



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

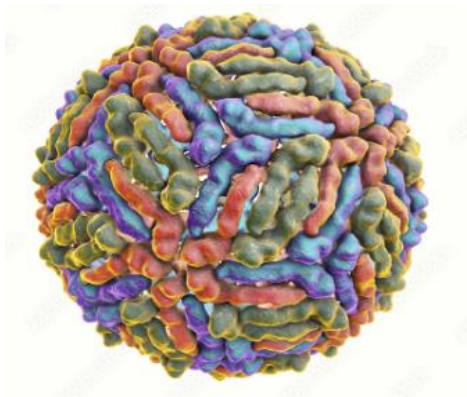
Τμήμα Ιατρικής

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα

«Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

**«Η διαχρονική εξέλιξη της λοίμωξης από τον Ιό του Δυτικού Νείλου-
Επιδημιολογικά δεδομένα από την ελληνική και διεθνή
βιβλιογραφία»**



Γεωργάκη Χάιδω-Νεκταρία

AM: 104

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα

Ιωάννινα, 2023



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

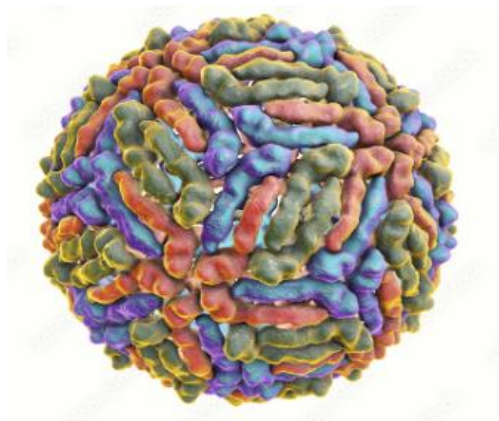
Τμήμα Ιατρικής

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα

«Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

**«Η διαχρονική εξέλιξη της λοίμωξης από τον Ιό του Δυτικού Νείλου-
Επιδημιολογικά δεδομένα από την ελληνική και διεθνή
βιβλιογραφία»**



Γεωργάκη Χάιδω-Νεκταρία

AM: 104

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα

Ιωάννινα, 2023

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Γεωργάκη Χάιδω-Νεκταρία

**«Η διαχρονική εξέλιξη της λοίμωξης από τον Ιό του Δυτικού Νείλου-
Επιδημιολογικά δεδομένα από την ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία»**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: **Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία παρουσίασης:

Εξεταστική Επιτροπή:

- Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας,
Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Ντζάνη Ευαγγελία, Καθηγήτρια Υγιεινής με ιδιαίτερη έμφαση στην
Επιδημιολογία, Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Μποζίδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ιατρικό
Τμήμα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της και ιδιαίτερα στα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής. Θα ήθελα να τονίσω ότι η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη στήριξη και καθοδήγηση της υπεύθυνης καθηγήτριάς μου, κας Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνας. Η κ. Γκαρτζονίκα ανέλαβε την επίβλεψη μετά την αποβίωση του Ηρακλή Σακκά, Επίκουρου Καθηγητή Μικροβιολογίας, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του για την ανάληψη αυτής της εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Γεωργάκη Χάιδω-Νεκταρία,

Ιωάννινα, 2023

Πρόλογος

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus, WNV) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1937 στην Ουγκάντα, ενώ από το 1950 έως το 1980 φαίνεται ότι ήταν άμεσα συνυφασμένος με μια ήπια συνήθως αυτοπεριοριζόμενη εμπύρετη νόσο. Μετά την αρχική του εντόπιση ο ιός εξαπλώθηκε στο Ισραήλ, στην Αίγυπτο, στην Ινδία, στη Γαλλία και στη Νότια Αφρική. Το 1957 αναφέρθηκε και η πρώτη επιδημία νευρολογικής προσβολής από στέλεχος του ιού σε ηλικιωμένους στο Ισραήλ. Τα μετέπειτα κρούσματα περιελάμβαναν τόσο ενήλικες όσο και παιδιατρικές περιπτώσεις με προσβολή του ΚΝΣ. Ωστόσο, από τα μέσα της δεκαετίας του 1990, η συχνότητα, η σοβαρότητα και το γεωγραφικό εύρος των επιδημιών WNV αυξήθηκε και τα κρούσματα μηνιγγίτιδας και εγκεφαλίτιδας έπληξαν το Βουκουρέστι, το Βόλγκογκραντ και το Ισραήλ. Μάλιστα το 1999, ο WNV διέσχισε τον Ατλαντικό και έφτασε στο δυτικό ημισφαίριο παρουσιάζοντας σημαντική εξάπλωση στην Αμερική. Ο ιός πλέον έχει εξαπλωθεί σε μια τεράστια περιοχή του πλανήτη και θεωρείται ο σημαντικότερος αιτιολογικός παράγοντας του ιού της εγκεφαλίτιδας παγκοσμίως.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας αναφορικά με την εξέλιξη της λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου, χρησιμοποιώντας τόσο διεθνείς όσο και ελληνικές επιστημονικές πηγές. Ένας λοιπόν από τους βασικούς λόγους πραγματοποίησης της έρευνας αυτής έγκειται στην αναγνώριση των εξελικτικών τάσεων του ιού καθώς και των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση της λοίμωξης από τον WNV. Ευελπιστούμε μάλιστα ότι μέσα από την μελέτη της σχετικής επιδημιολογίας θα μπορέσουμε να περιορίσουμε την μελλοντική επέκταση του ιού σε νέες θέσεις στον κόσμο υποδεικνύοντας συνάμα την σημαντικότητα της πρόληψης. Άλλωστε όπως πολύ ορθά είχε διατυπώσει και ο πατέρας της Ιατρικής, ο Ιπποκράτης, «Κάλλιον του θεραπεύειν το προλαμβάνειν».

Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος.....	8
Πίνακας εικόνων.....	13
Πίνακες	16
Γραφήματα	16
1. Εισαγωγή	17
➤ 1.1. Ιστορική αναδρομή	17
2. Ιολογία	25
➤ 2.1. Ταξινόμηση του ιού του Δυτικού Νείλου.....	25
➤ 2.2. Οργάνωση Γονιδιώματος WNV.....	27
➤ 2.3. Η πρωτεΐνη του καψιδίου (C).....	30
▪ 2.3.1. Η πρωτεΐνη του φακέλου (E).....	31
▪ 2.3.2. Η Πρωτεΐνη prM/M	33
▪ 2.3.3. Η Πρωτεΐνη NS1.....	34
▪ 2.3.4. Η Πρωτεΐνη NS2A.....	35
▪ 2.3.5. Η Πρωτεΐνη NS2B.....	36
▪ 2.3.6. Η Πρωτεΐνη NS3.....	37
▪ 2.3.7. Η Πρωτεΐνη NS4A.....	37
▪ 2.3.8. Η Πρωτεΐνη NS4B.....	39
▪ 2.3.9. Η Πρωτεΐνη NS5.....	39
➤ 2.4. Κύκλος ζωής του WNV.....	40
➤ 2.5. Διαδικασία αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος του WNV.....	42
3. Οικολογία WNV	45
➤ 3.1. Φορείς WNV.....	45
➤ 3.2. Ξενιστές του WNV	47
➤ 3.3. Ζώα-Δεξαμενές του WNV.....	48
➤ 3.4. Μετάδοση του WNV στα σπονδυλωτά & πιθανοί τρόποι μετάδοσής του στον άνθρωπο.....	50

➤ 3.5. Παράγοντες κινδύνου μόλυνσης και λοίμωξης από WNV.....	52
4. Παθογένεια λοίμωξης από WNV- Παθογενετικοί μηχανισμοί.....	57
➤ 4.1. Τροπισμός & Παθογενετικοί μηχανισμοί WNV.....	57
➤ 4.2. Παθογένεια Νευροδιηθητικής Μορφής.....	62
➤ 4.3. Αιματογενής οδός μετάδοσης WNV.....	63
➤ 4.4. Παθητική Μετανάστευση WNV.....	64
➤ 4.5. Μηχανισμός «Δούρειος ίππος».....	64
➤ 4.6. Μηχανισμός διαμέσου νευρικών οδών	65
➤ 4.7. Παθογένεια Δερματικής Λοίμωξης επαγόμενης από WNV.....	66
➤ 4.8. Παθογένεια Γαστρεντερικής Λοίμωξης επαγόμενης από WNV.....	66
➤ 4.9. Παθογένεια Νεφρικής Λοίμωξης επαγόμενης από WNV.....	67
5. Φυλογενετική ανάλυση & Επιδημιολογικά δεδομένα του WNV.....	68
➤ 5.1. Φυλογένεια WNV & Γενετική διαφοροποίηση εντός των ειδών του WNV9.....	68
➤ 5.2. Μοριακή επιδημιολογία του WNV.....	72
➤ 5.3. Επιδημιολογία και κλινική συμπτωματολογία λοίμωξης από WNV.....	76
➤ 5.4. Επιδημιολογία λοίμωξης από WNV σε Αφρική και Μέση Ανατολή.....	77
➤ 5.5. Επιδημιολογία λοίμωξης από WNV σε Ανατολική και Νότια Ασία, Αυστραλία και Ωκεανία.....	81
➤ 5.6. Επιδημιολογία λοίμωξης από WNV στην Αμερική.....	83
➤ 5.7. Επιδημιολογία λοίμωξης από WNV στην Ευρώπη.....	84
➤ 5.8. Νεότερα δεδομένα επιδημιολογικής επιτήρησης λοιμώξεων WNV στην ΕΕ	86
6. Διάγνωση, Θεραπεία & πρόληψη έναντι WNV.....	93
➤ 6.1. Διάγνωση λοίμωξης από WNV & Διαφοροδιάγνωση από άλλες νόσους	93

➤ 6.2. Θεραπεία λοίμωξης από WNV & Πρόληψη.....	97
7. Συμπεράσματα.....	102
8. Περίληψη.....	105
9. Abstract.....	106
10. Βιβλιογραφία.....	107

