου η αντιβιοτική θεραπεία τροποποιήθηκε

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

σε πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (piperacillin/tazobactam), βανκομυκίνη (vancomycin) και μετρονιδαζόλη (metronidazole). Η εξέταση για την τοξίνη του *Clostridium difficile* ήταν αρνητική.

Λόγω της επιμονής του πυρετού και της ισχυρής υποψίας για νόσο του Kawasaki, χορηγήθηκε δεύτερη δόση IVIG την 8^η ημέρα νοσηλείας. Οι τιμές των ESR και CRP εμφάνισαν βαθμιαία πτώση ενώ τα αιμοπετάλια αυξήθηκαν την 10^η ημέρα. Ο δείκτης λευκών αιμοσφαιρίων παρέμεινε υψηλός αλλά ο τύπος (differential) άλλαξε σε 75% αντί 90% που ήταν η αρχική εύρεση. Ο τίτλος ASTO ήταν χαμηλός. Η ακτινογραφία θώρακος και το υπερηχογράφημα της κοιλίας ήταν φυσιολογικοί.

Ένα νέο ηλεκτροκαρδιογράφημα την 14^η ημέρα νοσηλείας αποκάλυψε ανευρύσματα των στεφανιαίων αγγείων. Τέθηκε διάγνωση ανθεκτικής νόσου του Kawasaki, στο παιδί χορηγήθηκαν στεροειδή, ο πυρετός, τα εξανθήματα και τα άλλα συμπτώματα υποχώρησαν και οι εργαστηριακοί δείκτες επέστρεψαν σε φυσιολογικά επίπεδα.



Περιοχή	Στέλεχος	Ηλικία (έτη)	Μήνας παρουσίασης – Κύρια κλινικά ευρήματα	Κύρια εργαστηριακά ευρήματα	Διαγνωστικοί τίτλοι	Θετική PCR	Θεραπεία
Κύπρος	FJ040196 A.sp.	8	Μάιος, πυρετός 6 ημερών ($\leq 40^{\circ}\text{C}$), πονοκέφαλος, μικροί ψηλαφητοί βουβωνικοί λεμφαδένες, κοιλιακός πόνος	ΔΑ	IgM: 1/320 IgG: 1/64	NAI	ΔΧ
Κύπρος	FJ040195 A.sp.	47	Απρίλιος, πυρετός 6 ημερών ($\leq 38^{\circ}\text{C}$), κακουχία, νυκτερινή εφίδρωση, βήχας	Αυξημένη LDH	OXI	NAI	Δοξυκυκλίνη
Κύπρος	FJ040196 A.sp.	24	Ιούνιος, πυρετός 15 ημερών, κακουχία, πονοκέφαλος, σπληνομεγαλία	Αυξημένα AST, ALT, γ -GT, ALP, ESR, CRP	OXI	NAI	Κεφαζιμίδη, Δοξυκυκλίνη
Κύπρος	DQ822072 A.p.	9	Οκτώβριος, πυρετός 3,5 μηνών (38°C)	Αυξημένα AST, ALT, ESR, CRP	OXI	NAI	Δοξυκυκλίνη
Κύπρος	EU448141 A.sp.	27	Μάιος, πυρετός 11 ημερών (39.5°C), ηπατοσπληνομεγαλία, διογκωμένοι λεμφαδένες	Αυξημένα AST, ALT, γ -GT, ESR, CRP, Θρομβοπενία, Αναμία	IgM: 1/20 IgG: 1/128	NAI	Δοξυκυκλίνη, Κεφτριαζόνη, Ιμπερόνη-σιλαστατίνη
Κύπρος	EU448141 A.sp.	2	Αύγουστος, πυρετός 3 ημερών, εξάνθημα, λεμφαδενοπάθεια	Αυξημένα AST, ALT, γ -GT, LDH, ESR, CRP, Ουδετεροπενία	IgM: 1/20 IgG: -	NAI	Δοξυκυκλίνη
Κρήτη	EU448142 A.sp.	53	Αύγουστος, Πυρετός ($\leq 38^{\circ}\text{C}$), Βουβωνική λεμφαδενοπάθεια	Αυξημένα AST, ALT, LDH, Θρομβοπενία	IgM: 1/20 IgG: -	NAI	Χλωραμφενικόλη, Δοξυκυκλίνη
Κρήτη	EU448142 A.sp.	56	Σεπτέμβριος, Πυρετός ($\leq 39.5^{\circ}\text{C}$), Πονοκέφαλος	Αυξημένα AST, ALT, LDH, Θρομβοπενία, Λευκοπενία	IgM: 1/40 IgG: 1/128	NAI	Σιπροφλοξασίνη, Δοξυκυκλίνη
Κρήτη	EU448142 A.sp.	17	Σεπτέμβριος, Πυρετός ($\leq 40^{\circ}\text{C}$), κακουχία, ναυτία, κοιλιακός πόνος, σπληνομεγαλία	Αυξημένα AST, ALT, LDH, CRP, Θρομβοπενία	IgM: 1/20 IgG: 1/128	NAI	Αμοκυκλίνη κ', κλαβουλανικό οξύ, Δοξυκυκλίνη

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

Κρήτη	EU448142 A.sp.	69	Σεπτέμβριος, Πυρετός ($\leq 38.5^{\circ}\text{C}$), ρίγος, Κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα	Αυξημένα LDH, CRP	IgM: 1/20 IgG: 1/128	NAI	Σιπροφλοξασίνη, Δοξυκυκλίνη
Κρήτη	EU448142 A.sp.	62	Σεπτέμβριος, Πυρετός ($\leq 39.6^{\circ}\text{C}$), ρίγος, Κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, σπληνομεγαλία	Αυξημένα AST, ALT, LDH, CRP, Θρομβοπενία, Λευκοπενία	IgM: 1/20 IgG: -	NAI	Αμοκυκλίνη κ' κλαβουλανικό οξύ, Δοξυκυκλίνη
Κρήτη	EU448142 A.sp.	17	Σεπτέμβριος, Πυρετός ($\leq 40^{\circ}\text{C}$), Κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα	Αυξημένα AST, ALT, LDH, CRP	IgM: 1/20 IgG: -	NAI	Σιπροφλοξασίνη, Δοξυκυκλίνη
Ισπανία		23	Μάιος, Πυρετός, Πονοκέφαλος, κακουχία, myalgias, σπληνομεγαλία, ερυθρώδες εξάνθημα	Αυξημένα LDH, Θρομβοπενία, Λευκοπενία	OXI	NAI	Δοξυκυκλίνη
Ισπανία		16	August, 3-day fever (39°C), κακουχία, μυαλγία, Πονοκέφαλος, κοιλιακός πόνος,	Αυξημένα AST, ALT, LDH, Θρομβοπενία, Λευκοπενία	NAI	OXI	Δοξυκυκλίνη
Σικελία	DQ029028 A.p.	51	Μάιος, 3-mo fever (37.2°C), κακουχία, μυαλγία, αρθραλγία, μειωμένη κινητικότητα στα άνω άκρα, απώλεια βάρους, σπληνομεγαλία	Αυξημένα ALP, χολερυθρίνη, Αναμία	OXI	NAI	ΔΑ
Ισραήλ		22	Πυρετός (40.2°C), ρίγος, λεμφαδενοπάθεια	Θρομβοπενία, Λευκοπενία	NAI	OXI	ΔΑ

Πίνακας 22: Επιβεβαιωμένα περιστατικά λοίμωξης από Αναπλάσματα και *A. phagocytophilum* στην Νότιο-ανατολική Μεσόγειο. LDH: Lactate dehydrogenase, AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase, γ -GT: γ -glutamyl transpeptidase, ESR: Erythrocyte sedimentation rate, CRP: C-reactive protein, ΦΤ: Φυσιολογική τιμή, ΔΧ: Δε χορηγήθηκε, ΔΑ: Δεν αναφέρεται, A.p.: *A. phagocytophilum*, A.sp.: Anaplasma species.



Κλινική – εργαστηριακή εικόνα	Ευρωπαϊκά	Περιστατικά	
	περιστατικά	Ελλάδας - Κύπρου	
	(%)	Αρ. περιστατικών	(%)
Ανδρικό φύλο	53	5/12	41,7
Πυρετός	100	12	100
Κακουχία	47	4/12	33,3
Ρίγη	27	2/12	16,7
Μυαλγία	40	0	0
Αδυναμία	13	2/12	16,7
Αρθραλγίες	27	0	0
Πονοκέφαλος	93	4/12	33,3
Ναυτία	53	0	0
Έμετος	20	0	0
Κοιλιακό άλγος	20	1/12	8,3
Διάρροια	13	1/12	8,3
Βήχας	20	1/12	8,3
Πνευμονία	13	0	0
Ίλιγγος	33	0	0
Επιπεφυκίτιδα	27	1/12	8,3
Λεμφαδενοπάθεια	13	3/12	25
Εξάνθημα	7	4/12	33,3
Σπληνομεγαλία	ΔΑ	4/12	33,3
Μούρα	7	0	0
Ουδετεροπενία	90	3/12	25
Θάνατος	0	0	0

Πίνακας 23: Κλινικά κι εργαστηριακά ευρήματα των καταγεγραμμένων περιστατικών σε Ελλάδα και Κύπρο. Σύγκριση με το μέσο όρο των Ευρωπαϊκών περιστατικών. ΔΑ: Δεν αναφέρεται.

Μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση – Μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας μετάδοσης.

Ζώα κτηνοτροφικής σημασίας.

Όπως περιγράφηκε σε προγενέστερο κεφάλαιο, στην Κύπρο ανιχνεύθηκαν 6 γενότυποι που αντιστοιχούσαν σε στελέχη των *A. platys* (γενότυπος 2), *A. phagocytophilum* (γενότυπος 6) και *Anaplasma* sp. (γενότυποι 1, 3, 4, 5). Για την καλύτερη μελέτη των γενοτύπων 1, 3, 4, 5 χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι βιοπληροφορικής καθώς και περιοριστικά ένζυμα (*HaeIII* και *ApoI*) προκειμένου να

δημιουργηθεί ένας αλγόριθμος για την καλύτερη μελέτη των γονιδίων *groEL* και *msp4* των αναπλασμάτων (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 12, 13). Χρησιμοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII* για να κοπεί το γονίδιο *groEL* αποκαλύπτεται μια μπάντα (band) κοντά στις 900 βάσεις που περιορίζει την επιλογή ανάμεσα σε *A. centrale* και *A. marginale*. Σε αυτή την περίπτωση η διάκριση μεταξύ των δύο ειδών παρέχεται από την απουσία (*A. centrale*) ή παρουσία (*A. marginale*) μιας μπάντας 92 βάσεων. Η απουσία της μπάντας των 900 βάσεων αποδικνύει ότι το είδος είναι *A. ovis*. Χρησιμοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο *ApoI* για να κοπεί το γονίδιο *msp4* αποκαλύπτονται 3 αποτυπώματα, για το *A. marginale* παρατηρείται μία μπάντα στις 849 βάσεις, για το *A. centrale* παρατηρούνται δύο μπάντες στις 765 και 87 βάσεις και για το *A. ovis* παρατηρούνται δύο μπάντες στις 537 και 315 βάσεις.

Εφαρμόζοντας τον παραπάνω αλγόριθμο σε όλα τα δείγματα που αντιστοιχούσαν στους γενότυπους 1, 3, 4, 5 αποκαλύφθηκε ότι τα δείγματα αυτά αντιστοιχούν στο *A. ovis*.

Ταυτοποιήθηκαν κι επιβεβαιώθηκαν, με τη χρήση του NCBI BLAST, 9 ακολουθίες του γονιδίου *groEL* (4 ανιχνεύονται στις αίγες και 5 στα πρόβατα) και 12 ακολουθίες του γονιδίου *msp4* (5 ανιχνεύονται στις αίγες και 7 στα πρόβατα). Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του γονιδίου *msp4*, οι αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν σαν *A. ovis* με ομοιότητα 99% με τα στελέχη *A. ovis* strain AM5 (EF067341), *A. ovis* strain HungaryV8 (EF190511), *A. ovis* strain Italy20 (AY702923) και *A. ovis* strain Italy147 (AY702924). Στην περίπτωση του *groEL*, τα αποτελέσματα της αναζήτησης στο BLAST ταυτοποίησαν τις αλληλουχίες με το στέλεχος *A. ovis* απομονώση OVI (AF441131) με ποσοστό ομοιότητας 99%.

Χρησιμοποιώντας το ClustalW και το λογισμικό MEGA 4 όλες οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν και κατασκευάστηκαν φυλογενετικά



δέντρα. Στην περίπτωση του γονιδίου *groEL* αποκαλύφθηκε ένας υψηλός βαθμός ομοιότητας. Αρκετές από τις μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσεων ήταν σιωπηλές που δεν αποκρύπτουν αλλαγές του νουκλεϊκού οξέως (Πίνακας 24). Στο σύνολο ανιχνεύθηκαν 45 σημειακές μεταλλάξεις (point mutations) και 3 τριπλέτες εισαγωγής (triplet insertions). Τρεις από τις σημειακές μεταλλάξεις οδήγησαν στη διατήρηση του ίδιου αμινοξέος. Όσον αφορά στις ακολουθίες του *msp4*, ανιχνεύθηκαν 53 σημειακές μεταλλάξεις (Πίνακας 25). Ένδεκα από αυτές ήταν σιωπηλές μεταλλάξεις (silent mutations). Και στα 2 γονίδια, το ποσοστό των μεταβάσεων (transitions, transversions) ήταν σχεδόν το ίδιο, 45.3% και 54.7% αντίστοιχα για το *msp4*, 44.2% και 55.8% αντίστοιχα για το *groEL*.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

	41bp	44-48bp	68-70bp	76-77bp	205bp	284-287bp	293-296bp	345bp	438bp	513bp	538bp	540bp	571bp	647bp	661bp	671-672bp	689-692bp	725-726bp	729bp
	14aa	15-16aa	23-24aa	26aa	72aa	95-96aa	98-99aa	115aa	146aa	171aa	180aa	191aa	216aa	221aa	224aa	230-231aa	242aa	243aa	
AF441131 <i>A. ovis</i> OVI	C	TAAGG		GC	G	T	C	A	T	T	G	G	G	G	C	TC	TCAA	AT	T
FJ460441 <i>A. ovis</i> goat 76	C	TAAGG		GC	G	T	C	A	T	T	G	G	G	G	T	TG	ATCA	AT	T
FJ460435 <i>A. ovis</i> goat 9	C	TAAGG	GAA	TG	C	CTGG	GCAT	A	G	C	A	C	C	G	C	AC	TCGA	AT	A
FJ460434 <i>A. ovis</i> sheep 8	C	TAAGG		GC	G	T	C	A	T	T	G	G	G	G	C	GC	TCAC	AT	T
FJ460436 <i>A. ovis</i> sheep 37	C	TAAGG		GC	G	T	C	T	T	T	G	G	G	A	C	TC	TCAA	AC	T
FJ460442 <i>A. ovis</i> goat 77	C	TAAGG		GC	G	T	C	A	T	T	G	G	G	G	C	GC	TCCA	TT	T
FJ460439 <i>A. ovis</i> sheep 64	A	TAGAG		GC	G	T	C	A	T	T	G	G	G	G	C	TC	TCAC	TT	T
FJ460737 <i>A. ovis</i> sheep 40	A	TAGAG		GC	G	T	C	A	T	T	G	G	G	G	C	TC	TCAA	AT	T
FJ460440 <i>A. ovis</i> goat 71	A	AGAGA		GC	G	T	C	A	T	T	G	G	G	G	C	CC	TCAC	AT	T
FJ460438 <i>A. ovis</i> sheep 54	A	AGAGA		GC	G	T	C	A	T	T	G	G	G	A	C	TC	TCAA	AT	T
EF520695 <i>A. centrale</i> strain 16	C	TAAGG		GC	G	T	C	C	T	T	G	G	G	G	C	TC	TCAA	AC	C
AF414862 <i>A. marginale</i> Israel	C	TAAGG		GC	G	T	C	C	T	T	G	G	G	G	C	TC	TCAA	AC	C
AF441131 <i>A. ovis</i> OVI	S	IR		A	A			I	I	V	E	E	V	P	F	IN	N	V	
FJ460441 <i>A. ovis</i> goat 76	S	IR		A	A			I	I	V	E	E	V	S	L	NH	N	V	
FJ460435 <i>A. ovis</i> goat 9	S	IR	GK	C	P	PG	GI	I	M	V	N	Q	V	P	Y	ID	N	V	
FJ460434 <i>A. ovis</i> sheep 8	S	IR		A	A			I	I	V	E	E	V	P	C	IT	N	V	
FJ460436 <i>A. ovis</i> sheep 37	S	IR		A	A			I	I	V	E	E	I	P	F	IN	N	V	
FJ460442 <i>A. ovis</i> goat 77	S	IR		A	A			I	I	V	E	E	V	P	C	IH	I	V	
FJ460439 <i>A. ovis</i> sheep 64	Y	IE		A	A			I	I	V	E	E	V	P	F	IT	I	V	
FJ460737 <i>A. ovis</i> sheep 40	Y	IE		A	A			I	I	V	E	E	V	P	F	IN	N	V	
FJ460440 <i>A. ovis</i> goat 71	Y	KR		A	A			I	I	V	E	E	V	P	S	IT	N	V	
FJ460438 <i>A. ovis</i> sheep 54	Y	KR		A	A			I	I	V	E	E	I	P	F	IN	N	V	
EF520695 <i>A. centrale</i> strain 16	S	IR		A	A			I	I	V	E	E	V	P	F	IN	N	V	
AF414862 <i>A. marginale</i> Israel	S	IR		A	A			I	I	V	E	E	V	P	F	IN	N	V	



Πίνακας 24: Θέσεις στις αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου *groEL* που παρουσιάζουν σημειακές μεταλλάξεις (point mutations) ή τριπλέτες εισαγωγής (triplet insertions). Ο αριθμός του αντίστοιχου αμινοξέος για την κάθε μετάλλαξη απεικονίζεται κάτω από κάθε σημείο μετάλλαξης. Με ανοιχτό πράσινο απεικονίζονται τα αμινοξέα που παρέμειναν ως είχαν λόγω σιωπηλής μετάλλαξης (silent mutation). Οι χρωματισμένες αλληλουχίες αντιστοιχούν στις αλληλουχίες αναφοράς.

	53bp	75bp	119bp	126bp	470bp	546bp	660bp	695bp	736bp	767bp	770bp	789bp	801bp	817bp	819-824bp	827-828bp
EF067341 <i>A. ovis</i> SpainAM5	C	G	G	G	T	T	T	T	T	A	T	C	A	G	TTTTAA	TT
AY702923 <i>A. ovis</i> Italy20	C	G	G	G	T	T	T	T	T	A	T	C	A	G	TTTTAA	TT
EF190511 <i>A. ovis</i> HungaryV8	C	G	G	G	T	T	T	T	T	A	T	C	A	G	TTTTAA	TT
FJ460454 <i>A. ovis</i> goat 73	C	G	G	G	T	T	T	T	T	A	T	C	A	G	TTTTAA	CT
FJ460447 <i>A. ovis</i> goat 23	C	G	G	G	T	T	T	T	T	C	C	C	A	G	GTTTTAA	CT
FJ460448 <i>A. ovis</i> sheep 35	C	G	G	G	T	T	T	C	A	C	T	C	A	G	TTGTGA	CT
FJ460455 <i>A. ovis</i> goat 77	C	G	G	G	T	T	A	T	T	C	T	C	C	G	TGTTGA	CT
FJ460445 <i>A. ovis</i> goat 9	C	G	G	G	T	T	A	T	T	C	T	C	A	G	TTTTGA	CT
FJ460455 <i>A. ovis</i> goat 71	C	G	G	G	T	C	T	T	T	C	T	C	G	G	TTTAAA	CT
AY702924 <i>A. ovis</i> Italy147	C	G	G	G	C	T	T	T	T	A	T	C	A	G	TTTTAA	TT
FJ460452 <i>A. ovis</i> sheep 64	C	G	G	G	C	T	T	T	T	C	T	C	A	G	TTTGAA	CT
FJ460451 <i>A. ovis</i> sheep 40	C	G	G	G	C	T	T	T	T	C	T	C	A	G	TTTGAA	CT
FJ460450 <i>A. ovis</i> sheep 37	A	T	G	G	C	T	T	T	T	A	T	G	G	A	TGTTAC	TT
FJ460449 <i>A. ovis</i> sheep 36	C	T	T	T	C	T	T	T	T	C	T	C	A	G	TTTTAA	CT
FJ460446 <i>A. ovis</i> sheep 10	C	G	G	G	C	T	T	T	T	A	T	C	A	G	TTTTAC	TG
FJ460444 <i>A. ovis</i> sheep 8	C	G	G	G	C	T	A	T	T	A	T	C	A	G	TTTTAA	TT

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

	18aa	25aa	40aa	42aa	157aa	182aa	220aa	232aa	246aa	256aa	257aa	263aa	267aa	273-276aa
EF067341 <i>A. ovis</i> SpainAM5	A	G	G	G	V	Y	V	L	Y	K	F	A	A	GFNL
AY702923 <i>A. ovis</i> Italy20	A	G	G	G	V	Y	V	L	Y	K	F	A	A	GFNL
EF190511 <i>A. ovis</i> HungaryV8	A	G	G	G	V	Y	V	L	Y	K	F	A	A	GFNL
FJ460454 <i>A. ovis</i> goat 73	A	G	G	G	V	Y	V	L	Y	K	F	A	A	GFNP
FJ460447 <i>A. ovis</i> goat 23	A	G	G	G	V	Y	V	L	Y	T	S	A	A	GFNP
FJ460448 <i>A. ovis</i> sheep 35	A	G	G	G	V	Y	V	S	N	T	F	A	A	GCDP
FJ460455 <i>A. ovis</i> goat 77	A	G	G	G	V	Y	V	L	Y	T	F	A	A	GNDP
FJ460445 <i>A. ovis</i> goat 9	A	G	G	G	V	Y	V	L	Y	T	F	A	A	GFDP
FJ460455 <i>A. ovis</i> goat 71	A	G	G	G	V	Y	V	L	Y	T	F	A	A	GLNP
AY702924 <i>A. ovis</i> Italy147	A	G	G	G	A	Y	V	L	Y	K	F	A	A	GFNL
FJ460452 <i>A. ovis</i> sheep 64	A	G	G	G	A	Y	V	L	Y	T	F	A	A	GLNP
FJ460451 <i>A. ovis</i> sheep 40	A	G	G	G	A	Y	V	L	Y	T	F	A	A	GLNP
FJ460450 <i>A. ovis</i> sheep 37	D	G	G	G	A	Y	V	L	Y	K	F	A	A	SVTL
FJ460449 <i>A. ovis</i> sheep 36	A	G	V	G	A	Y	V	L	Y	T	F	A	A	GFNP
FJ460446 <i>A. ovis</i> sheep 10	A	G	G	G	A	Y	V	L	Y	K	F	A	A	GFTL
FJ460444 <i>A. ovis</i> sheep 8	A	G	G	G	A	Y	V	L	Y	K	F	A	A	GFNL

Πίνακας 25: Θέσεις στις αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου *msp4* που παρουσιάζουν σημειακές μεταλλάξεις (point mutations). Ο αριθμός του αντίστοιχου αμινοξέος για την κάθε μετάλλαξη απεικονίζεται κάτω από κάθε σημείο μετάλλαξης. Με ανοιχτό πράσινο απεικονίζονται τα αμινοξέα που παρέμειναν ως είχαν λόγω σιωπηλής μετάλλαξης (silent mutation). Οι χρωματισμένες αλληλουχίες αντιστοιχούν στις αλληλουχίες αναφοράς.