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Ο WNV όπως παρατηρήθηκε σε μολυσμένο με WNV εγκεφαλικό ιστό με την αρωγή ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.....	20
Εικόνα 2: Γεωγραφική κατανομή σπουδαιότερων επιδημιών του WNV στην Ινδία.....	21
Εικόνα 3: Κατανομή των σπουδαιότερων επιδημιών του ιού του Δυτικού Νείλου σε παγκόσμια κλίμακα.....	25
Εικόνα 4: a) Εξωτερική κάτοψη δομής ιοσώματος WNV, b) Εγκάρσια διατομή ιοσώματος WNV.....	26
Εικόνα 5: Γονιδιωματική οργάνωση WNV και σύσταση virion. a) Αναπαράσταση του γονιδιώματος του WNV συμπεριλαμβανομένων των 3 δομικών πρωτεϊνών που συνθέτουν το ιοσωμάτιο και των 7 μη δομικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τον ιική αντιγραφή και ανοσολογική διαφυγή, b) Λεπτομερής δομική σύσταση ιοσωματίου WNV.....	27
Εικόνα 6: Απεικόνιση τρισδιάστατης δομής πρωτεΐνης C & αλληλεπίδρασής της με τα λιπίδια των μεμβρανών.....	31
Εικόνα 7: Τρισδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης E του WNV.....	32
Εικόνα 8: Δομική απεικόνιση της PrM στο ανώριμο ιοσωμάτιο και της πρωτεΐνης M στο ώριμο ιοσωμάτιο του WNV.....	33
Εικόνα 9: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης NS1 του WNV.....	34
Εικόνα 10: Τρισδιάστατη δομή της NS2A πρωτεΐνης και της θέσης των καταλοίπων τα οποία επιδρούν στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.....	36
Εικόνα 11: A) Τρισδιάστατη απεικόνιση NS2B-NS3 στον WNV, B) Τρισδιάστατη απεικόνιση NS2B-NS3 στον δάγκειο ιό.....	36
Εικόνα 12: A) Τοπολογία της NS4A στην μεμβράνη του Ενδοπλασματικού Δικτύου, B) Απεικόνιση δομικής ομοιότητας της αλληλουχίας NS4A μεταξύ διαφόρων φλαβοϊών.....	38
Εικόνα 13: Επαγωγή σχηματισμού χαρακτηριστικών μεμβρανικών σχηματισμών έπειτα από μόλυνση με φλαβοϊό A) με διατήρηση της πεπτιδικής αλληλουχίας του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, B) με απομάκρυνση της πεπτιδικής αλληλουχίας του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης.....	38
Εικόνα 14: Τοπολογία πρωτεΐνης NS4B.....	39
Εικόνα 15: Σηματοδοτικό μονοπάτι με το οποίο η NS5 τροποποιεί την ανοσιακή απόκριση.....	40
Εικόνα 16: Κύκλος ζωής και μετάδοση του WNV, a) Συντήρηση WNV μεταξύ πτηνών (δεξαμενή) και φορέων-κουνουπιών, b) απευθείας μετάδοση WNV μεταξύ πτηνών σε φάρμα, c) μετάδοση WNV σε διάφορους ξενιστές (άνθρωπος, άλογο και κροκόδειλος) μέσω τσιμπήματος κουνουπιών, d) μετάδοση WNV μέσω μετάγγισης αίματος και μεταμόσχευσης	

οργάνων στον άνθρωπο, ε) μόλυνση με WNV κροκοδείλου μέσω μολυσμένου με WNV νερού.....	41
Εικόνα 17: Ο κύκλος αντιγραφής του γονιδιώματος του WNV.....	44
Εικόνα 18: Κουνούπι είδους Culex, που συνιστά τον βασικότερο φορέα του WNV.....	45
Εικόνα 19: Μετάδοση του WNV λαμβάνοντας υπόψη τους επιζωοτικούς και ενζωοτικούς κύκλους μετάδοσης.....	52
Εικόνα 20: Παθογενετικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τον ανθρώπινο ιό του Δυτικού Νείλου, α) Μόλυνση κερατινοκυττάρων και κυττάρων Langerhans, (b) Μετανάστευση στον λεμφαδένα, (c) Μετανάστευση στον σπλήνα, (d) Διέλευση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, (e) Προσβολή νευρώνων.....	59
Εικόνα 21: Απεικόνιση των πιο συχνά προσβαλλόμενων περιοχών του ανθρώπινου εγκεφάλου από τον WNV.....	60
Εικόνα 22: Απεικόνιση των βημάτων που ακολουθεί ο WNV κατά την σπλαχνική και νευρική προσβολή στον άνθρωπο.....	61
Εικόνα 23: Νευροδιηθητικοί μηχανισμοί του WNV, α) Παθητική μετανάστευση ελεύθερων σωματιδίων του ιού κατά μήκος του διαταραγμένου αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) έπειτα από αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, b) Μηχανισμός «δούρειου ίππου» μέσω μετανάστευσης μολυσμένων μακροφάγων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, c) Άμεση μόλυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων, d) Ανάδρομη αξονική μεταφορά του WNV, e) Μετανάστευση WNV στον ωτιαίο μυελό, f) Μετανάστευση WNV από το ωτιαίο μυελό στον εγκέφαλο και αντίστροφα, g) Νευροδιηθητικός μηχανισμός με δράση μέσω του οσφρητικού νεύρου. Στην εικόνα απεικονίζονται επίσης: (1) αστροκύτταρα, (2) μικρογλοία, (3) σωματίδια WNV και (4) μεταναστευτικά μακροφάγα.....	63
Εικόνα 24: Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας για τον ιό του Δυτικού Νείλου.....	69
Εικόνα 25: Γεωγραφική κατανομή των γενοτύπων του WNV σε παγκόσμια κλίμακα.....	70
Εικόνα 26: Φυλογενετικό δέντρο της γενεαλογικής γραμμής 2 του WNV στην Ελλάδα και σύγκρισή της με άλλες γνωστές γενεαλογικές γραμμές του ιού.....	72
Εικόνα 27: Κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης στην ΕΕ για τα έτη 2015–2019.....	88
Εικόνα 28: Κατανομή των ανθρώπινων και ζωικών κρουσμάτων από WNV που έχουν καταγραφεί κατά το 2023 στην ΕΕ και τις γειτονικές χώρες.....	91

Πίνακες

Πίνακας 1: Σύνοψη των πρωτεϊνών του WNV και των βασικών τους λειτουργιών.....	30
Πίνακας 2: Παράγοντες ανοσοποιητικού που σχετίζονται άμεσα με την νευρολογική προσβολή από WNV.....	57
Πίνακας 3: Υποκαταστάσεις αμινοξέων στις ιικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μολυσματικότητα της γενεαλογίας 2 του WNV.....	74
Πίνακας 4: Κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης ανά ευρωπαϊκή χώρα και έτος, για τα έτη 2015–2019.....	88
Πίνακας 5: Επιδημιολογικά δεδομένα Ελλάδας για τα έτη 2010-2022.....	92
Πίνακας 6: Αριθμητική και ποσοστιαία κατανομή των κρουσμάτων με λοίμωξη από τον ιό του WNV με προσβολή του ΚΝΣ ανά ηλικιακή ομάδα, στην Ελλάδα, για τα έτη 2010-2022.....	93
Πίνακας 7: Βασικές εργαστηριακές δοκιμασίες που διενεργούνται για τη διάγνωση της λοίμωξης από WNV.....	96
Πίνακας 8: Διαφοροδιάγνωση λοίμωξης από WNV από άλλες νόσους	97
Πίνακας 9: Εγκεκριμένα εμβόλια κατά του WNV σε ίππους	100
Πίνακας 10: Επιλεγμένες κλινικές δοκιμές ανθρώπινων εμβολίων κατά του WNV	101

Γραφήματα

Γράφημα 1: Κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης στην ΕΕ ανά μήνα, για τα έτη 2015–2018 και 2019.....	89
Γράφημα 2: Κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης στην ΕΕ ανά 100.000 πληθυσμού, βάσει ηλικίας και φύλου.....	90

1. Εισαγωγή

Οι φλαβοϊοί είναι μονόκλωνοι RNA ιοί θετικής πολικότητας που μεταδίδονται κυρίως από αρθρόποδα και περιλαμβάνουν μερικά από τα πιο σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα όπως είναι ο ιός του Δάγγειου πυρετού (DENV1-4), ο ιός του Κίτρινου πυρετού (YFV), ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) και ο ιός Zika (ZIKV). Οι φλαβοϊοί εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων που κυμαίνεται από ασυμπτωματικό κλινικό προφίλ ή ήπιο πυρετό έως αιμορραγική νόσο όπως παρατηρείται στον Δάγγειο και στον Κίτρινο πυρετό. Οι φλαβοϊοί μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε νευρολογικές διαταραχές λόγω προσβολής του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (van Leur et al., 2021). Αυτά τα παθογόνα αποτελούν σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία και όχι μόνο, ενώ σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) ο ιός του Δυτικού Νείλου ευθύνεται για 51.607 καταγεγραμμένες περιπτώσεις ανθρώπινης λοίμωξης, από το 1999 μέχρι και το 2019, εκ των οποίων οι 25.161 οδήγησαν σε νευρολογική λοίμωξη (μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα) (Chowdhury & Khan, 2021).