Τα γραφήματα 10 και 11 απεικονίζουν τη διάταξη των ταυτοποιημένων στελεχών *A. Ovis* στα ζώα κτηνοτροφικής σημασίας στην Κύπρο, σε σχέση με ήδη δημοσιευμένα στελέχη παγκοσμίως.



Γράφημα 10: Φυλογενετικό δένδρο που απεικονίζει την ομαδοποίηση των αλληλουχιών του γονιδίου *msp4*, κατασκευασμένο με Neighbor-joining και bootstrap analysis. Οι φυλογενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Kimura 2.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»



Γράφημα 11: Φυλογενετικό δένδρο που απεικονίζει την ομαδοποίηση των αλληλουχιών του γονιδίου *groel*, κατασκευασμένο με Neighbor-joining και bootstrap analysis. Οι φυλογενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Kimura 2.

Ανθρώπινα περιστατικά.

Για την καλύτερη μελέτη των καταγεγραμμένων περιστατικών, έγινε προσπάθεια έρευνας σε επιδημιολογικό επίπεδο της εγγύς περιοχής του κάθε περιστατικού. Αυτό έγινε κατορθωτό σε 3 περιστατικά. Στην συνέχεια, έγινε προσπάθεια να συγκριθούν οι αλληλουχίες των ανιχνευθέντων στελεχών σε ανθρώπους και ζώα με στόχο την καταγραφή του βαθμού ομοιογένειας τους.

Περιστατικό 4.

Σε επιδημιολογική έρευνα που διεξήχθη στην περιοχή κατοικίας της ασθενούς, 40 δείγματα ολικού αίματος ελήφθησαν (10 από αίγες και 30 από πρόβατα). Τα δείγματα ελέγχθηκαν με PCR σε 4 pools και βρέθηκαν θετικά. Συγκρίνοντας την αλληλουχία της ασθενούς με τις αλληλουχίες των ζώων (Genbank accession number EU090185) βρέθηκε 100% ομοιότητα μεταξύ τους. Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους που περιγράφονται σε προηγούμενο κεφάλαιο (έλεγχος γονιδίων *groel*, *msp4*, RFLP),



ελέγχθηκαν τα αρχικά δείγματα της ασθενούς για DNA των αναπλασμάτων των ζώων (*A. ovis*, *A. centrale*, *A. marginale*), τα οποία ήταν θετικά για *A. ovis*. Η αλληλουχία του γονιδίου *msp4* (Genbank accession number FJ460443) αποκάλυψε 99% ομοιότητα με τα στελέχη *A. ovis* strain AM5 (EF067341), *A. ovis* strain Ουγγαρία V8 (EF190511), *A. ovis* strain Ιταλία 20 (AY702923) και *A. ovis* (AF393742). Η αλληλουχία του γονιδίου *groel* (Genbank accession number FJ477840) αποκάλυψε 98% ομοιότητα με το στέλεχος *A. ovis* isolate OVI (AF441131).

Όπως φαίνεται και στους Πίνακες 26, 27, όσον αφορά την αλληλουχία του γονιδίου *msp4*, κρίσιμες αλλαγές φαίνεται να είναι εκείνες στις θέσεις 24 (αλλαγή αμινοξέος S→N) και 28 (V→M). Όσον αφορά την αλληλουχία του γονιδίου *groel*, αλλαγές μεγάλης σημασίας φαίνεται να είναι εκείνες στις θέσεις 217 (P→S), 220 (F→L) και 226 (IN→NH).

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

Sequence ID	Country of origin / host	Amino acid sequences	Position
panag	Cyprus / human	xMANVVVTGEAYDVLREVVRILEDVAVGCTAGPKGLTVAISKPYGSP EITKDG YKVMKSIK	59
AF441131	Australia / ?	MANVVVTGEALDKSI-----	60
EF204478	Mongolia / reindeer	xx	
panag	Cyprus / human	PEEPLAVAIANIIITQSASQCNDKVGDTTCSILTAKVIEEVSKAKAAGADIISIKNGIL	119
AF441131	Australia / ?	-----	120
EF204478	Mongolia / reindeer	xx-----	30
panag	Cyprus / human	KAKEAVPTALLSMKREVA SEDEIAQVATISANGDKNIGSKIAQCVREVGKDG VITVEESK	179
AF441131	Australia / ?	-----L-----	180
EF204478	Mongolia / reindeer	-----L-----	90
panag	Cyprus / human	GFKDLEVERTDGMQFDRGYLSPYFVTNAEKMLVEFENSY ILLTEKKNHLVQNI LPVLENV	239
AF441131	Australia / ?	-----P--F----IN-----	240
EF204478	Mongolia / reindeer	-----P--F----IN-----	150
panag	Cyprus / human	ARSGRPLLI Ixx	249
AF441131	Australia / ?	-----KAPGFGRDRK DMLGDI AVIAGAKY	300
EF204478	Mongolia / reindeer	-----xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	186

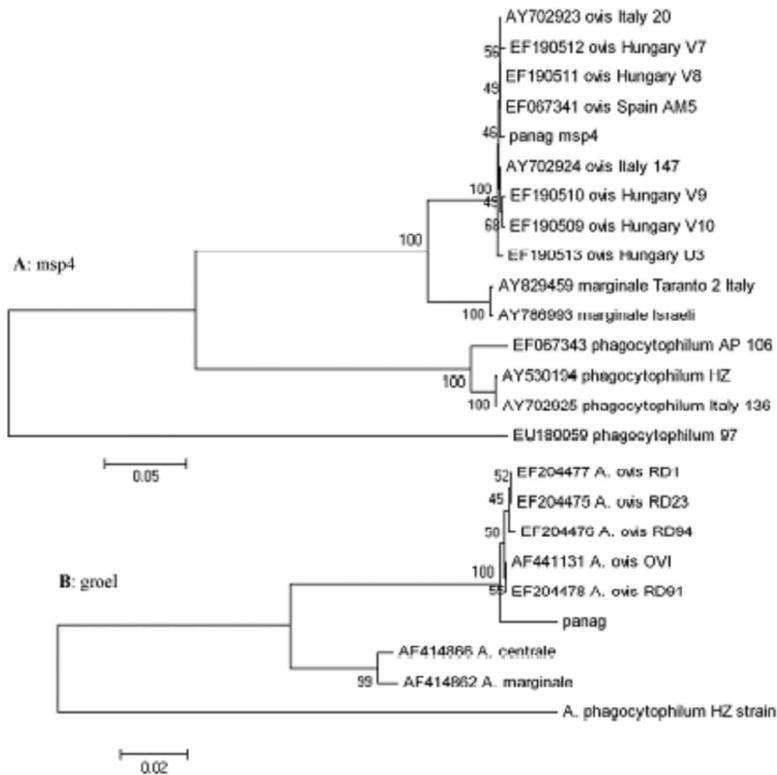
Πίνακας 26: Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών, του γονιδίου *groel*, στελεχών που έχουν κατατεθεί στην Genbank. Οι αλληλουχίες που απεικονίζονται στον Πίνακα επιλέχθηκαν βάσει των διαφορών μεταξύ τους. Με την εξαίρεση της αλληλουχίας AF441131, η οποία αντιστοιχεί σε ολόκληρο το γονίδιο, οι υπόλοιπες αντιστοιχούν σε τμήματα του γονιδίου (partial cds) (μη αναγνωρισμένα αμινοξέα ορίζονται ως “x”).



Sequence ID	Country of origin / host	Amino acid sequences	Position
FJ460443	Cyprus / human	MNYRELFTGGLSAATVCACSLLVNGAVMASPMSHEVASEGSGVMGGSFYVSAAYSPAPPS	60
EF190510	Hungary / sheep	-----S--V-----G-----S	60
EF190509	Hungary / sheep	-----S--V-----S-----S	60
AY702924	Italy / ovine	-----S--V-----S-----S	60
EF190513	Hungary / sheep	-----S--V-----S-----S	60
EF190512	Hungary / sheep	-----S--V-----S-----P	60
FJ460443	Cyprus / human	VTSFDMRESSRETSYVRGYDKSVATIDVSAPANFSKSGYTFAFSKNLLTSFDGAVGYSLG	120
EF190510	Hungary / sheep	-----K-----F-----	120
EF190509	Hungary / sheep	-----R-----F-----	120
AY702924	Italy / ovine	-----K-----F-----	120
EF190513	Hungary / sheep	-----K-----F-----	120
EF190512	Hungary / sheep	-----K-----L-----	120
FJ460443	Cyprus / human	GARVELEASYRRFATLADGQYAKSGAESLAAITRDAVITENNYFVVKIDEITNTSVMLNG	180
EF190510	Hungary / sheep	-----A-----	180
EF190509	Hungary / sheep	-----A-----	180
AY702924	Italy / ovine	-----A-----	180
EF190513	Hungary / sheep	-----V-----	180
EF190512	Hungary / sheep	-----V-----	180
FJ460443	Cyprus / human	CYDVLHTDLPVSPYVCAGIGASFVDISKQVTTKLAYRGKVGISYQFTPEISLVVGGFYHG	240
EF190510	Hungary / sheep	--D-----	240
EF190509	Hungary / sheep	--D-----	240
AY702924	Italy / ovine	--D-----	240
EF190513	Hungary / sheep	--E-----	240
EF190512	Hungary / sheep	--D-----	240

Πίνακας 27: Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών, του γονιδίου *msp4*, στελεχών που έχουν ανιχνευθεί σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Οι αλληλουχίες που απεικονίζονται στον Πίνακα επιλέχθηκαν βάσει των διαφορών μεταξύ τους. Από τα 283 αμινοξέα, τα 240 απεικονίζονται εδώ. Το υπόλοιπο των αλληλουχιών ήταν όμοιο σε όλα τα στελέχη.

Τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν (Γράφημα 12) επιβεβαίωσαν ότι οι ακολουθίες που ανιχνεύθηκαν για το συγκεκριμένο κλινικό περιστατικό ομαδοποιούνται με δημοσιευμένες αλληλουχίες στελεχών του *A. ovis*.



Γράφημα 12: Εξελικτικά δέντρα που κατασκευάστηκαν βάσει των αλληλουχιών των γονιδίων *msp4* (A) και *groel* (B) για τα *A. phagocytophilum*, *A. marginale* και *A. ovis*. A: Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το βέλτιστο δέντρο με άθροισμα μήκους κλάδων = 0.87919908 παρουσιάζεται. B: Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το βέλτιστο δέντρο με άθροισμα μήκους κλάδων = 0.34047351 παρουσιάζεται. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kimura 2. Για το γονίδιο *msp4* χρησιμοποιήθηκαν οι ακολουθίες EF067341 (*A. ovis* στέλεχος από την Ισπανία), EF190511 (*A. ovis* στέλεχος από την Ουγγαρία), AY702923 (*A. ovis* στέλεχος από την Ιταλία), AY829459 (*A. marginale* στέλεχος από το Taranto, Ιταλία), AY786993 (*A. marginale*



στέλεχος από το Ισραήλ), AY530194 (*A. phagocytophilum* στέλεχος Hz), AY702925 (*A. phagocytophilum* στέλεχος από την Ιταλία), EU180059 (*A. phagocytophilum* στέλεχος 97), EF067343 (*A. phagocytophilum* στέλεχος AP106). Για το γονίδιο *groel* χρησιμοποιήθηκαν οι ακολουθίες AF441131 (*A. onis* απομόνωση OVI), AF414866 (*A. centrale* από τη Νότια Αφρική), AF414862 (*A. marginale* απομόνωση από το Ισραήλ), EF204478 (*A. onis* στέλεχος RD91), EF204477 (*A. onis* στέλεχος RD1), EF204476 (*A. onis* στέλεχος RD94), EF204475 (*A. onis* στέλεχος RD23) και η ακολουθία του *groel* του στελέχους αναφοράς *A. phagocytophilum* HZ.

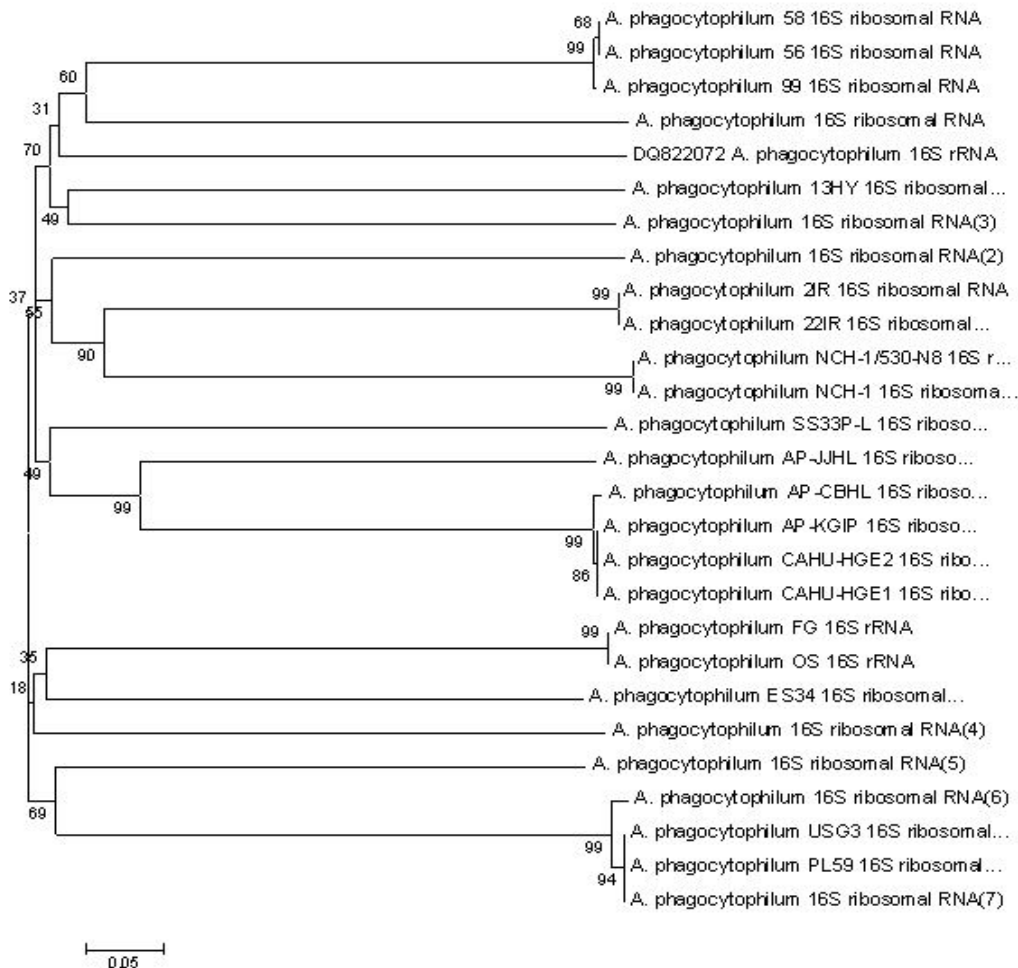
Περιστατικό 5.

Σε μία επιδημιολογική έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο χωριό όπου κατοικούσε η ασθενής συλλέχθηκαν 22 δείγματα αίματος (ορός, ολικό αίμα) από τους γονείς του παιδιού και από γείτονες, καθώς επίσης και 15 δείγματα από ζώα κοντινών περιοχών (3 δείγματα από σκυλιά, 5 δείγματα από αίγες και 7 δείγματα από πρόβατα). Τριάντα τέσσερις (34) κρότωνα που παρασιτούσαν τα ζώα απομακρύθηκαν, ταξινομήθηκαν, ομογενοποιήθηκαν και εξετάστηκαν με την PCR με τον ίδιο τρόπο όπως τα δείγματα αίματος. Τα σκυλιά παρασιτούνταν από 12 κρότωνα του γένους *Rhipicephalus sanguineus* και από 1 *Rhipicephalus turanicus*, ενώ 21 κρότωνα του γένους *Hyalomma anatolicum excavatum* συλλέχθηκαν από τα πρόβατα. Δε βρέθηκαν κρότωνα στις αίγες.

Δώδεκα (55%) από τα ανθρώπινα δείγματα ήταν θετικά για IgG αντισώματα έναντι του παθογόνου, με τον υψηλότερο τίτλο να είναι 1/8192. Ο πατέρας της ασθενούς εμφάνισε τίτλο 1/128, ενώ η μητέρα 1/4096. Η μητέρα ανέφερε να έχει επαφή με το ίδιο σκυλί με την κόρη της. Κανείς γονέας δεν είχε κλινικά συμπτώματα είτε πριν είτε την ημέρα της δειγματοληψίας, όπως ίσχυε και για το υπόλοιπους γείτονες.

Όσον αφορά στα δείγματα ζώων, τα 3 από τα 5 των αιγών (υψηλότερος τίτλος 1/128) και τα 6 από τα 7 των προβάτων (υψηλότερος τίτλος 1/512) ήταν θετικά.

Τα δείγματα ολικού αίματος των ζώων εξετάστηκαν σε pools. Το pool των αιγών ήταν θετικό στην PCR, ενώ τα pools των προβάτων και των σκυλιών ήταν αρνητικά. Κανένα από τα ζώα δεν παρουσίασε οποιαδήποτε κλινικά σημεία λοίμωξης από το παθογόνο. Η αλληλουχία του pool των αιγών εμφάνισε 97% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των αναπλάσμάτων στο NCBI. Κανένας από τους κρότωνα που εξετάστηκαν δεν ήταν θετικός στην PCR (Psaroulaki και λοιποί 2008). Το Γράφημα 13 αποτυπώνει το ταυτοποιημένο στέλεχος *A. phagocytophilum* σε σχέση με ήδη δημοσιευμένα στελέχη.



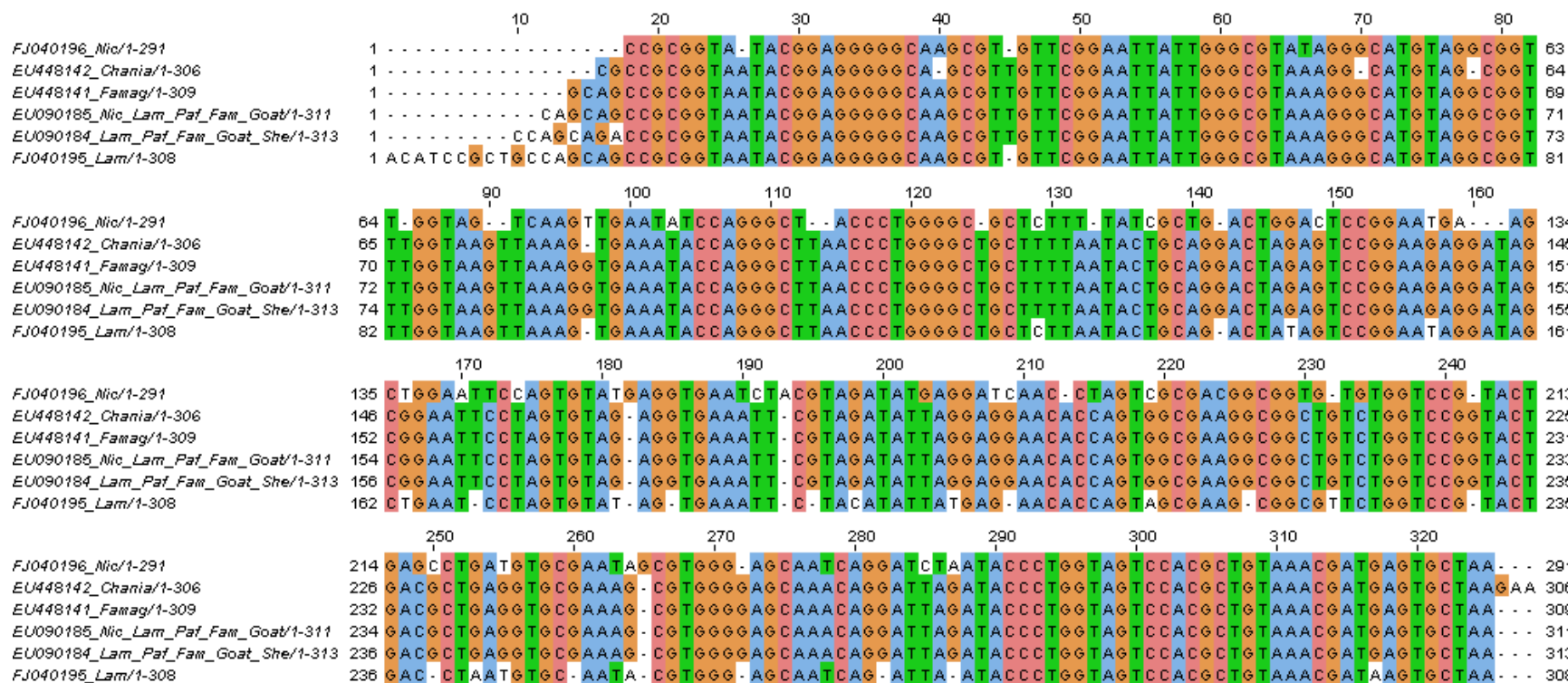
Γράφημα 13: Φυλογενετικό δένδρο για το στέλεχος *A. phagocytophilum* (Genbank accession number DQ822072) σε σχέση με ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες του γονιδίου 16s rRNA.

**Περιστατικό 6.**

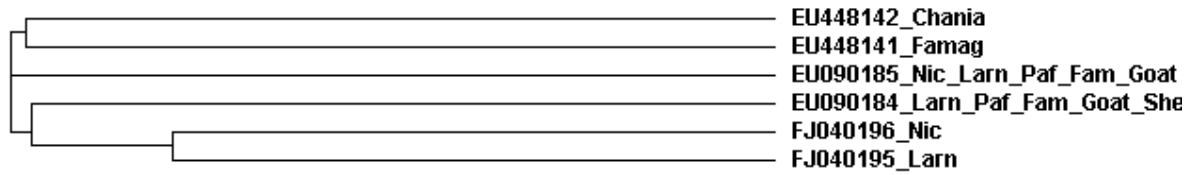
Σε μία σύντομη επιδημιολογική έρευνα, που πραγματοποιήθηκε στην περιοχή κατοικίας του μικρού κοριτσιού, 51 δείγματα (41 από βοοειδή και 10 από πρόβατα) από 4 κοπάδια συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν για *A. phagocytophilum*, με PCR και έμμεσο ανοσοφθορισμό (IFA). Κανένα από τα δείγματα δεν ήταν θετικό στην PCR. Ο συνολικός επιπολασμός ενάντια στο παθογόνο ήταν 56.8% (29/51), 68% (28/41) στα βοοειδή και 10% (1/10) στα πρόβατα (Chochlakis και λοιποί 2008).

Ο Πίνακας 28 και το Γράφημα 14 απεικονίζουν τις αλληλουχίες των ανιχνευθέντων στελεχών, εκτός από τα στελέχη για τα περιστατικά 4 και 5 για τα οποία γίνεται λόγος παραπάνω, στην Κρήτη και την Κύπρο. Παράλληλα γίνεται σύγκριση με τις αλληλουχίες των ταυτοποιημένων στελεχών σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας στην Κύπρο, με βάση το γονίδιο 16s rRNA.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»



Πίνακας 28: Σύγκριση των αλληλουχιών των ανιχνευθέντων στελεχών *Anaplasma* sp. σε ανθρώπους με τις αντίστοιχες σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας, με βάση το γονίδιο 16s rRNA. Nic: Λευκωσία, Famag: Αμμόχωστος, Lam: Λάρνακα, Paf: Πάφος.



Γράφημα 14: Φυλογενετικό δένδρο σύγκρισης ανθρώπινων στελεχών *Anaplasma* sp. με βάση το γονίδιο 16s rRNA. Οι κωδικοί EU90185 και EU90184 αντιστοιχούν σε στελέχη ζώων της Κύπρου τα οποία στη φυλογένεση που ακολούθησε ταυτοποιήθηκαν ως *Anaplasma ovis*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην Ελλάδα και στην Κύπρο μέχρι τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης οι αναπλαστώσεις ήταν άγνωστες. Στην Ελλάδα, προηγούμενη μελέτη που είχε διεξαχθεί στη Βόρεια Ελλάδα (Daniel και λοιποί 2002) είχε επισημανθεί η παρουσία IgG αντισωμάτων σε υγιείς αγρότες σε ποσοστό 7,3%.

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη τόσο στην Κρήτη όσο και στην Κύπρο, που ασχολήθηκε με την ανθρώπινη κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση, μια νόσο που αναφέρεται την τελευταία 10ετία σε διάφορες χώρες της Ευρώπης. Είναι επίσης η πρώτη μελέτη ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των ειδών των αναπλάσμάτων που κυκλοφορούν σε δυο νησιά της ΝΑ Μεσογείου, και εκτίμησης της διασποράς τους σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές.

Από τα συμπεράσματα προκύπτει ότι τα παθογόνα υπάρχουν και ενδημούν και στα δύο νησιά της Μεσογείου, τόσο στον ανθρώπινο πληθυσμό, όσο και σε ζώα (κτηνοτροφικής σημασίας και άγρια ζώα) και σε κρότωνες.

Η μελέτη περιελάμβανε 2 φάσεις: Η πρώτη φάση της μελέτης (φάση Α) περιελάμβανε οροεπιδημιολογική μελέτη σε αντιπροσωπευτικό δείγμα ανθρώπινου υγιούς πληθυσμού καθώς επίσης και σε ζώα πιθανούς φυσικούς ξενιστές για το *A. phagocytophilum*. Περιελάμβανε επίσης την αναζήτηση και γονοτυπική ανίχνευση *Anaplasma sp.* σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές. Σκοπός της πρώτης φάσης της μελέτης ήταν να προσδιοριστούν ενδημικές περιοχές ή περιοχές με υψηλό βαθμό έκθεσης στο *A. phagocytophilum*, και στο *Anaplasma sp.* Κατά τη δεύτερη φάση της μελέτης (Φάση Β) έγινε ενεργητική και συστηματική αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών και μελέτη της κλινικής εκδήλωσης της νόσου, καθώς και η ανίχνευση *Anaplasma spp.* σε ασθενείς, με επικέντρωση και έμφαση της



προσπάθειας στις περιοχές που είχαν χαρακτηριστεί στην πρώτη φάση ως «υψηλού κινδύνου» (high-risk regions). Όπου ήταν δυνατόν, πραγματοποιήθηκε επίσης αναλυτική επιδημιολογική διερεύνηση του περιβάλλοντος του ασθενούς με σκοπό την καταγραφή και μελέτη πιθανών φυσικών ξενιστών.

Η στρατηγική που ακολουθήθηκε διέφερε στα δυο νησιά (Κρήτη, Κύπρος). Στην περιοχή της Κρήτης, προκειμένου να προσδιοριστεί ο οροεπιπολασμός των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* επελέγησαν δυο διαφορετικές ομάδες υγιούς πληθυσμού: την πρώτη ομάδα αποτέλεσαν τυχαίο στρωματοποιημένο δείγμα αιμοδοτών, ενώ τη δεύτερη ομάδα γενικού υγιούς πληθυσμού αποτέλεσε αντιπροσωπευτικό δείγμα κατοίκων μιας περιοχής με υψηλή και χαμηλή πιθανότητα επαφής με το παθογόνο.

Στην Κύπρο, κατά την πρώτη φάση της μελέτης ακολουθήθηκε διαφορετική στρατηγική: προσδιορίστηκε ο οροεπιπολασμός των αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum*, σε αντιπροσωπευτικό τυχαίο δείγμα ζώων κτηνοτροφικής σημασίας που συλλέχθηκε από φάρμες σε όλη την Κύπρο. Προκειμένου να εκτιμηθεί ο επιπολασμός του παθογόνου στον υγιή ανθρώπινο πληθυσμό, επελέγησαν δυο διαφορετικές ομάδες υγιούς πληθυσμού: η πρώτη ομάδα χαρακτηρίστηκε σαν high-risk (οι συμμετέχοντες ήταν οι ιδιοκτήτες, οι εργαζόμενοι στις φάρμες από τις οποίες ελέγχθηκαν ζώα και οι οικογένειές τους, είτε είχαν κάποιας μορφής επαφή με ζώα κτηνοτροφικής σημασίας και άλλα ζώα ή/και κρότωνες, ψείρες). Η δεύτερη ομάδα χαρακτηρίστηκε σαν «χαμηλού κινδύνου» (low-risk) και περιελάμβανε υγιή πληθυσμό ο οποίος δεν δήλωσε καμία σχέση με αγροτοκτηνοτροφικές εργασίες και ο οποίος κατοικούσε σε περιοχές χαμηλού κινδύνου regions. Ταυτόχρονα, στην πρώτη φάση της μελέτης, αναζητήθηκαν τόσο το *A. phagocytophilum* αλλά και άλλα είδη αναπλάσμάτων (*Anaplasma sp*) σε πιθανά υπόδοχα και μεταβιβαστές. Έγινε

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

γονοτυπική ανίχνευση αναπλάσμάτων, και προσδιορίστηκε ο βαθμός διασποράς τους στους φυσικούς ξενιστές. Και στις δυο περιοχές, το αποτέλεσμα της Α φάσης της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της διασποράς και της γεωγραφικής κατανομής *A. phagocytophilum* αλλά και *Anaplasma sp.* Προσδιορίστηκαν επίσης περιοχές υψηλού κινδύνου (high-risk regions).

Οροεπιδημιολογική μελέτη σε ανθρώπινο γενικό πληθυσμό.

Υγιείς αιμοδότες

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στον επιπολασμό των αντισωμάτων ενάντι 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 κατασκευαστές των εμπορικά διαθέσιμων διαγνωστικών kits (Skarphedinsson και λοιποί 2001; Woessner και λοιποί 2001; Daniel και λοιποί 2002; Groen και λοιποί 2002). Όμως, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συστήνει για οροεπιδημιολογικές μελέτες cut-off point IgG 1/128 (Walder και λοιποί 2003). Στην παρούσα μελέτη προκειμένου να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση του επιπολασμού ως cut-off point θεωρήθηκε ο τίτλος 1/128 για τα G αντισώματα. Με βάση το παραπάνω cut-off, στην ομάδα των αιμοδοτών στην Κρήτη ο οροεπιπολασμός των IgG αντισωμάτων ενάντι του *A. phagocytophilum* προσδιορίστηκε στο 21.4 %. Σε σύγκριση με μελέτες με δείγμα αιμοδοτών σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, η οροθετικότητα στη μελέτη μας ήταν αρκετά υψηλότερη (Bjoersdorff και λοιποί 1999; Hunfeld και Brade 1999). Το παραπάνω εύρημα απαιτεί παραπέρα διερεύνηση, αφού πρόκειται για αιμοδότες. Νεότερα δεδομένα αναφέρουν ότι λόγω της αυξημένης πιθανότητας επιβίωσης του *A. phagocytophilum* στις φιάλες αίματος, ακόμα και μετά την κατάψυξη τους, τα δείγματα αίματος των αιμοδοτών θα πρέπει να ελέγχονται για



αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* (Leiby και λοιποί 2002). Σε προηγούμενες μελέτες αναφέρεται ότι η παρουσία υψηλών IgG αντισωμάτων στους ορούς των αιμοδοτών μπορεί να οφείλεται είτε σε απουσία ενημέρωσης τους για την πιθανότητα μετάδοσης του παθογόνου μετά από έκθεση σε κρότωνες, ή και ακόμα ότι σε ακραίες καταστάσεις μπορεί να αποκρύψουν κρίσιμες πληροφορίες σχετικά με την έκθεσή τους στους κρότωνες (Leiby και λοιποί 2002).

Ο οροεπιπολασμός που καταγράφηκε είναι υψηλότερος ακόμα και από υψηλού κινδύνου ομάδες (κυνηγοί, αγρότες) που έχει καταγραφεί σε άλλες μελέτες (Fingerle και λοιποί 1997; Thomas και λοιποί 1998; Cinco και λοιποί 2004; Stanczak και Grzeszczuk 2006). 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), τη μόλυνση από EBV ή τα αυτοάνοσα νοσήματα (Skarphedinsson και λοιποί 2001).

Από τα εξετασθέντα δείγματα το 8.4% εμφάνισε και IgM αντισώματα παράλληλα με τα IgG αντισώματα. Η παρουσία των IgM αντισωμάτων έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Fingerle και λοιποί 1997). Στο βαθμό που η ανίχνευση των αντισωμάτων αυτών δεν οφείλεται σε cross-reactions, είναι γενικά αποδεκτό ότι μπορούν πιθανόν να θεωρηθούν ασυμπτωματικές λοιμώξεις. Αυτό που δεν είναι σαφές είναι εάν υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της ύπαρξης υψηλών τίτλων αντισωμάτων και της πιθανότητας βακτηριαμίας.

Στην παρούσα μελέτη δεν αποκαλύφθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλων, όπως έχει διαπιστωθεί και από άλλες μελέτες (Thomas και λοιποί 1998; Skarphedinsson και λοιποί 2001).

Η δειγματοληψία και ο έλεγχος στους υγιείς αιμοδοτές διήρκεσε ένα χρόνο. Σε τέτοιου είδους μελέτες, οι περίοδοι του έτους, κατά τη διάρκεια των οποίων πραγματοποιείται η δειγματοληψία, μπορούν να έχουν επιπτώσεις στο τελικό αποτέλεσμα. Λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιήσει τη δειγματοληψία κατά τη διάρκεια ενός έτους (Daniel και λοιποί 2002; Leiby και λοιποί 2002), ενώ αρκετές επικεντρώνονται σε συγκεκριμένους μήνες του έτους (Christova και Dumler 1999; Wittesjo και λοιποί 2001; Groen και λοιποί 2002). Σε κάθε περίπτωση, η κατάλληλη προσοχή πρέπει να δίδεται πάντα για «να μην χαθεί» η περίοδος του έτους (αρχές καλοκαιριού - μέσα φθινοπώρου) όταν αναμένονται να αυξηθούν τα αντισώματα, λόγω της αυξημένης έκθεσης στο παθογόνο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αυξημένη οροθετικότητα καταγράφηκε κατά τη διάρκεια της άνοιξης καθώς επίσης το μήνα Δεκέμβριο.

Η αυξημένη οροθετικότητα που παρατηρείται το Δεκέμβριο ήταν ένα εύρημα της μελέτης που μας απασχόλησε. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η ύπαρξη αρθροπόδου-μεταβιβάστη του παθογόνου, του οποίου ο κύκλος ζωής διαφέρει, από άποψη περιόδου ωρίμανσης, από τους κρότωνα του γένους *Ixodes* που είναι ο γνωστός μεταβιβάστης του *A. phagocytophilum* στην Ευρώπη. Αν αυτή η υπόθεση έχει βάση, η παρουσία ενός τέτοιου μεταβιβάστη θα σήμαινε ότι ωριμάζει κατά τη διάρκεια του Οκτωβρίου, αφού απαιτούνται 2-3 μήνες προτού μια επαφή με έναν κρότωνα να καταγραφεί ορολογικά με υψηλούς τίτλους αντισωμάτων. Πράγματι, σε ένα κρότωνα που ανήκει στο είδος *Hyalomma* και απομακρύθηκε από μία νέα γυναίκα που ζούσε στο Λασιθήι, ανιχνεύτηκε DNA ειδικό των αναπλασμάτων με τη μέθοδο της PCR. Οι κρότωνα αυτού του είδους ωριμάζουν κατά την περίοδο του φθινοπώρου και μπορούν ενδεχομένως να μεταβιβάσουν το βακτηρίδιο μετά από



επαφή με τους ανθρώπους. Εντούτοις, αυτό παραμένει ακόμα μια υπόθεση που μένει να αποδειχθεί.

Η διαμονή ή το επάγγελμα (ενασχόληση) δεν επηρέασε την οροθετικότητα. Το παραπάνω εύρημα έρχεται σε αντίθεση με άλλες μελέτες, στις οποίες έχουν παρατηρηθεί στατιστικά σημαντικές διαφορές (Fingerle και λοιποί 1997; Pusterla και λοιποί 1998; Wittesjo και λοιποί 2001; Cisak και λοιποί 2005). Η εξήγηση για το παραπάνω είναι η ιδιαιτερότητα της διαβίωσης στην Κρήτη. Παρατηρείται εκτεταμένη ενασχόληση με αγροτοκτηνοτροφικές εργασίες ανεξάρτητα από το επάγγελμα ή τη διαμονή. Έτσι, ακόμα και άτομα που ζουν σε αστικές περιοχές έρχονται σε επαφή με ζώα ή/και κρότωνες.

Γενικός υγιής πληθυσμός

Το παραπάνω συμπέρασμα ενισχύθηκε τόσο από τα αποτελέσματα της μελέτης στην Κύπρο. Αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* ανιχνεύθηκαν τόσο στον πληθυσμό ο οποίος δήλωνε ως βασική εργασία την αγροτοκτηνοτροφία και την άμεση επαφή με ζώα, όσο και στον πληθυσμό ο οποίος δήλωνε διαφορετική εργασία ως βασική ενασχόληση. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι το γεγονός ότι πολλοί από όσους δηλώνουν άλλη εργασία, έχουν ως δεύτερη ενασχόληση εργασία που προϋποθέτει επαφή με ζώα (Chochlakis και λοιποί 2008). Παρ' όλα τα παραπάνω, ειδικά για την Κρήτη, υπολογίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του οροεπιπολασμού στον πληθυσμό της περιοχής των Ανωγείων και τον πληθυσμό του νομού Ρεθύμνης. Καθώς ο υγιής πληθυσμός των Ανωγείων είχε συστηματική ενασχόληση με ζώα η πιθανότητα επαφής με το παθογόνο ήταν υψηλότερη, εξηγώντας έτσι και την παραπάνω διαφορά.

Ειδικότερα για τις πληθυσμιακές ομάδες «υψηλού κινδύνου», η οροθετικότητα που καταγράφηκε κυμάνθηκε από 13.4% - 23.5%. Τέτοιες ομάδες οι οποίες συνήθως αποτελούνται από εργαζόμενους στα δάση κι αγροτοκτηνοτρόφους, έχουν μελετηθεί και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, αποκαλύπτοντας οροθετικότητα της τάξης του 17.7% (Fingerle και λοιποί 1997) και 9.6% (Stanczak και Grzeszczuk 2006) σε δύο έρευνες στην Πολωνία, 14% στη Γερμανία (Fingerle και λοιποί 1997), 9% στην Ελβετία (Pusterla και λοιποί 1998), 8.8% στην Ιταλία (Cinco και λοιποί 2004), ή 1.3% στις Κάτω Χώρες (Groen και λοιποί 2002). Ελάχιστοι, αν όχι καθόλου, εκ των συμμετεχόντων σε αυτές τις μελέτες, παρουσίασαν οποιαδήποτε κλινικά συμπτώματα υποδηλωτικά λοίμωξης από το παθογόνο. Άλλες μελέτες (Stanczak και Grzeszczuk 2006) δεν αποκάλυψαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα αντισώματα σε σχέση με το φύλο ή την ηλικία, ενώ στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκε σημαντική διαφορά κατά τη σύγκριση των αντισωμάτων σε σχέση με το φύλο στις ομάδες υψηλού κινδύνου ($p=0.022$).

Η υψηλή οροθετικότητα (21.4 %) στον πληθυσμό της μελέτης μας, με την κυρίαρχη υπαίθρια δραστηριότητα μπορεί να υπονοήσει ότι η επαφή με κρότωνες ή ζώα κτηνοτροφικής σημασίας μπορεί να διαδραματίσει έναν κρίσιμο ρόλο στη διασπορά του παθογόνου μεταξύ των ανθρώπων ανεξαρτητα από το είδος της ενασχόλησης.

Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας.

Στα παραπάνω συνηγορεί και το υψηλό ποσοστό οροθετικότητας στο ζωικό πληθυσμό. Ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum* και στις 5 επαρχίες της Κύπρου (Λευκωσία, Λάρνακα, Λεμεσό, Αμμόχωστο, Πάφο) και στα 3 είδη ζώων που εξετάστηκαν (πρόβατα, αίγες, βοοειδή), πιστοποιώντας έτσι την



ευρεία διασπορά του παθογόνου τόσο στο νησί όσο και στα είδη αυτά των ζώων (Chochlakis και λοιποί 2008). Υψηλότερη οροθετικότητα καταγράφηκε στα βοοειδή (57% με περισσότερο από το 20% των δειγμάτων να έχουν τίτλους IgG αντισωμάτων $\geq 1/400$, 4 φορές υψηλότερο από cut-off που χρησιμοποιήθηκε), και ήταν πολύ υψηλότερη από αυτήν που αναφέρεται σε άλλες μελέτες (Amusatogui και λοιποί 2006).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων με άλλες οροεπιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ευρώπη είναι δύσκολη, αφού οι ζωικοί πληθυσμοί, οι μέθοδοι δοκιμής, τα cut-off points, το δείγμα μελέτης, και ο πληθυσμός ομάδας μελέτης διαφέρουν. Δημοσιευμένες μελέτες σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες αναφέρουν τόσο υψηλά ποσοστά οροθετικότητας στα βοοειδή και τα πρόβατα ενάντι του *A. phagocytophilum* (Stuen και λοιποί 2002; Naranjo και λοιποί 2006), όσο κι ενδιάμεσα (de la Fuente και λοιποί 2005; Torina και λοιποί 2007) ή ακόμα και πολύ χαμηλά (Amusatogui και λοιποί 2006).