1.1 Ιστορική αναδρομή

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) απομονώθηκε για πρώτη φορά από έναν εμπύρετο ασθενή από την περιοχή του Δυτικού Νείλου της Βόρειας Ουγκάντα, το 1937 (Smithburn et al., 1940). Ο συγκεκριμένος μάλιστα ασθενής παρουσιάστηκε στο πλαίσιο μιας μεγάλης επιδημιολογικής μελέτης περί του ιού του κίτρινου πυρετού. Εντύπωση δε προκάλεσε το γεγονός ότι εμβολιασμοί επιμύων με τον ορό του ασθενούς είχαν ως αποτέλεσμα την απομόνωση ενός ιού με παρόμοιες φυσικές και παθολογικές ιδιότητες μεταξύ δύο τότε γνωστών φλαβοϊών και ειδικότερα του ιού της εγκεφαλίτιδας του St. Louis και του Ιαπωνικού ιού της εγκεφαλίτιδας Β. Αν και ο πρώτος εκείνος ασθενής παρουσίαζε μόνο πυρετό, οι αρχικές μελέτες που διενεργήθηκαν σε σχέση με τον ιό του Δυτικού Νείλου έδειξαν ότι η σχετική παθογένεια της νόσου αφορούσε πρωτίστως το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), υποδηλώνοντας υπό αυτή την έννοια τη νευροτροπική φύση του ιού (Sejvar, 2003).

Η πρώτη αναγνωρισμένη επιδημία του WNV εμφανίστηκε στο Ισραήλ το 1951 σε μια μικρή πόλη έξω από τη Χάιφα, όπου σημειώθηκαν συνολικά 123 κρούσματα χωρίς

κάποιο θάνατο μεταξύ των 303 κατοίκων. Μάλιστα αξίζει να σημειωθεί ότι τα μικρά παιδιά αντιπροσώπευαν την πλειοψηφία των περιπτώσεων με λοίμωξη από WNV. Κατά τη διάρκεια αυτής της επιδημίας περιγράφηκαν και τα διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την συγκεκριμένη λοίμωξη, με κύρια συμπτώματα τον πυρετό, τον πονοκέφαλο, τις μυαλγίες, την ανορεξία, το κοιλιακό άλγος, το εξάνθημα και τον έμετο, ενώ η λεμφαδενοπάθεια, η στηθάγχη και η διάρροια ήταν λιγότερο συχνές (Bernkopf et al., 1953).

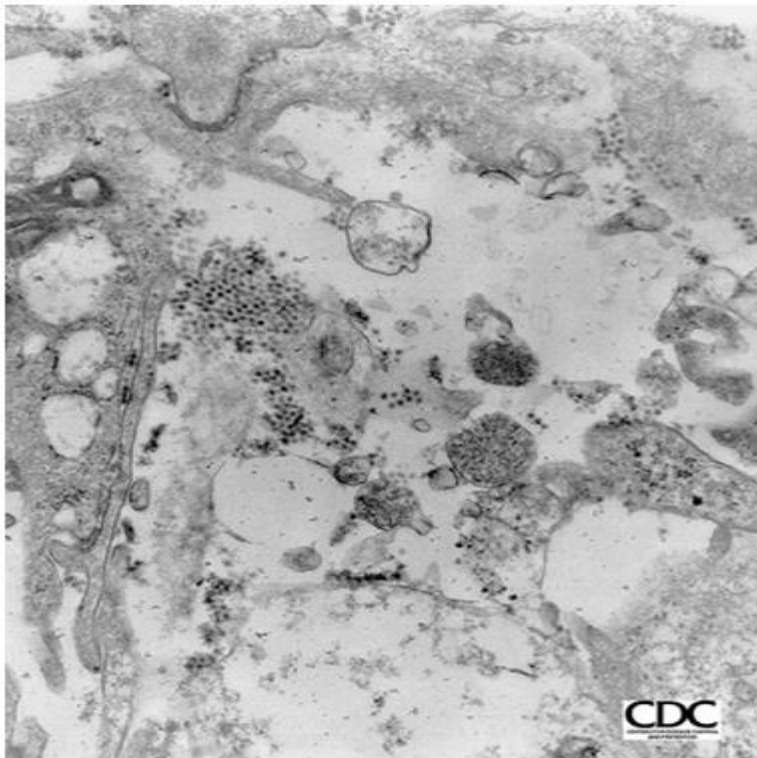
Κομβική σημασία στην κατανόηση της νόσου διαδραμάτισε ο μεγάλος αριθμός των επιδημιών του WNV που έλαβε χώρα στην Αίγυπτο μεταξύ των ετών 1951 και 1954, διότι οδήγησε σε μια περαιτέρω κατανόηση της οικολογίας, της επιδημιολογίας και των κλινικών χαρακτηριστικών του εν λόγω ιού (Murgue et al., 2001; Taylor et al., 1956). Λόγω λοιπόν της ανίχνευσης του WNV στο αίμα πολλών παιδιών και του υψηλού ποσοστού οροθετικού επιπολασμού στους κατοίκους ενός χωριού του Καΐρου το 1950, ξεκίνησε μια εκτεταμένη μελέτη του WNV το 1951 στην περιοχή του άνω Δέλτα του Νείλου. Πιο συγκεκριμένα, οι μελέτες αυτές περιελάμβαναν ορολογικές έρευνες ανθρώπων και ζώων, απομόνωση και ταυτοποίηση των φορέων του ιού, πειραματική μόλυνση πτηνών, ιπποειδών, αρθροπόδων και ανθρώπων καθώς και οικολογικές αξιολογήσεις. Μάλιστα, τα ευρήματα από τις προαναφερθείσες μελέτες αύξησαν κατά πολύ την κατανόηση των διαφόρων κλινικών και επιδημιολογικών πτυχών του ιού. Έτσι, οι ορολογικές έρευνες έδειξαν ότι ο WNV ήταν ενδημικός κατά μήκος του Νείλου, με τα ποσοστά επιπολασμού να πλησιάζουν το 60%. Επιπλέον, τα μεγαλύτερα παιδιά και οι ενήλικες φάνηκε να έχουν υψηλότερο οροθετικό επιπολασμό, ενώ τα μικρότερα παιδιά φάνηκαν να έχουν μια πιο συμπτωματική ασθένεια, υποδηλώνοντας κατά αυτή την έννοια ότι η λοίμωξη από WNV ήταν κυρίως μια λοίμωξη της πρώιμης παιδικής ηλικίας. Στο σύνολό τους οι συγκεκριμένες λοιμώξεις ήταν χαρακτηριστικά αυτοπεριοριζόμενες, εμπύρετες λοιμώξεις που σπανίως συνοδεύονταν από μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα. Ειδικά όσον αφορά τις ορολογικές έρευνες που διεξήχθησαν στα ζώα έδειξαν το γεγονός ότι ο ιός ήταν μολυσματικός σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, συμπεριλαμβανομένων των πτηνών και των θηλαστικών, πλην του ανθρώπου, ενώ το σύνολο των πτηνών και ιδίως τα κοράκια βρέθηκε ότι διέθεταν άφθονα αντισώματα κατά του WNV. Επιπρόσθετα, ο ιός βρέθηκε ότι είναι μολυσματικός για έναν σημαντικό αριθμό μη ανθρώπινων