Τα αναπλάσματα και ειδικότερα το *A. phagocytophilum* έχουν μελετηθεί στα ζώα κτηνοτροφικής σημασίας σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες καθώς τα πρόβατα, οι αίγες και τα βοοειδή είναι ευαίσθητα σε λοιμώξεις από είδη των παθογόνων αυτών. Πιθανή λοίμωξη μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια βάρους και παραγωγικότητας (Stuen και λοιποί 2002), αμβλώσεις (Garcia-Perez και λοιποί 2003), χαμηλή παραγωγή γάλακτος (Matsumoto και λοιποί 2006) ή ακόμα και το θάνατο (Stuen και λοιποί 2003). Καμία προηγούμενη μελέτη για την αναπλάσμωση στα ζώα κτηνοτροφικής σημασίας δεν έχει διεξαχθεί έως τώρα στην Κύπρο και στην Κρήτη.

Γονοτυπική ανίχνευση αναπλάσμάτων (*Anaplasma sp.*) σε κτηνοτροφικής σημασίας και άγρια ζώα.

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

Anaplasma sp. DNA ανιχνεύτηκε σε 56% των pools από αίγες και σε 51% των pools από πρόβατα. Θετικά δείγματα βρέθηκαν, με εξαίρεση τα πρόβατα της Λεμεσού, σε όλες τις επαρχίες επιβεβαιώνοντας τον ορολογικό έλεγχο. Τα αποτελέσματα στα αιγοπρόβατα συμφωνούν με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών σε άλλες χώρες (Petrovec και λοιποί 2003; Naranjo και λοιποί 2006). Η μη ανίχνευση αναπλάσμάτων στα βοοειδή έρχεται σε αντιδιαστολή με άλλες μελέτες (Cao και λοιποί 2006) και μπορεί να απεικονίζει την απουσία ανιχνεύσιμων επιπέδων DNA του *A. marginale* (Rajput και λοιποί 2005; Cao και λοιποί 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* (Pinyoosong και λοιποί 2008), (Aguirre και λοιποί 2006), (Inokuma και λοιποί 2002), και ανιχνεύθηκε μόνο στη Λευκωσία. Ο γενότυπος 6, παρουσίασε 100% ομοιότητα με ήδη δημοσιευμένα στελέχη του *A. phagocytophilum* ((Zhan και λοιποί 2007), (Cao και λοιποί 2006), Reeves 2006), και ανιχνεύθηκε μόνο στη Λεμεσό (όπου καταγράφηκε περιστατικό ανθρώπινης αναπλάσμωσης). 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 λοιποί 1997), προκαλώντας την κυνοειδή ερλιχίωση. Οι γενότυποι 1, 3, 4, 5, παρουσίασαν 100%



ομοιότητα με δημοσιευμένα στελέχη των αναπλάσμάτων (AJ633052, AJ633051, AJ633048 (Liu και λοιποί 2005), AF414869, AF414875 (Lew και λοιποί 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 αναπλάσμάτων (de la Fuente και λοιποί 2002; de la Fuente και λοιποί 2005; de la Fuente και λοιποί 2005; de la Fuente και λοιποί 2007) (Lew και λοιποί 2003). Η φυλογενετική ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη στελεχών του *A. ovis*. Όπως θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω, στέλεχος *A. ovis* με μεγάλη ομολογία (σχεδόν ταυτόσημα) μ' εκείνα που ανιχνεύτηκαν σε ζώα, ανιχνεύτηκε επίσης δυο ασθενείς (1 από Κύπρο και 1 από Κρήτη).

Στην Κρήτη (Ανώγεια), *Anaplasma sp* DNA ανιχνεύθηκε σε όλα τα pools αίματος των προβάτων τα οποία ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR. Καθώς το κάθε pool αντιστοιχούσε σε ξεχωριστό κοπάδι, η ανίχνευση του παθογόνου σε τόσο μεγάλο ποσοστό υποδεικνύει υψηλό βαθμό διασποράς του παθογόνου και μεγάλη πιθανότητα έκθεσης στα αναπλάσματα.

Είναι ενδιαφέρον ότι τα ζώα ή τα κοπάδια που παρουσιάζουν υψηλό επιπολασμό ή/και θετικό PCR δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε κλινικά σημεία λοίμωξης, κάτι που έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Rajput και λοιποί 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. Παρ' όλ' 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 λοιποί 1990; Palmer και λοιποί 1998).

Όσον αφορά στα σκυλιά, δεν ανιχνεύτηκε *Anaplasma sp.* DNA στο είδος αυτό των ζώων. Η *Ehrlichia canis* είναι το είδος της οικογένειας που προσβάλλει τα σκυλιά, αν και λιγοστές έρευνες έχουν αναφέρει την παρουσία αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* σε σκυλιά, με μεγάλη όμως την πιθανότητα να πρόκειται για διασταυρούμενες αντιδράσεις (Solano-Gallego και λοιποί 2006; Jensen και λοιποί 2007). Τα ζώα αυτά φιλοξενούν συνήθως ένα μεγάλο αριθμό εκτοπαρασίτων και αποτελούν σημαντικότερο κρίκο στην αλυσίδα μετάδοσης πολλών ζωνοδόσων. Όπως αναφέρεται παρακάτω, *Anaplasma sp.* DNA βρέθηκε στον κοινό κρότωνα των σκυλιών, τον *R. Sanguineus*.

Anaplasma sp. DNA ανιχνεύθηκε στο 9% (7/74), των αγρινών που ελέχθηκαν, ποσοστό σημαντικά χαμηλότερο από τα αντίστοιχα ποσοστά για τις αίγες και τα πρόβατα. Παρ' όλα αυτά το ποσοστό αυτό είναι αρκετά υψηλό έτσι ώστε να μπορούμε να προσδιορίσουμε και τα αγρινά ως φυσικούς 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) (Shackleton και λοιποί., 1997). 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 λοιποί 1993; Krause και λοιποί 1996; Hofle και λοιποί 2004; Hofmann-Lehmann και λοιποί 2004).

Anaplasma sp. DNA ανιχνεύθηκε επίσης και σε άλλα άγρια θηλαστικά τα οποία μελετήθηκαν (λαγός, αλεπού). 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 λοιποί 2004) όσο και ειδών των αναπλασμάτων (Pusterla και λοιποί 1999; Groen και λοιποί 2002; Yabsley και λοιποί 2006) και στα είδη των ζώων. Τα θηλαστικά αυτά θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση του *A. phagocytophilum* στις αλυσίδα των άγριων ζώων καθώς και τη διασπορά τους σε ζώα κτηνοτροφικής σημασίας 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. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη διασπορά από τα μεταναστευτικά πουλιά διαφόρων ζωνοσόων, 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 ζωνοσόων 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 δυνάμει μεταφορείς παθογόνων από το ένα μέρος στο άλλο ή/και από χώρα σε χώρα (Bjoersdorff και λοιποί 2001).

Αξιίζει 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 διαχείμανση 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.

Γονοτυπική ανίχνευση αναπλάσμάτων (*Anaplasma sp.*) σε αρθρόποδα – μεταβιβαστές.

Σε αρθρόποδα πιθανούς ξενιστές αναζητήθηκαν στην Ελλάδα και την Κύπρο το *A. phagocytophilum* αλλά και άλλα είδη αναπλάσμάτων (*Anaplasma sp.*), 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. ventralloii*. Η παρουσία αναπλάσμάτων 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 σκυλιά, 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 στον ψύλλο *C. felis* και στα δύο είδη ζώων. Επιπλέον *Anaplasma sp.* DNA βρέθηκε και σε κρότωνα του είδους *R. sanguineus* και *I. ventralloii*, που αφαιρέθηκαν από λαγούς. *Anaplasma sp.* DNA δεν βρέθηκε στα εκτοπαράσιτα των πουλιών, αν και θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν το μικρό ποσοστό παρασιτισμού τους, γεγονός το οποίο έχει καταγραφεί και σε άλλες μελέτες (Alekseen και λοιποί 2001).

Σε αντίθεση με την Κύπρο, στην Κρήτη (Ανώγεια), παρά το γεγονός ότι DNA των αναπλασμάτων ανιχνεύθηκε σε όλα τα rools των ζώων που εξετάστηκαν με τη μέθοδο της PCR, δεν συνέβη το ίδιο και με τους κρότωνα. Αυτό μπορεί να οφείλεται, είτε στο μειωμένο αριθμό κροτώνων που ελέγχθηκε, είτε στην περιορισμένη ποικιλομορφία τους (3 είδη μόνο, εκ των οποίων το 93,5% ανήκε στο είδος *R. bursa*), είτε στην εποχή κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η συλλογή. Θα πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι σε καμία μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί στην Κρήτη δεν έχει βρεθεί ο κρότωνα του είδους *I. ricinus*. Η παρουσία όμως περιστατικών με λοίμωξη από *A. phagocytophilum* προβληματίζει και πιθανόν εστιάζει το ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση του ενδεχόμενου ύπαρξης ενός άλλου

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

είδους κρότωνα που θα μπορούσε πιθανόν να λειτουργεί ως μεταβιβαστής του παθογόνου.

Σύμφωνα με τελευταίες μελέτες, το *A. phagocytophilum* φαίνεται να έχει ευρεία διασπορά σε όλη την περιοχή της Μεσογείου. Έχει βρεθεί στην Τυνησία, το Μαρόκο (Sarih και λοιποί 2005) και στη Βουλγαρία (Christova και λοιποί 2003) σε κρότωνα του είδους *I. ricinus*. Όμως, 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 λοιποί 2006) και στην Αλβανία (*R. bursa*, *R. sanguineus*) (Christova και λοιποί 2003).

Με βάση τις δημοσιευμένες εργασίες, ο Sarih με την ομάδα του (Sarih και λοιποί 2005) και ο Georges με την ομάδα του (Georges και λοιποί 2001) απέτυχαν να καταδείξουν την παρουσία του παθογόνου σε κρότωνα του είδους *H. sulcata* και *R. sanguineus*. Αντιθέτως, σε αυτές τις μελέτες, όπως και στην παρούσα, δεν καταγράφηκε παρουσία των αναπλασμάτων σε κρότωνα του είδους *H. m. marginatum* και *H. punctata*. Αντίθετα, ο de la Fuente (De La Fuente και λοιποί 2004) ανέφερε την παρουσία *A. phagocytophilum* και *A. marginale* σε κρότωνα του είδους *H. m. marginatum*, και *R. bursa*, προτείνοντας έναν πιθανό ρόλο αυτών των ειδών κροτώνων στη διατήρηση των αναπλασμάτων στην άγρια φύση και τη μετάδοσή τους σε κατοικίδια ζώα. Ο Loftis (Loftis και λοιποί 2006), επίσης, ανέφερε την παρουσία του *A. marginale* σε κρότωνα του είδους *H. anatolicum excavatum* και *R. sanguineus* που είχαν αφαιρεθεί από βοοειδή.

Μελέτη κλινικών περιστατικών αναπλάσματος.

Κατά τη δεύτερη φάση της μελέτης έγινε ενεργητική και συστηματική αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών και μελέτη της κλινικής εκδήλωσης της νόσου,



καθώς και η ανίχνευση *Anaplasma spp.* σε ασθενείς, με επικέντρωση και έμφαση της προσπάθειας στις περιοχές που είχαν χαρακτηριστεί στην πρώτη φάση ως περιοχές «υψηλού κινδύνου». Όπου ήταν δυνατόν, πραγματοποιήθηκε επίσης, αναλυτική επιδημιολογική διερεύνηση του περιβάλλοντος του ασθενούς με σκοπό την καταγραφή και μελέτη πιθανών φυσικών ξενιστών.

Με την ολοκλήρωση της πρώτης φάσης της μελέτης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ακολούθησε ενημέρωση των ιατρών και των ιατρικών συλλόγων. Στις ημερίδες που οργανώθηκαν για το σκοπό αυτό, παρατέθηκαν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με επίκεντρο στη γεωγραφική διασπορά των στελεχών των αναπλάσμάτων αλλά και στην ύπαρξη περιοχών με αυξημένη οροθετικότητα έναντι του *A. phagocytophilum*. Ιδιαίτερα για τον τελευταίο παράγοντα, επιστήθηκε η προσοχή στους κλινικούς καθώς μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην υπόλοιπη Ευρώπη αναδεικνύουν την ύπαρξη περιστατικών ανθρώπινης αναπλάσμωσης. Η ενημέρωση των ιατρών αποτέλεσε και το έναυσμα για τη συστηματικότερη μελέτη ανθρώπινων δειγμάτων ύποπτων για λοίμωξη από το παθογόνο.

Συνολικά, καταγράφηκαν 12 περιστατικά λοίμωξης από *A. phagocytophilum* ή αναπλάσματα, 6 σε κάθε νησί. Για πρώτη φορά στην Κύπρο, ανιχνεύτηκε σε ασθενείς το *A. phagocytophilum* αλλά και *A. ovis*.

Η διάγνωση των έγινε με βάση τα κριτήρια που έχουν οριστεί για την διάγνωση λοίμωξης από το *A. phagocytophilum*, τα οποία είναι:

- 1) Πυρετός ιστορικό δήγματος από κρότωνα ή έκθεση σε κρότωνες, **και** 2) επιβεβαίωση της λοίμωξης με τετραπλασιασμό των αντισωμάτων, **ή** 3) θετική PCR στο αίμα, **ή** 4) Απομόνωση του παθογόνου στην καλλιέργεια (http://www.cdc.gov/ncphi/disss/nndss/casedef/ehrlichiosis_2008.htm).

Τα περιστατικά που περιγράφηκαν ήταν τα πρώτα τόσο στην Ελλάδα όσο και στην Κύπρο. Και στα δύο νησιά, έχουν αναφερθεί άλλα κροτωνο-μεταδιδόμενα νοσήματα και έχουν προσδιοριστεί διάφορα είδη κροτώνων που ενδημούν στην Ελλάδα και στην Κύπρο (Psaroulaki και λοιποί 2005; Psaroulaki και λοιποί 2006). Εντούτοις, κρότωνες του είδους *I. ricinus* – που θεωρούνται ως οι κύριοι μεταβιβαστές του παθογόνου στην Ευρώπη (Parola και λοιποί 2005) δεν έχουν περιγραφεί ούτε στην Κρήτη ούτε στην Κύπρο.

Η πρώτη περιγραφή της ανθρώπινης κοκιοκυτταρικής αναπλάσμωσης (HGA) σε άνθρωπο έγινε στις ΗΠΑ το 1994 (Chen και λοιποί 1994), ενώ το πρώτο επιβεβαιωμένο περιστατικό στην Ευρώπη περιγράφηκε στη Σλοβενία το 1997 (Petronec και λοιποί 1997). Από τότε, πάνω από 20 περιπτώσεις εργαστηρικά επιβεβαιωμένες μελέτες έχουν καταγραφεί σε όλη την Ευρώπη, όπως στην Ολλανδία, στη Σουηδία, στη Σλοβενία, στην Ισπανία, στην Αυστρία, στην Πολωνία και στη Γαλλία (Brouqui και λοιποί 2004). Η αναπλάσμωση είναι μία λοίμωξη που χαρακτηρίζεται από μη τυπικά συμπτώματα όπως ο πυρετός, το ρίγος, ο πονοκέφαλος και ο μυαλγίες. Η λευκοπενία με αριστερή μετατόπιση, η θρομβοπενία και οι αυξημένες τιμές στα ηπατικά ένζυμα έχουν καταγραφεί στην πλειοψηφία των ασθενών. Η λοίμωξη μπορεί να είναι βαριάς μορφής, με σχεδόν τους μισούς από τους ασθενείς να χρήζουν νοσηλείας (Bakken και Dumler 2006). Η διάγνωση βασίζεται στον ορολογικό έλεγχο αλλά και σε θετική PCR ειδικά κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της λοίμωξης, όταν τα αντισώματα δεν είναι ανιχνεύσιμα ακόμα (Dumler και λοιποί 2007). Η συνιστώμενη θεραπεία για τους ενήλικες είναι δοξκυκλίνη 200 mg ημερησίως (Bakken και Dumler 2006).



Συγκρίνοντας τις κλινικές εκδηλώσεις των 12 περιστατικών της παρούσας μελέτης, διάφορα κοινά παθολογικά ευρήματα (σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια και αυξημένα ηπατικά ένζυμα) μπορούν να περιγραφούν σε μερικά αλλά όχι όλα τα περιστατικά. Εξάνθημα δεν παρατηρήθηκε σε όλα τα περιστατικά. Όσον αφορά στην απουσία αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* μπορεί, εν μέρει, να εξηγηθεί από την παρατεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών. Σε άλλη μελέτη (Young και Klein 2007) καταγράφηκε πλήρης απουσία αντισωμάτων, παρά την παρουσία θετικής PCR, μέχρι κι έξι μήνες μετά από την εισαγωγή σε νοσοκομείο (ο ασθενής απυρέτησε αμέσως μετά από τη χορήγηση δοξκυκλίνης). Παρουσία θετικής PCR του *16s rRNA* γονιδίου, μαζί με απουσία οποιωνδήποτε αντισωμάτων έχει επίσης αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Lotric-Furlan και λοιποί 1998). Από τα περιστατικά που καταγράφηκαν αυτά που προκάλεσαν μεγαλύτερο ενδιαφέρον ήταν αυτά στα οποία η λοίμωξη από *A. phagocytophilum* συνυπήρχε με λοίμωξη από άλλο παθογόνο οργανισμό (EBV, *R. conorii*), επιβεβαιώνοντας άλλες μελέτες που ισχυρίζονται ότι τέτοιας φύσεως συν-λοιμώξεις δεν είναι σπάνιες.

Συνολικά 16 ανθρώπινες περιπτώσεις αναπλάσμωσης, συμπεριλαμβανομένων των 12 περιστατικών της παρούσας μελέτης, έχουν περιγραφεί στις Μεσογειακές χώρες (Ισπανία, την Ιταλία και το Ισραήλ) (Oteo και λοιποί 2000; de la Fuente και λοιποί 2005; Garcia και λοιποί 2006; Keysary και λοιποί 2007) (Πίνακας 8). Η πλειοψηφία των περιστατικών ήταν ενήλικες κάτω των 25 ετών, ενώ 5 από τις περιπτώσεις καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της άνοιξης και οι υπόλοιπες στο τέλος του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου. Τα σημεία και τα συμπτώματα που καταγράφονται δεν φαίνονται να σχετίζονται με την ηλικία και τον μήνα. Επίμονος υψηλός πυρετός ήταν πάντοτε παρών και συνοδευόταν από υψηλούς τίτλους ενζύμων, λευκοπενία και θρομβοπενία. Διαγνωστικοί τίτλοι δεν ανιχνεύθηκαν σε όλα

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

τα περιστατικά (ανιχνεύθηκαν σε 10/16 περιστατικά) επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι θετική PCR δεν ακολουθείται πάντα από αυξημένα αντισώματα. Η δοξκυκλίνη είναι το φάρμακο εκλογής που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις καταγεγραμμένες περιπτώσεις. Γενικά, φαίνεται απίθανο διαφορετικά στελέχη να οδηγήσουν σε διαφορές στα κλινικά και εργαστηριακά συμπεράσματα. Αντιθέτως, η υπόθεση ότι λοίμωξη από το *A. phagocytophilum* συνήθως δεν οδηγεί σε συγκεκριμένα συμπτώματα ή εργαστηριακά αποτελέσματα, επιβεβαιώνεται.

Η απουσία καταγεγραμμένων περιπτώσεων στο υπόλοιπο των χωρών δεν αποκλείει την παρουσία του παθογόνου σε αυτές τις περιοχές, καθ' ότι, οροεπιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλες χώρες της νοτιοδυτικής Ευρώπης έχουν καταγράψει αντισώματα ενάντια στο παθογόνο (Βουλγαρία (9%) (Christova και Dumler 1999), Τουρκία (8%) (Ongut και λοιποί 2006).

Καταγράφηκε η πρώτη περίπτωση λοίμωξης από *A. phagocytophilum* με ταυτόχρονη εκδήλωση της νόσου του Kawasaki. Η νόσος του Kawasaki (KD) που περιγράφηκε αρχικά και αναφέρθηκε από τον Tomisaku Kawasaki το 1967 (Kawasaki 1967), προκαλεί οξεία εμπύρετη πολυοργανική αγγειίτιδα (acute febrile multisystem vasculitis) και σχεδόν αποκλειστικά προσβάλλει τα νήπια και τα μικρά παιδιά. Η διάγνωση της νόσου τίθεται με την παρουσία πυρετού για 5 ημέρες καθώς και την παρουσία τεσσάρων από τα παρακάτω πέντε κριτήρια: 1) Αμφοτερόπλευρη προσβολή επιπεφυκότων, 2) Αλλαγές του βλενογόνου της ανώτερης αναπνευστικής οδού: ερυθρότητα φάρυγγα, έντονα ερυθρά χείλη, γλώσσα με χρώμα «σαν φράουλα», 3) Αλλοιώσεις στα άκρα: περιφερειακά οιδήματα με συνοδό ερύθημα, περιονυχιακή αποφολίδωση (periungual desquamation), 4) Πολύμορφα εξανθήματα, 5) Αυχενική λεμφαδενοπάθεια (Burns και λοιποί 2000). Όσον αφορά τη θεραπεία της νόσου, το



1988 η Επιτροπή των μολυσματικών νοσημάτων της αμερικανικής ακαδημίας παιδιατρικής καθιέρωσε τη θεραπεία IVIG ως τη συνιστώμενη θεραπεία για παιδιά με οξύ KD (Pediatrics 1988).

Η αιτία της νόσου KD παραμένει άγνωστη αν και οι πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι έκθεση σε έναν μολυσματικό παράγοντα σε ένα παιδί με γενετική προδιάθεση απαιτείται για την παθογένεση της KD. Υποτίθεται ότι μία μη ειδική ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλείται από διάφορους παράγοντες μπορεί να αποτελέσει την οδό για την εκδήλωση της ασθένειας. Η υπόθεση της εμπλοκής ενός μολυσματικού παράγοντα βασίζεται σε διάφορες παρατηρήσεις, μεταξύ των οποίων, η εποχιακή κατανομή (αύξηση κρουσμάτων τους μήνες χειμώνα/άνοιξη στις περισσότερες γεωγραφικές περιοχές), η καταγραφή σε ορισμένες ομάδες ηλικίας με σπάνιες περιπτώσεις σε νήπια και σε ενήλικους, προτείνοντας έναν ρόλο για τα διαπλακουντικά αντισώματα που παρέχουν προστασία, καθώς και η ομοιότητα πολλών από τα κλινικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της KD με άλλες μολυσματικές ασθένειες (Rowley και Shulman 1998). Η γενική ιδέα είναι ότι οι βακτηριακές τοξίνες ενεργούν ως υπερ-αντιγόνα (superantigens) που μπορούν να προκαλέσουν έναν καταρράκτη των γεγονότων που οδηγούν τελικά σε KD. Προσπάθειες έχουν γίνει για να εμπλακούν βακτηριακοί παράγοντες όπως οι Μπαρτονέλλες, τα Αναπλάσματα (Rathore και λοιποί 1993), η *C. burnetii*, η *R. conorii* και η *R. typhi* (Kafetzis και λοιποί 2001). Μέχρι την καταγραφή του περιστατικού της παρούσας μελέτης, κανένας συγκεκριμένος μικροοργανισμός δεν είχε ανιχνευθεί με συνέπεια η ανωτέρω υπόθεση να είναι υπό αμφισβήτηση.

Στην παρούσα μελέτη καταγράφηκε, επίσης για πρώτη φορά, περιστατικό λοίμωξης από *A. onis* σε άνθρωπο. Μέχρι σήμερα εθεωρείτο ότι μονάχα το *A. phagocytophilum* μπορεί να προσβάλλει τον άνθρωπο, ενώ το *A. onis* μπορεί να προσβάλλει μόνο τα

ζώα. Αυτή είναι πρώτη καταγραφή 100% ομοιότητας μεταξύ ακολουθιών των αναπλασμάτων που ανιχνεύθηκαν σε αίγες, πρόβατα και μία ασθενή, όλοι προερχόμενοι από την ίδια περιοχή.

Για την περαιτέρω μελέτη του εν λόγω περιστατικού, εξετάσθηκαν τα γονίδια *msp4* και *groEL*. Οι πρωτεΐνες επιφανείας (MSPs), MSP1a, MSP2 και MSP4 (συντηρημένες εξωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες) (Molad και λοιποί 2004) χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας (de la Fuente και λοιποί 2005). Μελετήθηκε επίσης το γονίδιο *groEL* που εκφράζει την heat shock protein 60 (HSP60) η οποία βρίσκεται σε αφθονία στα περισσότερα βακτηρίδια (Karlin και Brocchieri 2000). Από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε δε μπορεί να καταστεί σαφές εάν δομικές ή λειτουργικές αλλαγές στις πρωτεΐνες ή ακόμα και υπερέκφραση ή αναστολή της έκφρασης τους παρέχουν τη δυνατότητα στο *A. ovis* να μολύνει έναν άνθρωπο. Τέτοια ερωτήματα μπορούν να απαντηθούν μέσω της πρωτεομικής ανάλυσης.

Συγκρίνοντας το περιστατικό με δημοσιευμένα ανθρώπινα περιστατικά λοίμωξης από *A. phagocytophilum* (Dumler και λοιποί 2005) βρέθηκε ότι η ηπατοσπληνομεγαλία, η λεμφαδενοπάθεια και η αναιμία συνήθως απουσιάζουν από λοιμώξεις από *A. phagocytophilum*. Αντίθετα, κοινά στοιχεία ήταν η λευκοπενία και οι αυξημένοι τίτλοι των ηπατικών ενζύμων. Σε ότι αφορά τους τίτλους αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum* που ανιχνεύθηκαν, η παρουσία τους μπορεί να εξηγηθεί από τις διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των μεμβρανικών πρωτεϊνών των αναπλασμάτων (Palmer και λοιποί 1998).

Αναφορικά με τη θεραπεία, αξίζει να σημειωθεί ότι λοίμωξη από *A. phagocytophilum* υποχωρεί συνήθως μετά από χορήγηση δοξυκυκλίνης για τέσσερις ημέρες (Bakken και Dumler 2006), ενώ στην περίπτωση μας η ασθενής πήρε εξιτήριο 11 ημέρες μετά



από την εισαγωγή στο νοσοκομείο, χωρίς ωστόσο από αυτό μόνο το περιστατικό να μπορούν να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα σχετικά με τη οξύτητα και τη διάρκεια της νόσου.

Προηγούμενες μελέτες (Petrovec και λοιποί 1999) έχουν περιγράψει απόλυτη ομοιότητα μεταξύ ακολουθιών των αναπλάσμάτων, που προέρχονται από κρότωνα του είδους *I. ricinus*, και των ασθενών.

Η παρουσία του κρότωνα *I. ricinus* που θεωρείται ο μεταβιβαστής του *A. phagocytophilum*, (Parola και λοιποί 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.

Ταυτοποίηση και σύγκριση των αναπλάσμάτων που ανιχνεύτηκαν σε πιθανά υπόδοχα, μεταβιβαστές, ασθενείς.

Πραγματοποιήθηκε μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση των κρουσμάτων αναπλάσματος που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης. Ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν στελέχη που ανιχνεύτηκαν σε όλους τους παράγοντες της αλυσίδας μετάδοσης (πιθανά υπόδοχα, μεταβιβαστές, ασθενείς). Τα στελέχη συγκρίθηκαν με τη χρήση μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης.

Για πρώτη φορά στο αίμα ασθενούς στην Κύπρο, ανιχνεύτηκε και χαρακτηρίστηκε με μεθόδους μοριακής βιολογίας (PCR-sequencing analysis) ένα strain του είδους *Anaplasma ovis*. Κατά τη μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση του παραπάνω κρούσματος, το ίδιο strain επίσης ανιχνεύτηκε και χαρακτηρίστηκε με τις ίδιες μεθόδους σε αιγοπρόβατα, στην περιοχή κατοικίας της ασθενούς.

Η αλληλουχία που προέκυψε μετά από το γενωμικό πολλαπλασιασμό του γονιδίου *msp4* αποκάλυψε 99% ομοιότητα με στελέχη *A. ovis* που έχουν αναφερθεί σε ζώα στην Ουγγαρία και την Ιταλία. Επίσης η αλληλουχία του γονιδίου *groEL* αποκάλυψε 98% ομοιότητα με το στέλεχος *A. ovis* isolate OVI (AF441131). Οι αλληλουχίες των βάσεων του DNA των προϊόντων του γενωμικού πολλαπλασιασμού εμφάνισαν 100% ομοιότητα μεταξύ τους, αλλά και με τις αλληλουχίες που ανιχνεύθηκαν στην ασθενή.

Το *A. ovis* μέχρι σήμερα θεωρείται ότι μολύνει μόνο τα ζώα. Η καταγραφή ανθρώπινου περιστατικού με λοίμωξη από *A. ovis* αλλάζει τα δεδομένα και δημιουργεί νέα ερωτήματα για την επιδημιολογία και την παθογένεια των αναπλάσμάτων που θα πρέπει να είναι το αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.

Σε ασθενή από την περιοχή των Χανίων ανιχνεύτηκε το πρώτο στέλεχος αναπλάσματος στην Ελλάδα. Συγκρίνοντας τα 2 στελέχη πιστοποιήθηκε η μεγάλη ομολογία με στέλεχος *A. ovis* καθώς και με τα στελέχη που ανιχνεύθηκαν στην Κύπρο. Θα πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι για υπόλοιπους τους ασθενείς, εκτός από το περιστατικό μόλυνσης με *A. ovis*, δε κατέστη δυνατή η διερεύνηση με παραπάνω από ένα γονίδια (*16s rRNA*) κατά συνέπεια δε μπορούμε να στοιχειοθετήσουμε με απόλυτη σιγουριά την ύπαρξη στελεχών *A. ovis* και στους ασθενείς αυτούς.



Όσον αφορά στα αιγοπρόβατα, ανιχνεύτηκαν και χαρακτηρίστηκαν με PCR-sequencing analysis τα παρακάτω είδη: *A. phagocytophilum* (accession number EU090186), *A. platys* (EU090182) και *Anaplasma* sp. (EU090181, EU090183, EU090184, EU090185).

Τα είδη των αναπλάσμάτων μπορούν να διαφοροποιηθούν μελετώντας το γονίδιο *msp4* και την πρωτεϊνική ακολουθία του, όπως έχει ήδη περιγραφεί (de la Fuente και λοιποί 2002; de la Fuente και λοιποί 2005; de la Fuente και λοιποί 2005; de la Fuente και λοιποί 2007). Στις φυλογενετικές μελέτες χρησιμοποιούνται επίσης τα γονίδια 16S rDNA και *groEL*, ώστε να επιτευχθεί διάκριση μεταξύ των ειδών των αναπλάσμάτων (Lew και λοιποί 2003). Έχει επίσης αναφερθεί ότι, οι γενότυποι του γονιδίου *msp4* θα μπορούσαν να αναδείξουν την ετερογένεια μεταξύ γεωγραφικών περιοχών, ξενιστών και ίσως μεταξύ των στελεχών του ίδιου κοπαδιού (de la Fuente και λοιποί 2007; Hornok και λοιποί 2007). Παρόμοια συμπεράσματα έχουν εξαχθεί για το γονίδιο *groEL* του *A. onis* που έχει βρεθεί να έχει πολύ υψηλότερη ετερογένεια έναντι των αντίστοιχων γονιδίων για τα *A. marginale* και *A. centrale*. Επιπλέον, προηγούμενες έρευνες σε απομονώσεις του *A. marginale* απέδειξαν ότι, η ανάλυση των γονιδίων *MSP1a* και *MSP4* και των πρωτεϊνικών ακολουθιών τους θα μπορούσαν να αναδείξουν φυλογενετικές πληροφορίες (de la Fuente και λοιποί 2001). Στην περίπτωση της Κύπρου, όπου οι ανταλλαγές ζώων μεταξύ κτηνοτρόφων διαφορετικών περιοχών είναι πολύ συχνές, τέτοιες πληροφορίες δε θα μπορούσαν να εξαχθούν.

Δοκιμάστηκε και προτείνεται η χρήση της μεθόδου RFLP για την ταυτοποίηση στελεχών αναπλάσμάτων, άλλων πλην του *A. phagocytophilum*. Με τη χρήση των γονιδίων *groEL* και *msp4* και τα περιοριστικά ένζυμα *HaeIII* και *ApoI*

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

δημιουργήθηκε ένας αλγόριθμος για την ταυτοποίηση και τη διάκριση των *A. ovis*, *A. centrale* και *A. marginale*.

Η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών των ζώων που αντιστοιχούσαν σε *Anaplasma* sp. ανέδειξε την ύπαρξη στελεχών του *A. ovis*. Στην περίπτωση του γονιδίου *msp4*, οι ακολουθίες FJ460445, FJ460447, FJ460453 και FJ460455 (απομονωμένες από αίγες) και οι ακολουθίες FJ460448, FJ460449, FJ460451 και FJ460452 (απομονωμένες από πρόβατα) ομαδοποιήθηκαν λόγω των μεταλλαγών σε σημεία τα οποία αντιστοιχούν σε περιοχές που καθορίζουν την parsimony. Σε όλες τις ακολουθίες, εκτός από μία (FJ460448), που ανιχνεύθηκαν στα πρόβατα περιλαμβάνεται μία κυτοσίνη στις 470 βάσεις, η οποία καταγράφεται μόνο στο στέλεχος *A. ovis* Ιταλία 147.

Η φυλογενετική ανάλυση με βάση το γονίδιο *groEL* ομαδοποίησε τις αλληλουχίες FJ460437, FJ460438, FJ460439 ΚΑΙ FJ460440 βασιζόμενη κι αυτή σε περιοχές που καθορίζουν την parsimony. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι και το γονίδιο *groEL* μπορεί να ποικίλει μεταξύ των στελεχών όπως έχει ήδη υποστηριχθεί για το γονίδιο *msp4* (de la Fuente και λοιποί 2007).

Συνολικά, και στα δύο γονίδια, αποκαλύφθηκαν 14 σιωπηλές μεταλλάξεις (11 στο *msp4* και 3 στο *groEL*). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα αρχικά αμινοξέα αντικαταστάθηκαν από άλλα με παρόμοιες ιδιότητες ενώ σε λιγότερες περιπτώσεις ένα μη πολικό αμινοξύ αντικαταστάθηκε από ένα πολικό αμινοξύ, αρνητικά ή θετικά φορτισμένο, και αντίστροφα. Η ύπαρξη μηχανισμών εξέλιξης και γενετικής ποικιλομορφίας στα είδη των αναπλασμάτων είναι προφανής.



Συμπεράσματα

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που ασχολήθηκε με την ανίχνευση του παθογόνου της ανθρώπινης κοκκιοκυτταρικής αναπλάσμωσης και των αναπλασμάτων γενικότερα τόσο στην Κρήτη όσο και στην Κύπρο.

Από τα συμπεράσματα προκύπτει ότι τα παθογόνα υπάρχουν και ευδοκιμούν και στα δύο νησιά της Μεσογείου, τόσο στον ανθρώπινο πληθυσμό, όσο και σε ζώα (κτηνοτροφικής σημασίας και μη) και σε κρότωνες. 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 γενικότερα.

Δεν ανιχνεύθηκε *A. phacogycophilum* σε κάποιο είδος κρότωνα, αν και θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία του κρότωνα *I. ricinus* ήταν ελάχιστη στην Κύπρο ενώ στην Κρήτη δεν ανιχνεύθηκε καθόλου. Η πιθανότητα το παθογόνο να μεταδίδεται με άλλο είδος κρότωνα θα πρέπει να εξετασθεί.

Η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη αναφορά, σε παγκόσμιο επίπεδο, λοίμωξης ανθρώπου από στέλεχος του *A. onis* που μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι μολύνει μονάχα ζώα. Για πρώτη φορά αναφέρθηκαν περιστατικά λοίμωξης από *Anaplasma* spp και *A. phacogycophilum* στην Κρήτη και στην Κύπρο. Για πρώτη φορά, σε παγκόσμιο επίπεδο, αναφέρθηκε λοίμωξη από *A. phacogycophilum* με ταυτόχρονη νόσο του Kawasaki.

Οι κλινικοί γιατροί θα πρέπει πάντα να έχουν στην άκρη του μυαλού τους την περίπτωση πιθανής λοίμωξης από *A. phacogycophilum* ή αναπλάσματα σε ασθενείς με επιδημιολογικό ιστορικό κατοικίας σε αγροτικές περιοχές ή/και επαφής με κρότωνες.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλασμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

Η παρουσία DNA των αναπλασμάτων σε κρότωναes που συλλέχθηκαν από άγρια ζώα, κατέδειξε έναν ενεργό ρόλο στη διατήρηση αυτών των παθογόνων στους άγριους και περιαστικούς (peridomestic) κύκλους. Παρ' όλα αυτά, με βάση τα στοιχεία που αναφέρονται στην παρούσα μελέτη δε μπορεί να καθοριστεί εάν αυτοί οι κρότωναes θα μπορούσαν να ενεργήσουν και ως μεταβιβαστές των αναπλασμάτων ή απλά μολύνθηκαν κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος από ένα μολυσμένο ζώο και άρα λειτουργούν ως απλοί ξενιστές των παθογόνων.

Οι κρότωναes είναι ακάρεα που παρασιτούν κάθε κατηγορία σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων των αμφιβίων, των ερπετών, των πουλιών, των θηλαστικών και των άγριων ζώων (Jenselius και λοιποί 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 και Raoult 2001).

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



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agüero-Rosenfeld, M. E. (2002). "Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art." Vector Borne Zoonotic Dis 2(4): 233-9.
2. Aguirre, E., M. A. Tesouro, L. Ruiz, I. Amusatogui and A. Sainz (2006). "Genetic characterization of Anaplasma (Ehrlichia) platys in dogs in Spain." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 53(4): 197-200.
3. Akgul, C., D. A. Moulding and S. W. Edwards (2001). "Molecular control of neutrophil apoptosis." FEBS Lett 487(3): 318-22.
4. Akkoyunlu, M., S. E. Malawista, J. Anguita and E. Fikrig (2001). "Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis." Infect Immun 69(9): 5577-88.
5. Alberti, A., M. F. Addis, O. Sparagano, R. Zobba, B. Chessa, T. Cubeddu, M. L. Parpaglia, M. Ardu and M. Pittau (2005). "Anaplasma phagocytophilum, Sardinia, Italy." Emerg Infect Dis 11(8): 1322-4.
6. Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, L. P. Antykova, T. I. Dzhivanyan, S. G. Rijpkema, N. V. Kruif and M. Cinco (1998). "Tick-borne borrelioses pathogen identification in Ixodes ticks (Acarina, Ixodidae) collected in St. Petersburg and Kaliningrad Baltic regions of Russia." J Med Entomol 35(2): 136-42.
7. Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, A. V. Semenov and C. V. Bolshakov (2001). "Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds." J Med Entomol 38(4): 471-4.
8. Amusatogui, I., A. Sainz and M. A. Tesouro (2006). "Serological evaluation of Anaplasma phagocytophilum infection in livestock in northwestern Spain." Ann N Y Acad Sci 1078: 487-90.
9. Antoniou, M., I. Economou, X. Wang, A. Psaroulaki, I. Spyridaki, B. Papadopoulos, A. Christidou, E. Tsafantakis and Y. Tselentis (2002). "Fourteen-year seroepidemiological study of zoonoses in a Greek village." Am J Trop Med Hyg 66(1): 80-5.
10. Antoniou, M., Y. Tselentis, T. Babalis, A. Gikas, N. Stratigakis, I. Vlachonikolis, A. Kafatos and M. Fioretos (1995). "The seroprevalence of ten zoonoses in two villages of Crete, Greece." Eur J Epidemiol 11(4): 415-23.
11. Babior, B. M. (1999). "NADPH oxidase: an update." Blood 93(5): 1464-76.
12. Bakken, J. S. and J. S. Dumler (2000). "Human granulocytic ehrlichiosis." Clin Infect Dis 31(2): 554-60.
13. Bakken, J. S. and J. S. Dumler (2006). "Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis." Ann N Y Acad Sci 1078: 236-47.
14. Bakken, J. S., J. S. Dumler, S. M. Chen, M. R. Eckman, L. L. Van Etta and D. H. Walker (1994). "Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging?" Jama 272(3): 212-8.
15. Bakken, J. S., I. Haller, D. Riddell, J. J. Walls and J. S. Dumler (2002). "The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis." Clin Infect Dis 34(1): 22-7.
16. Bjoersdorff, A., S. Bergstrom, R. F. Massung, P. D. Haemig and B. Olsen (2001). "Ehrlichia-infected ticks on migrating birds." Emerg Infect Dis 7(5): 877-9.

17. Bjoersdorff, A., P. Brouqui, I. Eliasson, R. F. Massung, B. Wittesjo and J. Berglund (1999). "Serological evidence of Ehrlichia infection in Swedish Lyme borreliosis patients." Scand J Infect Dis 31(1): 51-5.
18. Blanco, J. R. and J. A. Oteo (2002). "Human granulocytic ehrlichiosis in Europe." Clin Microbiol Infect 8(12): 763-72.
19. Brach, M. A., S. deVos, H. J. Gruss and F. Herrmann (1992). "Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death." Blood 80(11): 2920-4.
20. Brouqui, P., F. Bacellar, G. Baranton, R. J. Birtles, A. Bjoersdorff, J. R. Blanco, G. Caruso, M. Cinco, P. E. Fournier, E. Francavilla, M. Jensenius, J. Kazar, H. Laferl, A. Lakos, S. Lotric Furlan, M. Maurin, J. A. Oteo, P. Parola, C. Perez-Eid, O. Peter, D. Postic, D. Raoult, A. Tellez, Y. Tselentis and B. Wilske (2004). "Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe." Clin Microbiol Infect 10(12): 1108-32.
21. Brouqui, P., P. E. Fournier and D. Raoult (2001). "Doxycycline and eradication of microfilaremia in patients with loiasis." Emerg Infect Dis 7(3 Suppl): 604-5.
22. Brouqui, P. and D. Raoult (2006). "Arthropod-borne diseases in homeless." Ann N Y Acad Sci 1078: 223-35.
23. Buller, R. S., M. Arens, S. P. Hmiel, C. D. Paddock, J. W. Sumner, Y. Rikhisa, A. Unver, M. Gaudreault-Keener, F. A. Manian, A. M. Liddell, N. Schmulowitz and G. A. Storch (1999). "Ehrlichia ewingii, a newly recognized agent of human ehrlichiosis." N Engl J Med 341(3): 148-55.
24. Burg, N. D. and M. H. Pillinger (2001). "The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity." Clin Immunol 99(1): 7-17.
25. Burns, J. C., H. I. Kushner, J. F. Bastian, H. Shike, C. Shimizu, T. Matsubara and C. L. Turner (2000). "Kawasaki disease: A brief history." Pediatrics 106(2): E27.
26. Butler, C. M., A. M. Nijhof, F. Jongejan and J. H. van der Kolk (2008). "Anaplasma phagocytophilum infection in horses in the Netherlands." Vet Rec 162(7): 216-7.
27. Byrnes, V., S. Chopra and M. J. Koziel (2007). "Resolution of chronic hepatitis C following parasitosis." World J Gastroenterol 13(31): 4268-9.
28. Cao, W. C., L. Zhan, J. He, J. E. Foley, D. E. V. SJ, X. M. Wu, H. Yang, J. H. Richardus and J. D. Habbema (2006). "Natural Anaplasma phagocytophilum infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China." Am J Trop Med Hyg 75(4): 664-8.
29. Carlyon, J. A. and E. Fikrig (2003). "Invasion and survival strategies of Anaplasma phagocytophilum." Cell Microbiol 5(11): 743-54.
30. Chen, S. M., J. S. Dumler, J. S. Bakken and D. H. Walker (1994). "Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease." J Clin Microbiol 32(3): 589-95.
31. Chochlakis, D., I. Ioannou, I. Kokkini, Y. Tselentis and A. Psaroulaki (2008). "Seroprevalence of Anaplasma phagocytophilum in a high-risk human population." J Infect.
32. Chochlakis, D., I. Ioannou, L. Sharif, S. Kokkini, N. Hristophi, T. Dimitriou, Y. Tselentis and A. Psaroulaki (2008). "Prevalence of Anaplasma sp. in Goats and Sheep in Cyprus." Vector Borne Zoonotic Dis.