θηλαστικών αλλά πιο διαδεδομένος στα ιπποειδή, στα οποία υπήρχε συχνά συμπτωματική και θανατηφόρα λοίμωξη (Taylor et al., 1956).

Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει για το γεγονός ότι η μετάδοση του ιού-η οποία διαμεσολαβείται από ενδιάμεσους ξενιστές-είχε προταθεί αρκετά χρόνια νωρίτερα βάσει μελετών οικολογίας που εστίαζαν στην μετάδοση της νόσου (Philip & Smadel, 1943). Επιπλέον, βαρύνουσας σημασίας ήταν η ανακάλυψη στην Αίγυπτο ότι ο ιός θα μπορούσε να απομονωθεί μόνο από κουνούπια, και όχι από άλλα αρθρόποδα και έτσι προτάθηκε ότι τα κουνούπια αποτελούν τον κύριο φορέα του ιού (Taylor et al., 1956). Αυτό μετέπειτα τεκμηριώθηκε από την διαπίστωση ότι μόνο τα κουνούπια μπορούσαν να διατηρήσουν έναν κύκλο μόλυνσης ενός ξενιστή μέσω της σίτισης, που έπεται της μετάδοσης μέσω του τσιμπήματος. Πιο συγκεκριμένα, τα κουνούπια του είδους *Culex* φάνηκε ότι είναι οι κύριοι φορείς της νόσου. Επίσης, κατά τις αιγυπτιακές έρευνες, μια σειρά ανθρώπινων πειραματικών λοιμώξεων κατέδειξε σημαντικές πτυχές της δυναμικής της ανθρώπινης ιαιμίας (Southam & Moore, 1951; 1954). Τότε μάλιστα άτομα με ανίατα νεοπλάσματα εμβολιάστηκαν με ιούς επάγοντας πυρετογόνο λοίμωξη σε μια προσπάθεια αναστολής της ανάπτυξης ή της εξάπλωσης του καρκίνου. Στο πλαίσιο αυτό πρέπει να διευκρινιστεί ότι υπήρχαν δύο ξεχωριστές σειρές ασθενών οι οποίες αξιολογήθηκαν μετά τον εμβολιασμό με WNV, ενώ στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών αυτών, ο πυρετός ήταν το μόνο κλινικό χαρακτηριστικό, αν και ορισμένοι ασθενείς ανέπτυξαν κλινικά εγκεφαλίτιδα. Αυτές λοιπόν οι πειραματικές λοιμώξεις υπέδειξαν επίσης ότι ο ιός θα μπορούσε να ανιχνεύεται στο αίμα το συντομότερο 24 ώρες μετά από την μόλυνση και ότι η ιαιμία θα μπορούσε να επιμείνει για 6 έως 12 ημέρες, και ίσως περισσότερο. Από τις παραπάνω μελέτες φάνηκε επίσης ότι η εμμένουσα ιαιμία συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της εκδηλούμενης ασθένειας (Sejvar, 2003).