33. Chochlakis, D., M. Koliou, I. Ioannou, Y. Tselentis and A. Psaroulaki (2008). "Kawasaki disease and Anaplasma sp. infection of an infant in Cyprus." Int J Infect Dis.
34. Chochlakis, D., A. Papaeustathiou, G. Minadakis, A. Psaroulaki and Y. Tselentis (2008). "A serosurvey of Anaplasma phagocytophilum in blood donors in Crete, Greece." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 27(6): 473-5.
35. Choi, K. S. and J. S. Dumler (2003). "Early induction and late abrogation of respiratory burst in A. phagocytophilum-infected neutrophils." Ann N Y Acad Sci 990: 488-93.
36. Christova, I., J. Van De Pol, S. Yazar, E. Velo and L. Schouls (2003). "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 22(9): 535-42.
37. Christova, I. S. and J. S. Dumler (1999). "Human granulocytic ehrlichiosis in Bulgaria." Am J Trop Med Hyg 60(1): 58-61.
38. Cinco, M., F. Barbone, M. Grazia Ciufolini, M. Mascioli, M. Anguero Rosenfeld, P. Stefanel and R. Luzzati (2004). "Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy." Clin Microbiol Infect 10(12): 1056-61.
39. Cisak, E., J. Chmielewska-Badora, J. Zwolinski, A. Wojcik-Fatla, J. Polak and J. Dutkiewicz (2005). "Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (south-eastern Poland)." Ann Agric Environ Med 12(1): 127-32.
40. Colotta, F., A. Borre, J. M. Wang, M. Tattanelli, F. Maddalena, N. Polentarutti, G. Peri and A. Mantovani (1992). "Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes." J Immunol 148(3): 760-5.
41. Daniel, S. A., K. Manika, M. Arvanitidou, E. Diza, N. Symeonidis and A. Antoniadis (2002). "Serologic evidence of human granulocytic ehrlichiosis, Greece." Emerg Infect Dis 8(6): 643-4.
42. Daniels, T. J., G. R. Battaly, D. Liveris, R. C. Falco and I. Schwartz (2002). "Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis?" Emerg Infect Dis 8(12): 1524-5.
43. de la Fuente, J., M. W. Atkinson, J. T. Hogg, D. S. Miller, V. Naranjo, C. Almazan, N. Anderson and K. M. Kocan (2006). "Genetic characterization of Anaplasma ovis strains from bighorn sheep in Montana." J Wildl Dis 42(2): 381-5.
44. de la Fuente, J., M. W. Atkinson, V. Naranjo, I. G. Fernandez de Mera, A. J. Mangold, K. A. Keating and K. M. Kocan (2007). "Sequence analysis of the msp4 gene of Anaplasma ovis strains." Vet Microbiol 119(2-4): 375-81.
45. de la Fuente, J., A. Lew, H. Lutz, M. L. Meli, R. Hofmann-Lehmann, V. Shkap, T. Molad, A. J. Mangold, C. Almazan, V. Naranjo, C. Gortazar, A. Torina, S. Caracappa, A. L. Garcia-Perez, M. Barral, B. Oporto, L. Ceci, G. Carelli, E. F. Blouin and K. M. Kocan (2005). "Genetic diversity of anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development." Anim Health Res Rev 6(1): 75-89.
46. de la Fuente, J., R. F. Massung, S. J. Wong, F. K. Chu, H. Lutz, M. Meli, F. D. von Loewenich, A. Grzeszczuk, A. Torina, S. Caracappa, A. J. Mangold, V. Naranjo, S. Stuen and K. M. Kocan (2005). "Sequence analysis of the

- msp4 gene of Anaplasma phagocytophilum strains." J Clin Microbiol 43(3): 1309-17.**
47. **de la Fuente, J., A. Torina, S. Caracappa, G. Tumino, R. Furla, C. Almazan and K. M. Kocan (2005). "Serologic and molecular characterization of Anaplasma species infection in farm animals and ticks from Sicily." Vet Parasitol 133(4): 357-62.**
 48. **de la Fuente, J., A. Torina, V. Naranjo, S. Caracappa, V. Di Marco, A. Alongi, M. Russo, A. R. Maggio and K. M. Kocan (2005). "Infection with Anaplasma phagocytophilum in a seronegative patient in Sicily, Italy: case report." Ann Clin Microbiol Antimicrob 4: 15.**
 49. **de la Fuente, J., R. A. Van Den Bussche, J. C. Garcia-Garcia, S. D. Rodriguez, M. A. Garcia, A. A. Guglielmone, A. J. Mangold, L. M. Friche Passos, M. F. Barbosa Ribeiro, E. F. Blouin and K. M. Kocan (2002). "Phylogeography of New World isolates of Anaplasma marginale based on major surface protein sequences." Vet Microbiol 88(3): 275-85.**
 50. **de la Fuente, J., R. A. Van Den Bussche and K. M. Kocan (2001). "Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of Anaplasma marginale (Rickettsiaceae: Ehrlichieae)." Vet Parasitol 97(1): 65-76.**
 51. **De La Fuente, J., J. Vicente, U. Hofle, F. Ruiz-Fons, I. G. Fernandez De Mera, R. A. Van Den Bussche, K. M. Kocan and C. Gortazar (2004). "Anaplasma infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain." Vet Microbiol 100(3-4): 163-73.**
 52. **Demma, L. J., R. C. Holman, J. H. McQuiston, J. W. Krebs and D. L. Swerdlow (2005). "Epidemiology of human ehrlichiosis and anaplasmosis in the United States, 2001-2002." Am J Trop Med Hyg 73(2): 400-9.**
 53. **Dumler, J. S. (2005). "Anaplasma and Ehrlichia infection." Ann N Y Acad Sci 1063: 361-73.**
 54. **Dumler, J. S. and J. S. Bakken (1998). "Human ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks." Annu Rev Med 49: 201-13.**
 55. **Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa and F. R. Rurangirwa (2001). "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 51(Pt 6): 2145-65.**
 56. **Dumler, J. S., K. S. Choi, J. C. Garcia-Garcia, N. S. Barat, D. G. Scorpio, J. W. Garyu, D. J. Grab and J. S. Bakken (2005). "Human granulocytic anaplasmosis and Anaplasma phagocytophilum." Emerg Infect Dis 11(12): 1828-34.**
 57. **Dumler, J. S., J. E. Madigan, N. Pusterla and J. S. Bakken (2007). "Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment." Clin Infect Dis 45 Suppl 1: S45-51.**
 58. **Dumler, J. S., E. R. Trigliani, J. S. Bakken, M. E. Aguero-Rosenfeld and G. P. Wormser (2000). "Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis." Clin Diagn Lab Immunol 7(1): 6-8.**



59. Edelman, D. C. and J. S. Dumler (1996). "Evaluation of an Improved PCR Diagnostic Assay for Human Granulocytic Ehrlichiosis." Mol Diagn 1(1): 41-49.
60. Engvall, E. O. and A. Egenvall (2002). "Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses." Int J Med Microbiol 291 Suppl 33: 100-3.
61. Fenollar, F. and D. Raoult (2004). "Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms." Apmis 112(11-12): 785-807.
62. Fingerle, V., J. L. Goodman, R. C. Johnson, T. J. Kurtti, U. G. Munderloh and B. Wilske (1997). "Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups." J Clin Microbiol 35(12): 3244-7.
63. Foley, J., N. C. Nieto, P. Foley and M. B. Teglus (2008). "Co-phylogenetic analysis of Anaplasma phagocytophilum and its vectors, Ixodes spp. ticks." Exp Appl Acarol 45(3-4): 155-70.
64. Fresno, M., M. Kopf and L. Rivas (1997). "Cytokines and infectious diseases." Immunol Today 18(2): 56-8.
65. Friedhoff, K. T. (1997). "Tick-borne diseases of sheep and goats caused by Babesia, Theileria or Anaplasma spp." Parassitologia 39(2): 99-109.
66. Garcia-Perez, A. L., J. Barandika, B. Oporto, I. Povedano and R. A. Juste (2003). "Anaplasma phagocytophila as an abortifacient agent in sheep farms from northern Spain." Ann N Y Acad Sci 990: 429-32.
67. Garcia, J. C., M. J. Nunez, B. Castro, F. J. Fraile, A. Lopez, M. C. Mella, A. Blanco, C. Sieira, E. Loureiro, A. Portillo and J. A. Oteo (2006). "Human anaplasmosis: the first Spanish case confirmed by PCR." Ann N Y Acad Sci 1078: 545-7.
68. Ge, Y. and Y. Rikihisa (2006). "Anaplasma phagocytophilum delays spontaneous human neutrophil apoptosis by modulation of multiple apoptotic pathways." Cell Microbiol 8(9): 1406-16.
69. Georges, K., G. R. Loria, S. Riili, A. Greco, S. Caracappa, F. Jongejan and O. Sparagano (2001). "Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily." Vet Parasitol 99(4): 273-86.
70. Goethert, H. K. and S. R. Telford, 3rd (2003). "Enzootic transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis among cottontail rabbits." Am J Trop Med Hyg 68(6): 633-7.
71. Gokce, H. I., G. Ross and Z. Woldehiwet (1999). "Inhibition of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphonuclear leucocytes by Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila." J Comp Pathol 120(4): 369-81.
72. Goodman, J. L., C. Nelson, B. Vitale, J. E. Madigan, J. S. Dumler, T. J. Kurtti and U. G. Munderloh (1996). "Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis." N Engl J Med 334(4): 209-15.
73. Goodman, J. L., C. M. Nelson, M. B. Klein, S. F. Hayes and B. W. Weston (1999). "Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand." J Clin Invest 103(3): 407-12.
74. Gordon W.S., A. B., D.R. Wilson, J. MacLeod (1932). "'Tick-borne fever" (A hitherto undescribed disease of sheep)." J Comp Path 45: 301-07.
75. Groen, J., P. Koraka, Y. A. Nur, T. Avsic-Zupanc, W. H. Goessens, A. Ott and A. D. Osterhaus (2002). "Serologic evidence of ehrlichiosis among humans and wild animals in The Netherlands." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21(1): 46-9.

76. Guarner, J., C. D. Paddock, J. Bartlett and S. R. Zaki (2008). "Adrenal gland hemorrhage in patients with fatal bacterial infections." Mod Pathol 21(9): 1113-20.
77. Halasz, C. L., G. W. Niedt, C. P. Kurtz, D. G. Scorpio, J. S. Bakken and J. S. Dumler (2005). "A case of Sweet syndrome associated with human granulocytic anaplasmosis." Arch Dermatol 141(7): 887-9.
78. Hechemy, K. E., J. A. Oteo, D. Raoult, D. J. Silverman and J. R. Blanco (2006). "A century of rickettsiology: emerging, reemerging rickettsioses, clinical, epidemiologic, and molecular diagnostic aspects and emerging veterinary rickettsioses: an overview." Ann N Y Acad Sci 1078: 1-14.
79. Herron, M. J., M. E. Ericson, T. J. Kurtti and U. G. Munderloh (2005). "The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils." Ann N Y Acad Sci 1063: 374-82.
80. Herron, M. J., C. M. Nelson, J. Larson, K. R. Snapp, G. S. Kansas and J. L. Goodman (2000). "Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1." Science 288(5471): 1653-6.
81. Hofle, U., J. Vicente, D. Nagore, A. Hurtado, A. Pena, J. de la Fuente and C. Gortazar (2004). "The risks of translocating wildlife. Pathogenic infection with *Theileria* sp. and *Elaeophora elaphi* in an imported red deer." Vet Parasitol 126(4): 387-95.
82. Hofmann-Lehmann, R., M. L. Meli, U. M. Dreher, E. Gonczi, P. Deplazes, U. Braun, M. Engels, J. Schupbach, K. Jorger, R. Thoma, C. Griot, K. D. Stark, B. Willi, J. Schmidt, K. M. Kocan and H. Lutz (2004). "Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland." J Clin Microbiol 42(8): 3775-80.
83. Homburg, C. H. and D. Roos (1996). "Apoptosis of neutrophils." Curr Opin Hematol 3(1): 94-9.
84. Hornok, S., V. Elek, J. de la Fuente, V. Naranjo, R. Farkas, G. Majoros and G. Foldvari (2007). "First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary." Vet Microbiol 122(3-4): 316-22.
85. Horowitz, H. W., M. Aguerro-Rosenfeld, J. S. Dumler, D. F. McKenna, T. C. Hsieh, J. Wu, I. Schwartz and G. P. Wormser (1998). "Reinfection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis." Ann Intern Med 129(6): 461-3.
86. Horowitz, H. W., M. E. Aguerro-Rosenfeld, D. F. McKenna, D. Holmgren, T. C. Hsieh, S. A. Varde, S. J. Dumler, J. M. Wu, I. Schwartz, Y. Rikihisa and G. P. Wormser (1998). "Clinical and laboratory spectrum of culture-proven human granulocytic ehrlichiosis: comparison with culture-negative cases." Clin Infect Dis 27(5): 1314-7.
87. Horowitz, H. W., T. C. Hsieh, M. E. Aguerro-Rosenfeld, F. Kalantarpour, I. Chowdhury, G. P. Wormser and J. M. Wu (2001). "Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*." Antimicrob Agents Chemother 45(3): 786-8.
88. Horowitz, H. W., E. Kilchevsky, S. Haber, M. Aguerro-Rosenfeld, R. Kranwinkel, E. K. James, S. J. Wong, F. Chu, D. Liveris and I. Schwartz (1998). "Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis." N Engl J Med 339(6): 375-8.
89. Hubalek, Z. (2004). "An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds." J Wildl Dis 40(4): 639-59.



90. Hubalek, Z., Z. Juricova, S. Svobodova and J. Halouzka (1993). "A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic." J Wildl Dis 29(4): 604-7.
91. Hulinska, D., K. Langrova, M. Pejcoch and I. Pavlasek (2004). "Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction." Apmis 112(4-5): 239-47.
92. Hunfeld, K. P., T. Bittner, R. Rodel, V. Brade and J. Cinatl (2004). "New real-time PCR-based method for in vitro susceptibility testing of *Anaplasma phagocytophilum* against antimicrobial agents." Int J Antimicrob Agents 23(6): 563-71.
93. Hunfeld, K. P. and V. Brade (1999). "Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18(3): 221-4.
94. Inokuma, H., K. Fujii, M. Okuda, T. Onishi, J. P. Beauvais, D. Raoult and P. Brouqui (2002). "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 9(5): 1132-6.
95. Inokuma, H., P. Parola, D. Raoult and P. Brouqui (2001). "Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi Prefecture, Japan." Vet Parasitol 99(4): 335-9.
96. Jahangir, A., C. Kolbert, W. Edwards, P. Mitchell, J. S. Dumler and D. H. Persing (1998). "Fatal pancarditis associated with human granulocytic Ehrlichiosis in a 44-year-old man." Clin Infect Dis 27(6): 1424-7.
97. Jensen, J., D. Simon, H. Murua Escobar, J. T. Soller, J. Bullerdiek, P. Beelitz, K. Pfister and I. Nolte (2007). "*Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany." Zoonoses Public Health 54(2): 94-101.
98. Jensenius, M., P. Parola and D. Raoult (2006). "Threats to international travellers posed by tick-borne diseases." Travel Med Infect Dis 4(1): 4-13.
99. Kafetzis, D. A., H. C. Maltezou, I. Constantopoulou, G. Antonaki, G. Liapi and I. Mathioudakis (2001). "Lack of association between Kawasaki syndrome and infection with *Rickettsia conorii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii* or *Ehrlichia phagocytophila* group." Pediatr Infect Dis J 20(7): 703-6.
100. Karlin, S. and L. Brocchieri (2000). "Heat shock protein 60 sequence comparisons: duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution." Proc Natl Acad Sci U S A 97(21): 11348-53.
101. Kawasaki, T. (1967). "[Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes in children]." Arerugi 16(3): 178-222.
102. Keysary, A., R. F. Massung, M. Inbar, A. D. Wallach, U. Shanas, K. Y. Mumcuoglu and T. Waner (2007). "Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in Israel." Emerg Infect Dis 13(9): 1411-2.
103. Kieser, S. T., I. S. Eriks and G. H. Palmer (1990). "Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle." Infect Immun 58(4): 1117-9.
104. Klein, M. B., S. Hu, C. C. Chao and J. L. Goodman (2000). "The agent of human granulocytic ehrlichiosis induces the production of myelosuppressing chemokines without induction of proinflammatory cytokines." J Infect Dis 182(1): 200-5.

105. Kocan, K. M., J. de la Fuente, E. F. Blouin and J. C. Garcia-Garcia (2004). "Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia." Parasitology 129 Suppl: S285-300.
106. Kocan, K. M., J. de la Fuente, A. A. Guglielmone and R. D. Melendez (2003). "Antigens and alternatives for control of Anaplasma marginale infection in cattle." Clin Microbiol Rev 16(4): 698-712.
107. Krause, P. J., S. R. Telford, 3rd, A. Spielman, V. Sikand, R. Ryan, D. Christianson, G. Burke, P. Brassard, R. Pollack, J. Peck and D. H. Persing (1996). "Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness." Jama 275(21): 1657-60.
108. Krause, P. J. and G. P. Wormser (2008). "Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis?" Jama 300(19): 2308-9.
109. Kuttler, K. L. (1984). "Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review." J Wildl Dis 20(1): 12-20.
110. Leiby, D. A., A. P. Chung, R. G. Cable, J. Trouern-Trend, J. McCullough, M. J. Homer, L. D. Reynolds, R. L. Houghton, M. J. Lodes and D. H. Persing (2002). "Relationship between tick bites and the seroprevalence of Babesia microti and Anaplasma phagocytophila (previously Ehrlichia sp.) in blood donors." Transfusion 42(12): 1585-91.
111. Leusen, J. H., A. J. Verhoeven and D. Roos (1996). "Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family." Front Biosci 1: d72-90.
112. Lew, A. E., K. R. Gale, C. M. Minchin, V. Shkap and D. T. de Waal (2003). "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 92(1-2): 145-60.
113. Lin, M. and Y. Rikihisa (2003). "Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival." Infect Immun 71(9): 5324-31.
114. Liu, Z., J. Luo, Q. Bai, M. Ma, G. Guan and H. Yin (2005). "Amplification of 16S rRNA genes of Anaplasma species in China for phylogenetic analysis." Vet Microbiol 107(1-2): 145-8.
115. Loebermann, M., V. Fingerle, M. Lademann, C. Fritzsche and E. C. Reisinger (2006). "Borrelia burgdorferi and Anaplasma phagocytophilum coinfection." Emerg Infect Dis 12(2): 353-5.
116. Loftis, A. D., W. K. Reeves, D. E. Szumlas, M. M. Abbassy, I. M. Helmy, J. R. Moriarity and G. A. Dasch (2006). "Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals." Exp Appl Acarol 40(1): 67-81.
117. Lotric-Furlan, S., M. Petrovec, T. Avsic-Zupanc, M. Logar and F. Strle (2002). "Epidemiological, clinical and laboratory distinction between human granulocytic ehrlichiosis and the initial phase of tick-borne encephalitis." Wien Klin Wochenschr 114(13-14): 636-40.
118. Lotric-Furlan, S., M. Petrovec, T. Avsic-Zupanc and F. Strle (2003). "Human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia." Ann N Y Acad Sci 990: 279-84.
119. Lotric-Furlan, S., M. Petrovec, T. A. Zupanc, W. L. Nicholson, J. W. Sumner, J. E. Childs and F. Strle (1998). "Human granulocytic ehrlichiosis



- in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia." Clin Infect Dis 27(3): 424-8.
120. MacLeod, J. (1962). "Ticks and disease in domestic stocks in Great Britain." Symposium of the Zoological Society of London 6: 29-50.
 121. Matsumoto, K., G. Joncour, B. Davoust, P. H. Pitel, A. Chauzy, E. Collin, H. Morvan, N. Vassallo and P. Brouqui (2006). "Anaplasma phagocytophilum infection in cattle in France." Ann N Y Acad Sci 1078: 491-4.
 122. Mayer-Scholl, A., P. Averhoff and A. Zychlinsky (2004). "How do neutrophils and pathogens interact?" Curr Opin Microbiol 7(1): 62-6.
 123. Molad, T., K. A. Brayton, G. H. Palmer, S. Michaeli and V. Shkap (2004). "Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in Anaplasma marginale and A. centrale vaccine strain." Vet Microbiol 100(1-2): 55-64.
 124. Moulding, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart and S. W. Edwards (1998). "Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival." Blood 92(7): 2495-502.
 125. Naranjo, V., F. Ruiz-Fons, U. Hofle, I. G. Fernandez de Mera, D. Villanua, C. Almazan, A. Torina, S. Caracappa, K. M. Kocan, C. Gortazar and J. De La Fuente (2006). "Molecular epidemiology of human and bovine anaplasmosis in southern Europe." Ann N Y Acad Sci 1078: 95-9.
 126. Nicholson, W. L., J. A. Comer, J. W. Sumner, C. Gingrich-Baker, R. T. Coughlin, L. A. Magnarelli, J. G. Olson and J. E. Childs (1997). "An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis." J Clin Microbiol 35(6): 1510-6.
 127. Nyarko, E., D. J. Grab and J. S. Dumler (2006). "Anaplasma phagocytophilum-infected neutrophils enhance transmigration of Borrelia burgdorferi across the human blood brain barrier in vitro." Int J Parasitol 36(5): 601-5.
 128. Ogden, N. H., K. Bown, B. K. Horrocks, Z. Woldehiwet and M. Bennett (1998). "Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K." Med Vet Entomol 12(4): 423-9.
 129. Ohashi, N., N. Zhi, Q. Lin and Y. Rikihisa (2002). "Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents." Infect Immun 70(4): 2128-38.
 130. Ongut, G., D. Ogunc, G. Mutlu, D. Colak, M. Gultekin, F. Gunseren, L. Donmez and D. Tuncer (2006). "Seroprevalence of antibodies to Anaplasma phagocytophilum in Antalya, Turkey." Infection 34(2): 107-9.
 131. Oteo, J. A., J. R. Blanco, V. Martinez de Artola and V. Ibarra (2000). "First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain)." Emerg Infect Dis 6(4): 430-2.
 132. Palmer, G. H., J. R. Abbott, D. M. French and T. F. McElwain (1998). "Persistence of Anaplasma ovis infection and conservation of the msp-2 and msp-3 multigene families within the genus Anaplasma." Infect Immun 66(12): 6035-9.
 133. Pancholi, P., C. P. Kolbert, P. D. Mitchell, K. D. Reed, Jr., J. S. Dumler, J. S. Bakken, S. R. Telford, 3rd and D. H. Persing (1995). "Ixodes dammini as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis." J Infect Dis 172(4): 1007-12.