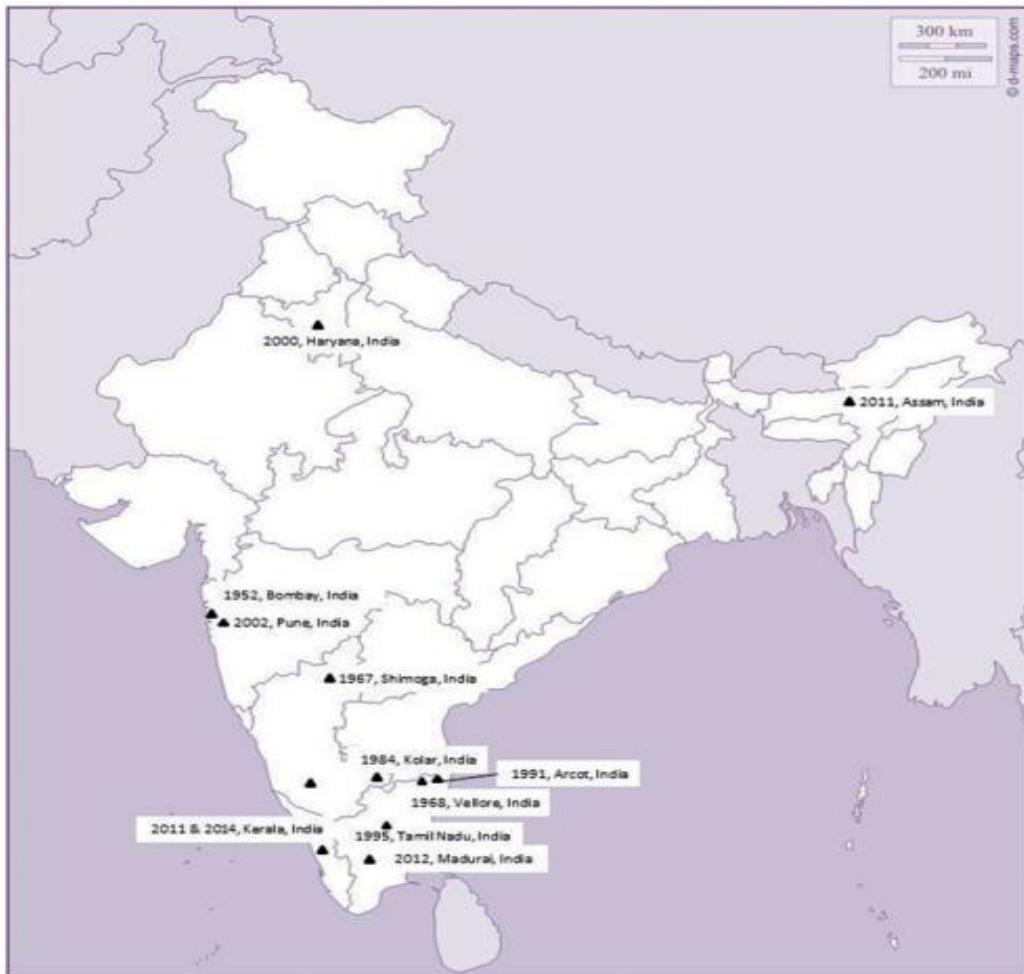
Εν τω μεταξύ, στη νότια Ινδία μεταξύ 1955–1957 περιγράφηκαν δύο στελέχη WNV που απομονώθηκαν από τον *Culex fatigans*. Το 1957, σε μια επιδημία του WNV που εμφανίστηκε στο Ισραήλ, έγιναν οι πρώτες αναφορές για σοβαρές νευρολογικές εκδηλώσεις σε μια ομάδα ηλικιωμένων κατοίκων ενός γηροκομείου (Hayes, 2019). Πριν από αυτό το γεγονός, θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι δεν είχε αναφερθεί νευρολογική εκδήλωση της νόσου σε τέτοια έκταση. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια των επακόλουθων κρουσμάτων, που εμφανίστηκαν συμπεριλαμβανομένης της Γαλλίας το 1962 και της Νότιας Αφρικής το 1974, αναγνωρίστηκαν ασθενείς με μηνιγγίτιδα ή

εγκεφαλίτιδα (McIntosh et al., 1976; Panthier et al., 1968). Ωστόσο οι νευρολογικές εκδηλώσεις ήταν σπάνιες όπως προαναφέρθηκε, με την συντριπτική πλειονότητα των συμπτωματικών ασθενών να αναπτύσσει μια ήπια, αυτοπεριοριζόμενη εμπύρετη νόσο. Ορολογικά αποδεδειγμένες περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας αναφέρθηκαν μετέπειτα στη νοτιοδυτική Ινδία τα έτη 1977, 1979 και 1981, καθώς τότε επιτεύχθηκε απομόνωση του ιού από τον εγκεφαλικό ιστό μολυσμένων ατόμων (Εικόνα 1) (George et al., 1984; Rossi et al., 2010).



Εικόνα 1: Ο WNV όπως παρατηρήθηκε σε μολυσμένο με WNV εγκεφαλικό ιστό με την αρωγή ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Η εικόνα 2 παρουσιάζει τις σπουδαιότερες επιδημίες του WNV στην Ινδία (David & Abraham, 2016).



Εικόνα 2: Γεωγραφική κατανομή σπουδαιότερων επιδημιών του WNV στην Ινδία.