134. Parola, P. (2004). "Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe." Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27(5): 297-304.
135. Parola, P., B. Davoust and D. Raoult (2005). "Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses." Vet Res 36(3): 469-92.
136. Parola, P. and D. Raoult (2001). "Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat." Clin Infect Dis 32(6): 897-928.
137. Pediatrics, A. A. o. (1988). Kawasaki disease. Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. P. G. Elk Grove Village, IL, American Academy of Pediatrics: 251-54.
138. Petrovec, M., S. Lotric Furlan, T. A. Zupanc, F. Strle, P. Brouqui, V. Roux and J. S. Dumler (1997). "Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species." J Clin Microbiol 35(6): 1556-9.
139. Petrovec, M., W. Sixl, E. Marth, N. Bushati and G. Wust (2003). "Domestic animals as indicators of Anaplasma species infections in Northern Albania." Ann N Y Acad Sci 990: 112-5.
140. Petrovec, M., J. W. Sumner, W. L. Nicholson, J. E. Childs, F. Strle, J. Barlic, S. Lotric-Furlan and T. Avsic Zupanc (1999). "Identity of ehrlichial DNA sequences derived from Ixodes ricinus ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia." J Clin Microbiol 37(1): 209-10.
141. Pinyowong, D., S. Jittapalapong, F. Suksawat, R. W. Stich and A. Thamchaipenet (2008). "Molecular characterization of Thai Ehrlichia canis and Anaplasma platys strains detected in dogs." Infect Genet Evol 8(4): 433-8.
142. Psaroulaki, A., A. Germanakis, A. Gikas, E. Scoulica and Y. Tselentis (2005). "Simultaneous detection of "Rickettsia mongolotimonae" in a patient and in a tick in Greece." J Clin Microbiol 43(7): 3558-9.
143. Psaroulaki, A., M. Koliou, D. Chochlakis, I. Ioannou, S. Mazeri and Y. Tselentis (2008). "Anaplasma phagocytophilum infection in a child." Pediatr Infect Dis J 27(7): 664-6.
144. Psaroulaki, A., D. Ragiadakou, G. Kouris, B. Papadopoulos, B. Chaniotis and Y. Tselentis (2006). "Ticks, tick-borne rickettsiae, and Coxiella burnetii in the Greek Island of Cephalonia." Ann N Y Acad Sci 1078: 389-99.
145. Pusterla, N., P. Deplazes, U. Braun and H. Lutz (1999). "Serological evidence of infection with Ehrlichia spp. in red foxes (Vulpes vulpes) in Switzerland." J Clin Microbiol 37(4): 1168-9.
146. Pusterla, N., R. Weber, C. Wolfensberger, G. Schar, R. Zbinden, W. Fierz, J. E. Madigan, J. S. Dumler and H. Lutz (1998). "Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17(3): 207-9.
147. Rajput, Z. I., S. H. Hu, A. G. Arijo, M. Habib and M. Khalid (2005). "Comparative study of Anaplasma parasites in tick carrying buffaloes and cattle." J Zhejiang Univ Sci B 6(11): 1057-62.
148. Rathore, M. H., L. L. Barton, J. E. Dawson, R. L. Regnery and E. M. Ayoub (1993). "Ehrlichia chaffeensis and Rochalimaea antibodies in Kawasaki disease." J Clin Microbiol 31(11): 3058-9.
149. Ravyn, M. D., J. L. Goodman, C. B. Kodner, D. K. Westad, L. A. Coleman, S. M. Engstrom, C. M. Nelson and R. C. Johnson (1998).



- "Immunodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by using culture-derived human isolates." J Clin Microbiol 36(6): 1480-8.
150. Razmi, G. R., K. Dastjerdi, H. Hossieni, A. Naghibi, F. Barati and M. R. Aslani (2006). "An epidemiological study on Anaplasma infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad Suburb, Khorasan Province, Iran." Ann N Y Acad Sci 1078: 479-81.
 151. Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes and A. W. Segal (2002). "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux." Nature 416(6878): 291-7.
 152. Richter, P. J., Jr., R. B. Kimsey, J. E. Madigan, J. E. Barlough, J. S. Dumler and D. L. Brooks (1996). "Ixodes pacificus (Acari: Ixodidae) as a vector of Ehrlichia equi (Rickettsiales: Ehrlichieae)." J Med Entomol 33(1): 1-5.
 153. Rikihisa, Y. (2003). "Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae." Ann N Y Acad Sci 990: 548-55.
 154. Rikihisa, Y. (2006). "New findings on members of the family Anaplasmataceae of veterinary importance." Ann N Y Acad Sci 1078: 438-45.
 155. Rowley, A. H. and S. T. Shulman (1998). "Kawasaki syndrome." Clin Microbiol Rev 11(3): 405-14.
 156. Santos, A. S., M. M. Santos-Silva, V. C. Almeida, F. Bacellar and J. S. Dumler (2004). "Detection of Anaplasma phagocytophilum DNA in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal." Emerg Infect Dis 10(9): 1643-8.
 157. Sarih, M., Y. M'Ghirbi, A. Bouattour, L. Gern, G. Baranton and D. Postic (2005). "Detection and identification of Ehrlichia spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco." J Clin Microbiol 43(3): 1127-32.
 158. Savill, J. S., P. M. Henson and C. Haslett (1989). "Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism." J Clin Invest 84(5): 1518-27.
 159. Scaife, H., Z. Woldehiwet, C. A. Hart and S. W. Edwards (2003). "Anaplasma phagocytophilum reduces neutrophil apoptosis in vivo." Infect Immun 71(4): 1995-2001.
 160. Skarphedinsson, S., P. Sogaard and C. Pedersen (2001). "Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis in high-risk groups in Denmark." Scand J Infect Dis 33(3): 206-10.
 161. Skoracki, M., J. Michalik, B. Skotarczak, A. Rymaszewska, B. Sikora, T. Hofman, B. Wodecka and M. Sawczuk (2006). "First detection of Anaplasma phagocytophilum in quill mites (Acari: Syringophilidae) parasitizing passerine birds." Microbes Infect 8(2): 303-7.
 162. Skotarczak, B. (2003). "Canine ehrlichiosis." Ann Agric Environ Med 10(2): 137-41.
 163. Solano-Gallego, L., J. Lull, M. Osso, B. Hegarty and E. Breitschwerdt (2006). "A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain." Vet Res 37(2): 231-44.
 164. Splitter, E. J., H. D. Anthony and M. J. Twiehaus (1956). "Anaplasma ovis in the United States; experimental studies with sheep and goats." Am J Vet Res 17(64): 487-91.

165. Stanczak, J. and A. Grzeszczuk (2006). "Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among forestry rangers in northern and northeastern Poland." Ann N Y Acad Sci 1078: 89-91.
166. Strle, F. (2004). "Human granulocytic ehrlichiosis in Europe." Int J Med Microbiol 293 Suppl 37: 27-35.
167. Stuen, S. (2007). "Anaplasma phagocytophilum - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe." Vet Res Commun 31 Suppl 1: 79-84.
168. Stuen, S., S. Nevland and T. Moum (2003). "Fatal cases of Tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum*." Ann N Y Acad Sci 990: 433-4.
169. Stuen, S., I. Van De Pol, K. Bergstrom and L. M. Schouls (2002). "Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway." J Clin Microbiol 40(9): 3192-7.
170. Sumner, J. W., W. L. Nicholson and R. F. Massung (1997). "PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species." J Clin Microbiol 35(8): 2087-92.
171. Thomas, D. R., M. Sillis, T. J. Coleman, S. M. Kench, N. H. Ogden, R. L. Salmon, P. Morgan-Capner, P. Softley and D. Meadows (1998). "Low rates of ehrlichiosis and Lyme borreliosis in English farmworkers." Epidemiol Infect 121(3): 609-14.
172. Thomas, L. D., I. Hongo, K. C. Bloch, Y. W. Tang and S. Dummer (2007). "Human ehrlichiosis in transplant recipients." Am J Transplant 7(6): 1641-7.
173. Torina, A., A. Alongi, V. Naranjo, A. Estrada-Pena, J. Vicente, S. Scimeca, A. M. Marino, F. Salina, S. Caracappa and J. de la Fuente (2008). "Prevalence and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a Mediterranean ecosystem." Appl Environ Microbiol 74(24): 7578-84.
174. Torina, A., J. Vicente, A. Alongi, S. Scimeca, R. Turla, S. Nicosia, V. Di Marco, S. Caracappa and J. de la Fuente (2007). "Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003-2005." Zoonoses Public Health 54(1): 8-15.
175. Unver, A., S. Felek, C. D. Paddock, N. Zhi, H. W. Horowitz, G. P. Wormser, L. C. Cullman and Y. Rikihisa (2001). "Western blot analysis of sera reactive to human monocytic ehrlichiosis and human granulocytic ehrlichiosis agents." J Clin Microbiol 39(11): 3982-6.
176. von Stedingk, L. V., M. Gurtelschmid, H. S. Hanson, R. Gustafson, L. Dotevall, E. O. Engvall and M. Granstrom (1997). "The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks." Clin Microbiol Infect 3(5): 573-574.
177. Walder, G., G. Tiwald, M. P. Dierich and R. Wurzner (2003). "Serological evidence for human granulocytic ehrlichiosis in Western Austria." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22(9): 543-7.
178. Walker, A. R., M. P. Alberdi, K. A. Urquhart and H. Rose (2001). "Risk factors in habitats of the tick *Ixodes ricinus* influencing human exposure to *Ehrlichia phagocytophila* bacteria." Med Vet Entomol 15(1): 40-9.
179. Walker, D. H. and J. S. Dumler (1997). "Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne



- infections and the critical role of the pathologist." Arch Pathol Lab Med 121(8): 785-91.
180. Walls, J. J., P. Caturegli, J. S. Bakken, K. M. Asanovich and J. S. Dumler (2000). "Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using epank1 genes of Ehrlichia phagocytophila-group ehrlichiae." J Clin Microbiol 38(1): 354-6.
 181. Waner, T., S. Harrus, H. Bark, E. Bogin, Y. Avidar and A. Keysary (1997). "Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs." Vet Parasitol 69(3-4): 307-17.
 182. Wang, T., S. E. Malawista, U. Pal, M. Grey, J. Meek, M. Akkoyunlu, V. Thomas and E. Fikrig (2002). "Superoxide anion production during Anaplasma phagocytophila infection." J Infect Dis 186(2): 274-80.
 183. Wen, B., W. Cao and H. Pan (2003). "Ehrlichiae and ehrlichial diseases in china." Ann N Y Acad Sci 990: 45-53.
 184. Wientjes, F. B. and A. W. Segal (1995). "NADPH oxidase and the respiratory burst." Semin Cell Biol 6(6): 357-65.
 185. Wittesjo, B., A. Bjoersdorff, I. Eliasson and J. Berglund (2001). "First long-term study of the seroresponse to the agent of human granulocytic ehrlichiosis among residents of a tick-endemic area of Sweden." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20(3): 173-8.
 186. Woessner, R., B. C. Gaertner, M. T. Grauer, K. Weber, N. Mueller-Lantsch, K. P. Hunfeld and J. Treib (2001). "Incidence and prevalence of infection with human granulocytic ehrlichiosis agent in Germany. A prospective study in young healthy subjects." Infection 29(5): 271-3.
 187. Woldehiwet, Z., C. Dare and S. D. Carter (1993). "The effects of tick-borne fever on the susceptibility of ovine polymorphonuclear cells to P. haemolytica cytotoxin." J Comp Pathol 109(3): 303-7.
 188. Yabsley, M. J., J. Romines and V. F. Nettles (2006). "Detection of Babesia and Anaplasma species in rabbits from Texas and Georgia, USA." Vector Borne Zoonotic Dis 6(1): 7-13.
 189. Yoshiie, K., H. Y. Kim, J. Mott and Y. Rikihisa (2000). "Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis." Infect Immun 68(3): 1125-33.
 190. Young, N. P. and C. J. Klein (2007). "Encephalopathy with seizures having PCR-positive Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis." Eur J Neurol 14(2): e3-4.
 191. Zaugg, J. L., W. L. Goff, W. Foreyt and D. L. Hunter (1996). "Susceptibility of elk (Cervus elaphus) to experimental infection with Anaplasma marginale and A. ovis." J Wildl Dis 32(1): 62-6.
 192. Zeidner, N. S., R. F. Massung, M. C. Dolan, E. Dadey, E. Gabitzsch, G. Dietrich and M. L. Levin (2008). "A sustained-release formulation of doxycycline hyclate (Atridox) prevents simultaneous infection of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi transmitted by tick bite." J Med Microbiol 57(Pt 4): 463-8.
 193. Zhan, L., J. He, G. W. Saren, X. M. Wu, J. B. Wang, Q. M. Zhao, P. H. Zhang, H. N. Huang, B. G. Jiang, J. F. Jiang, J. B. Zhang, C. Y. Chu, Y. Gao, H. Yang and W. C. Cao (2007). "[Investigation on Anaplasma phagocytophilum infection in rodents from forest areas in northeastern China]." Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 28(2): 157-9.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβαστές και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

- 194. Zhang, J. Z., V. L. Popov, S. Gao, D. H. Walker and X. J. Yu (2007). "The developmental cycle of Ehrlichia chaffeensis in vertebrate cells." Cell Microbiol 9(3): 610-8.**



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΑΙΜΟΔΟΤΗ.....
.....
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ.....
ΠΟΛΗ/ΧΩΡΙΟ.....
ΤΗΛ.....
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ.....
ΗΛΙΚΙΑ.....
ΦΥΛΟ (ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΑΡΝΗΣΗΣ ΥΠΟΒΟΛΗΣ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ).....

ΗΜ/ΙΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΔΗΛΩΣΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ ΕΡΑΙΧΙΩΣΗΣ

- ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΗ / ΙΑΤΡΟΥ -				
Όνοματεπώνυμο ασθενή: Λιεύθυνση Κατοικίας: Πόλη:	Ημερομηνία Καταγραφής (ηη/μμ/εεεε): / / Όνοματεπώνυμο Ιατρού: 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:			
Επαφή με ζώα εντός 2 μηνών από έναρξη της νόσου:	<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)			
<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)	Άλλο μέλος της οικογένειας με παρόμοια ασθένεια το τελευταίο έτος:			
Έκθεση σε λοχεία ζώων:	<input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Άγνωστο			
Έκθεση σε μη-παστεριωμένο 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):			
Προϋπάρχουσα νόσος; (τσεκάρτε όσα ισχύουν):	<input type="checkbox"/> Πυρετός (> 37.5°) <input type="checkbox"/> Μυαλγία <input type="checkbox"/> Θρομβοκυττοπενία <input type="checkbox"/> Καταβολή <input type="checkbox"/> Εξάνθημα <input type="checkbox"/> Βήχας <input type="checkbox"/> Κεφαλαλγία <input type="checkbox"/> Αναιμία <input type="checkbox"/> Ηπατοσπληνομεγαλία <input type="checkbox"/> Πνευμονία <input type="checkbox"/> Λευκοπενία <input type="checkbox"/> Ενδοκαρδίτιδα <input type="checkbox"/> Άλλο (καθορίστε):			
<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			
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ				
Ορολογικός έλεγχος	Ημερομηνία συλλογής (ηη/μμ/εεεε) 1° Δείγμα / / Τίτλος Θετικό (;)	Ημερομηνία συλλογής (ηη/μμ/εεεε) 2° Δείγμα* / / Τίτλος Θετικό (;)	Άλλοι διαγνωστικοί έλεγχοι	Θετικό (;)



	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 70%;">PCR Παρατήρηση «μούρου»</td> <td style="width: 30%; text-align: center;"> <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι </td> </tr> <tr> <td>Καλλιέργεια</td> <td style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι </td> </tr> </table>	PCR Παρατήρηση «μούρου»	<input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι	Καλλιέργεια	<input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι
PCR Παρατήρηση «μούρου»	<input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι <input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι				
Καλλιέργεια	<input type="checkbox"/> Ναι <input type="checkbox"/> Όχι				
ΤΕΛΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ					
<input type="checkbox"/> HME <input type="checkbox"/> HGE <input type="checkbox"/> Ερλιγίωση (άγνωστη, ή διαφορετικό στέλεχος): <input type="checkbox"/> Επιβεβαιωμένη <input type="checkbox"/> Πιθανή	<p><u>Επιβεβαιωμένη ερλιγίωση:</u> Ένα κλινικό περιστατικό με: 1) τετραπλασιασμό του τίτλου αντισωμάτων με ανοσοφθορισμό σε 2 δείγματα ορού, ή 2) θετικό PCR, ή 3) παρατήρηση «μούρων» σε λευκά αιμοσφαίρια με 1 δείγμα θετικό στον ανοσοφθορισμό, ή 4) απομόνωση και καλλιέργεια ερλίγιας σε κλινικό δείγμα.</p> <p><u>Πιθανή ερλιγίωση:</u> Ένα κλινικό δείγμα με: 1) ένα δείγμα θετικό στον ανοσοφθορισμό, ή 2) παρατήρηση «μούρων» σε λευκά αιμοσφαίρια.</p>				
ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΝΟΣΟΥ					
.....					

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ

ΟΝ/ΝΥΜΟ ΙΔΙΟΚΤΗΤΗ.....

ΔΙΕΥΘ.

ΑΡ.ΤΗΛ.

ΑΡΙΘ. ΖΩΩΝ:

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΥΠΟΣΤΑΤΙΚΩΝ

1. ΚΑΛΗ
2. ΜΕΤΡΙΑ
3. ΚΑΚΗ

ΕΙΔΟΣ: 1. ΑΙΓΕΣ

2. ΠΡΟΒΑΤΑ

3. ΒΟΟΕΙΔΗ

4. ΣΚΥΛΟΣ

5. ΓΑΤΑ

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΖΩΩΝ

ΜΗΝΑΣ / ΧΡΟΝΟΣ

ΕΚΤΟΠΑΡΑΣΙΤΑ

ΚΡΟΤΩΝΕΣ

ΑΓΑΛΛΕΙΑ

ΑΠΟΒΟΛΗ

ΆΛΛΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ:



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

- Όλα τα υλικά πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους.
- Ο εξεταστέος ορός διαλύεται αρχικά με PBS στην επιθυμητή αραιώση. Ακολουθούν αραιώσεις υποδιπλασιασμού.
- 25μl από το παραπάνω διάλυμα τοποθετούνται σε ένα από τα βοθρία της αντικειμενοφόρου πλάκας, τα οποία είναι ήδη επικαλυμμένα με αντιγόνο του *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 και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της επώασης, σε υγρό περιβάλλον στο σκοτάδι, για 30 λεπτά.
- Αφού οι πλάκες ξεπλυθούν με PBS και σκουπιστούν, προστίθεται μικρή ποσότητα γλυκερόλης και τοποθετείται καλυπτρίδα.
- Στη συνέχεια εξετάζονται στο μικροσκόπιο φθορισμού και το αποτέλεσμα προσδιορίζεται ανάλογα με την ένταση του φθορισμού σε κάθε δείγμα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

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.
- 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.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

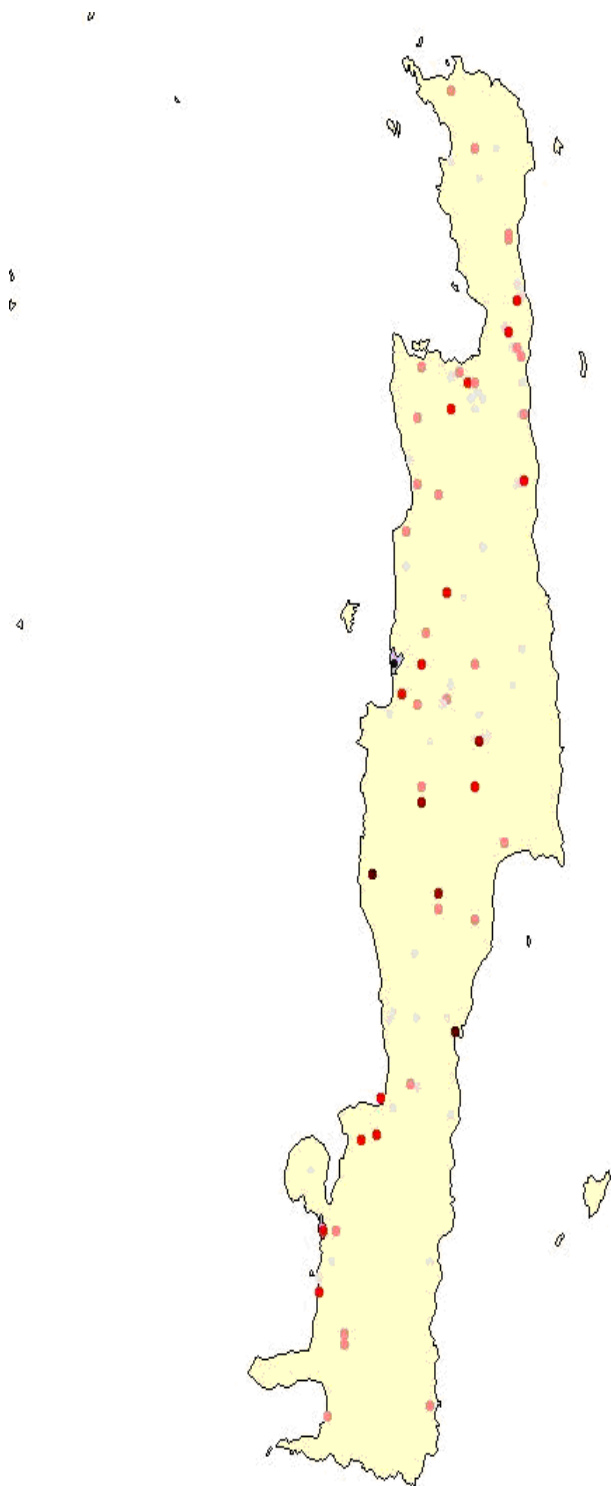
Ηλεκτροφόρηση του DNA

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.

- Προετοιμάζεται το διάλυμα αγαρόζης 1-2% σε TAE 1X
- 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 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 συσκευή παρατήρησης.

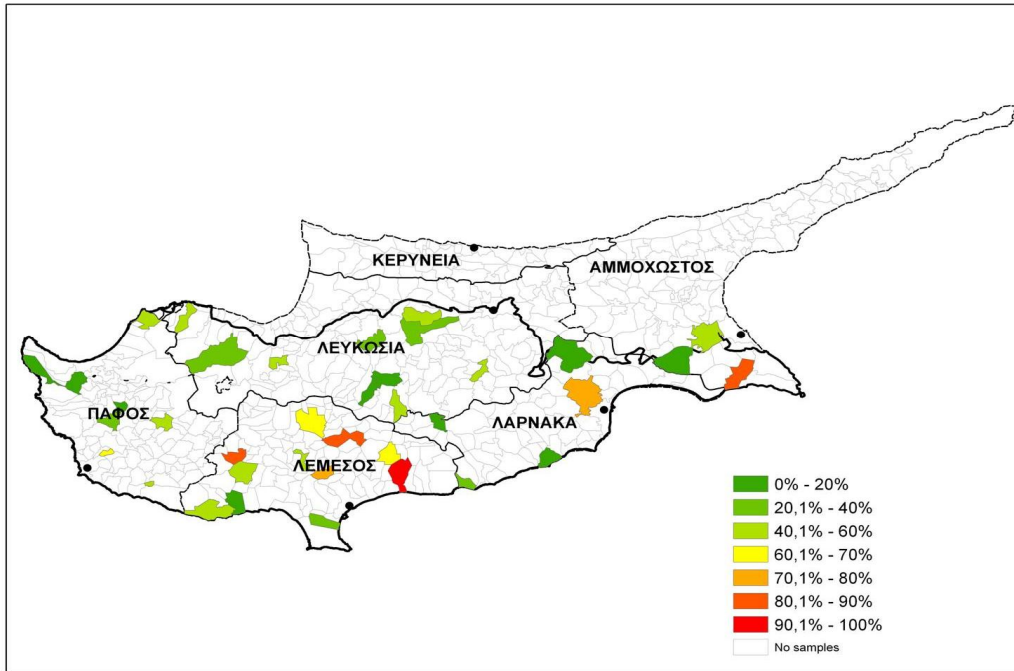
Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να είναι κενός. Ο θετικός μάρτυρας πρέπει να περιέχει την χαρακτηριστική μπάντα του κομματιού του γονιδίου που πολλαπλασιάζουν οι εναρκτές που χρησιμοποιήθηκαν. Κάθε επιτυχημένος πολλαπλασιασμός εμφανίζει όμοια μπάντα με αυτήν του θετικού μάρτυρα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7

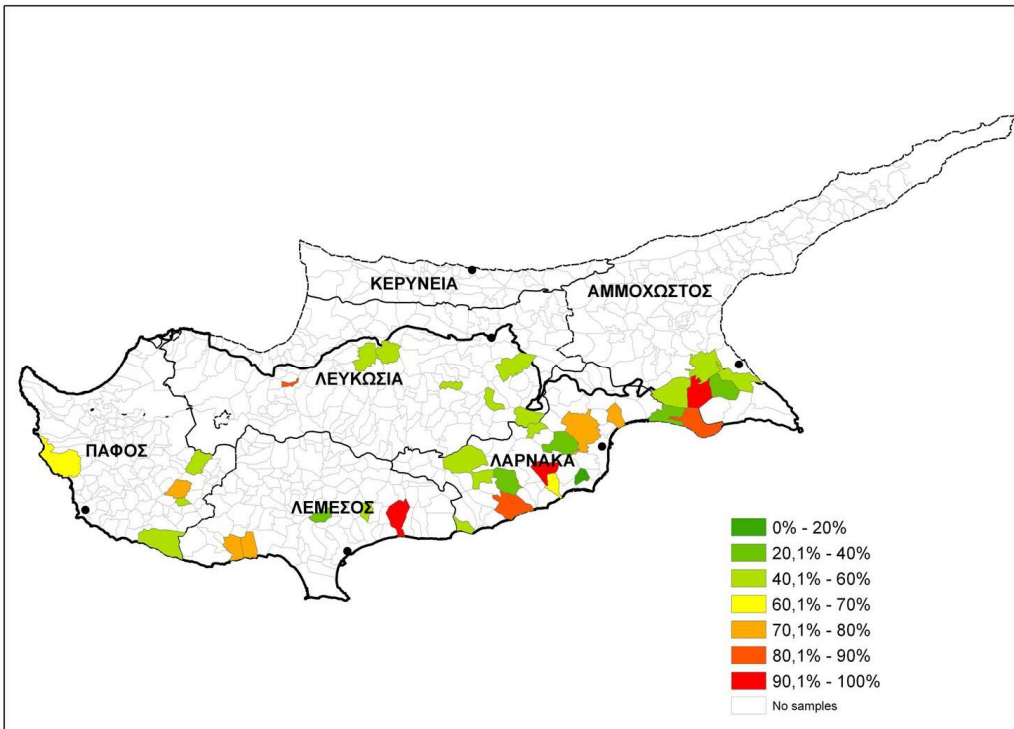


Χάρτης 1: Διασπορά των IgG αντισωμάτων των αιμοδοτών έναντι του *A. phagocytophilum* στην Κρήτη. Το σκορρότερο χρώμα συμβολίζει υψηλότερο επιπολασμό, το ανοιχτότερο χαμηλότερο επιπολασμό.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8

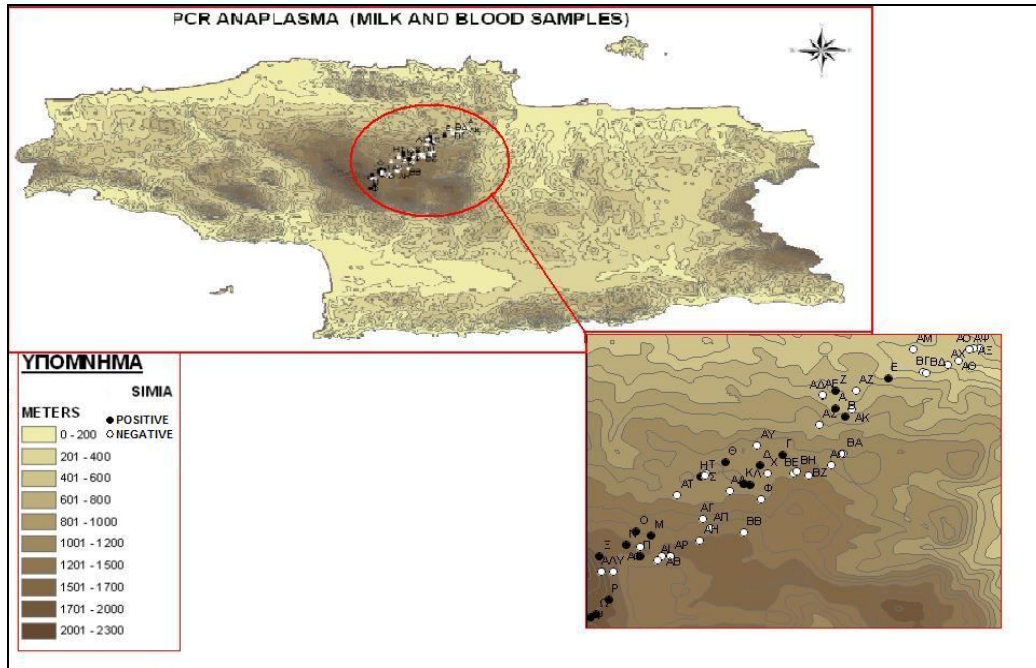


Χάρτης 2: Επιπολασμός έναντι του *A. phagocytophilum* σε δείγματα αιγών στη Κύπρο (cut-off: IgG \geq 1/128).



Χάρτης 3: Επιπολασμός έναντι του *A. phagocytophilum* σε δείγματα προβάτων στη Κύπρο (cut-off: IgG \geq 1/128).

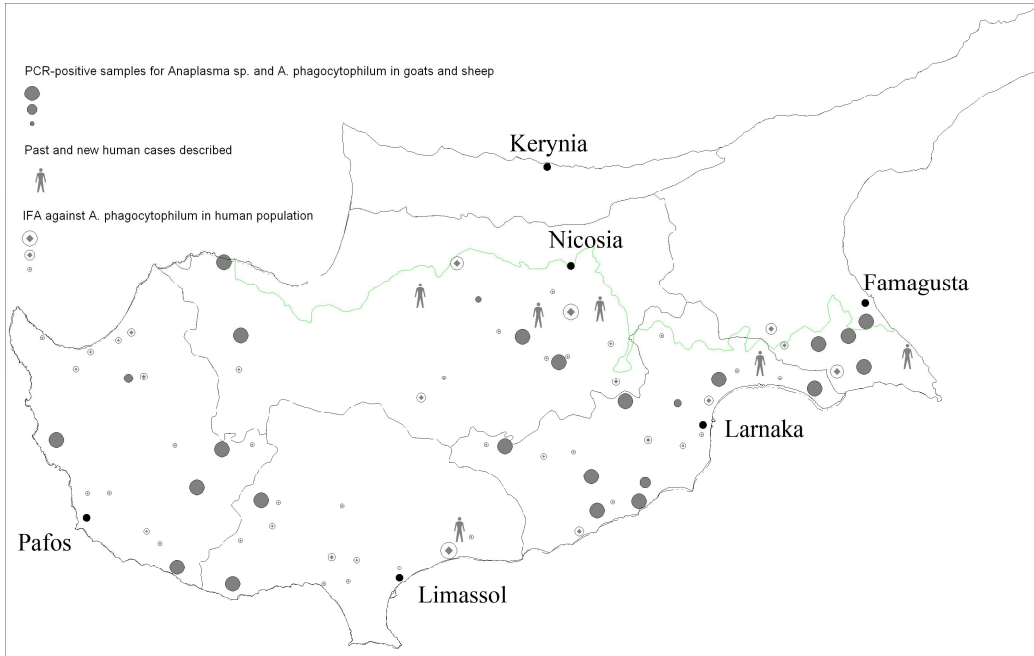
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 10



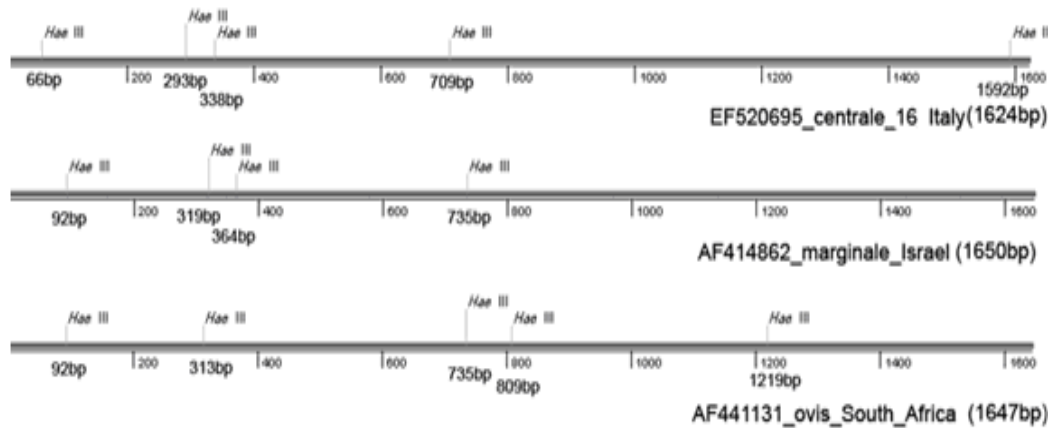
Χάρτης 5: Μοριακός έλεγχος των δειγμάτων (αίμα, γάλα) των προβάτων της περιοχής των Ανωγείων για αναπλάσματα.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβάστες και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11



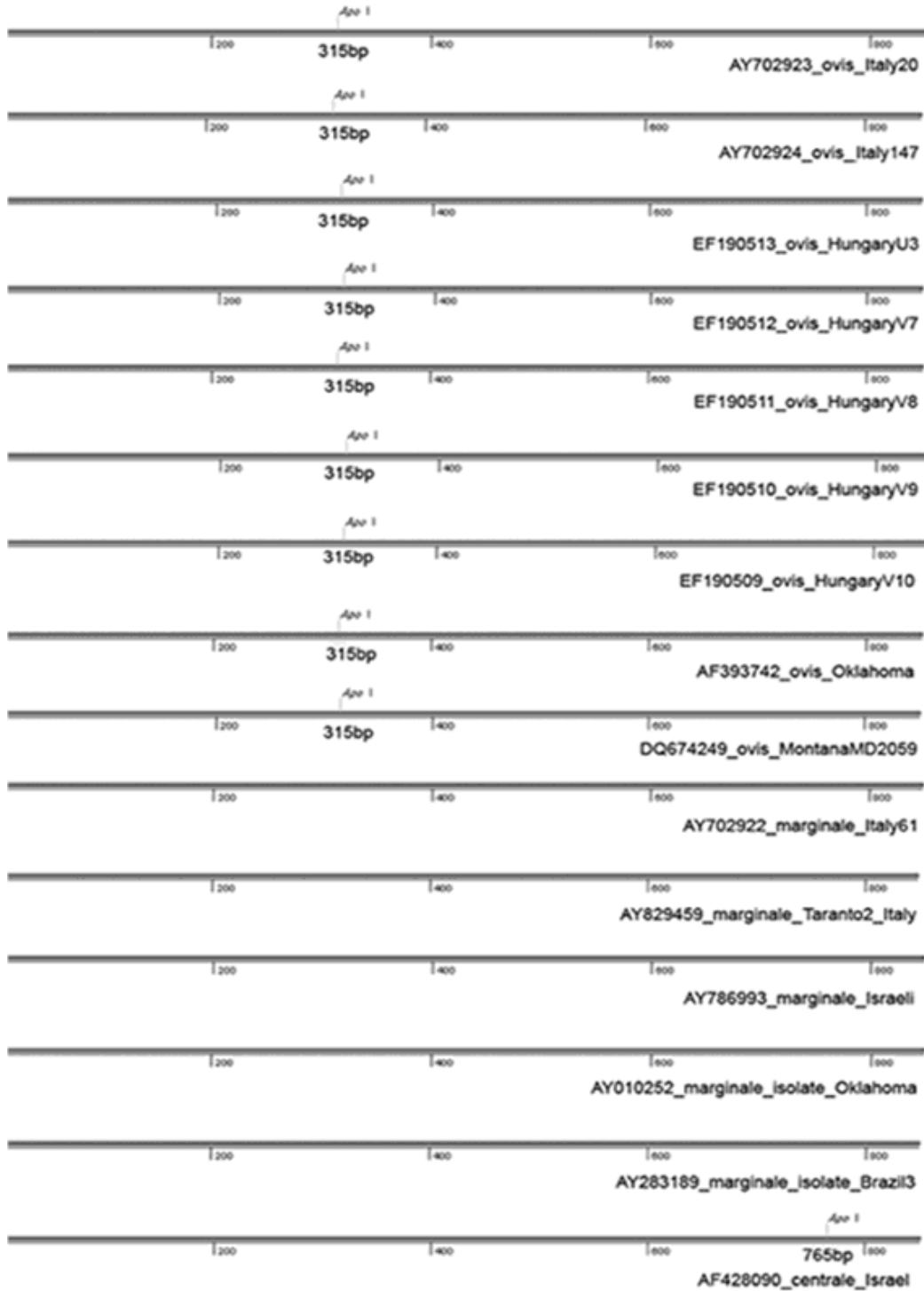
Χάρτης 6: Απεικόνιση των καταγεγραμμένων ανθρώπινων περιστατικών, των περιοχών στις οποίες ανιχνεύθηκε θετική PCR για τα αναπλάσματα και των περιοχών στις οποίες πραγματοποιήθηκε έλεγχος για IgG αντισώματα έναντι του *A. phagocytophilum*. Αυξανόμενη περιφέρεια των κουκίδων συμβολίζει: α) αυξημένο οροεπιπολασμό έναντι του παθογόνου στον ανθρώπινο πληθυσμό και β) αυξημένο αριθμό θετικών δειγμάτων με PCR στα ζώα κτηνοτροφικής σημασίας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 12

Σχήμα 6: Περιοχές κοψίματος του περιοριστικού ενζύμου *HaeIII* στο γονίδιο *groEL*, όπως προβλέφθηκαν από το πρόγραμμα Seqbuilder v7.1 DNASTAR Lasergene. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι AF441131 (*A. ovis* στέλεχος South Africa), AF414862 (*A. marginale* στέλεχος Israel) και EF520695 (*A. centrale* στέλεχος Italy16) όπως ελήφθησαν από το NCBI. Τα accession numbers και τα μεγέθη (σε bp) απεικονίζονται.

«Μελέτη της επιδημιολογίας και της οικολογίας των Αναπλάσμάτων (πρώην Ερλίχιες): προσδιορισμός των φυσικών ξενιστών, ανίχνευση και χαρακτηρισμός των παθογόνων σε υπόδοχα, μεταβιβάστες και στον άνθρωπο στην Ελλάδα και την Κύπρο.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 13





Σχήμα 7: Περιοχές κοψίματος του περιοριστικού ενζύμου *ApoI* στο γονίδιο *msp4*, όπως προβλέφθηκαν από το πρόγραμμα Seqbuilder v7.1 του DNASTAR Lasergene. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι AY702923 (*A. ovis* στέλεχος Italy20), AY702924 (*A. ovis* στέλεχος Italy147), EF190513 (*A. ovis* στέλεχος HungaryU3), EF190512 (*A. ovis* στέλεχος HungaryV7), EF190511 (*A. ovis* στέλεχος HungaryV8), EF190510 (*A. ovis* στέλεχος HungaryV9), EF190509 (*A. ovis* στέλεχος HungaryV10), AF393742 (*A. ovis* στέλεχος Oklahoma), DQ674249 (*A. ovis* στέλεχος Montana MD2059), AY702922 (*A. marginale* στέλεχος Italy61), AY829459 (*A. marginale* στέλεχος Taranto2 Italy), AY786993 (*A. marginale* στέλεχος Israeli), AY010252 (*A. marginale* απομόνωση Oklahoma), AY283189 (*A. marginale* απομόνωση Brazil3) and AF428090 (*A. centrale* στέλεχος Israel) όπως ελήφθησαν από το NCBI. Τα accession numbers και τα μεγέθη (σε bp) απεικονίζονται.