Αξιοσημείωτη είναι ακόμη η Αφρικανική επιδημία του 1974, κατά την οποία αν και προέκυψαν εμπύρετα σε χιλιάδες περιπτώσεις ασθενών, υπήρξε μόνο μία περίπτωση εγκεφαλίτιδας. Μεταγενέστερες παρόμοιες επιδημίες συνέχισαν να εμφανίζονται σποραδικά σε διάφορες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ρωσίας, της Ισπανίας, της Νότιας Αφρικής και της Ινδίας, ενώ περιορίστηκαν σημαντικά κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1970 και κατά την δεκαετία του 1980 (Hubálek & Halouzka, 1999).

Άξια αναφοράς είναι μια επιδημία WNV που εμφανίστηκε στην περιοχή γύρω από το Βουκουρέστι της Ρουμανίας και ήταν αξιοσημείωτη για διάφορους λόγους. Έτσι, πρόκειται για την πρώτη επιδημία του WNV η οποία εντοπίστηκε σε ένα κυρίως αστικό περιβάλλον, ενώ ήταν επίσης η πρώτη εστία του ιού στην οποία η πλειονότητα των συμπτωματικών περιπτώσεων αφορούσε λοίμωξη του ΚΝΣ. Η επιδημία της Ρουμανίας μελετήθηκε εκτενώς και υπέδειξε πολλά πράγματα σχετικά με την μεταβαλλόμενη επιδημιολογία του ιού. Έτσι, αξίζει να αναφερθεί ότι το

συνολικό ποσοστό επιπολασμού στους κατοίκους του Βουκουρεστίου κατά την περίοδο της επιδημίας ήταν περίπου 4%, χωρίς να υπάρχει κάποια ιδιαίτερη συσχέτιση με μια συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα, φύλο ή γεωγραφική θέση στην πόλη. Επιπλέον, ορολογικά δείγματα που ελήφθησαν από κατοίκους του Βουκουρεστίου που προϋπήρχαν της επιδημίας υποδήλωσαν ότι, ως επί το πλείστον, ο πληθυσμός της πόλης ήταν ορολογικά άγνωστος στον WNV και άρα πολύ ευαίσθητος σε αυτόν. Μάλιστα σύμφωνα με σχετικές επιδημιολογικές μελέτες, ορισμένοι παράγοντες που επικρατούσαν στο μάλλον υποβαθμισμένο αστικό περιβάλλον του Βουκουρεστίου φαίνεται ότι συνέβαλαν στην επιδημία, συμπεριλαμβανομένης της ύπαρξης μιας πληθώρας περιοχών που ευνοούν την αναπαραγωγή των κουνουπιών, πολλών ξενιστών με τη μορφή οικόσιτων πτηνών και της απουσίας προστατευτικών φραγμών, όπως οι σίτες σε παράθυρα και πόρτες. Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις των κρουσμάτων, η νόσος ήταν ηπιότερη και δεν παρατηρήθηκε λοίμωξη του ΚΝΣ, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενδεχομένως η παρακολούθηση των περιστατικών να μην ήταν η καλύτερη δυνατή, για τον αποτελεσματικό εντοπισμό τέτοιων περιπτώσεων (Campbell et al., 2001; Tsai et al., 1998).

Έπειτα από την επιδημία του 1996 στη Ρουμανία, έλαβαν χώρα και αρκετές μεταγενέστερες επιδημίες που σχετίζονταν με σχετικά υψηλά ποσοστά λοίμωξης του ΚΝΣ σε όλη την Μέση Ανατολή και την Ευρώπη, συμπεριλαμβανομένου του Μαρόκου το 1996, της Τυνησίας το 1997 καθώς και της Ιταλίας και του Ισραήλ το 1998. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι από το 1996 και έπειτα, τα κρούσματα του WNV εμφανίζονταν ολοένα και περισσότερο συχνά, ενώ οι προαναφερθείσες επιδημίες συσχετίστηκαν αφενός με υψηλότερα ποσοστά σοβαρής νόσου του ΚΝΣ και αφετέρου με υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας, κυρίως ηλικιωμένων ατόμων (Hubálek & Halouzka, 1999; Sejvar, 2003).

Αξιοσημείωτη ήταν και η επιδημία της Τυνησίας το 1997, η οποία αφορούσε 173 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν με μηνιγγίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και 8 θανάτους με τους περισσότερους από τους μισούς ασθενείς να είναι άνω των 50 ετών. Μια επιδημία παρόμοιας βαρύτητας ήταν και εκείνη που έλαβε χώρα στην περιοχή Βολγκογκράντ της Ρωσίας στις αρχές του καλοκαιριού του 1999, η οποία αφορούσε 183 ορολογικά επιβεβαιωμένα κρούσματα, με 84 περιπτώσεις οξείας μηνιγγοεγκεφαλίτιδας και 40 θανάτους. Σε αυτή την επιδημία, θα πρέπει να τονιστεί

ότι πάνω από το 75% των θανάτων σημειώθηκαν σε ασθενείς άνω των 60 ετών (Platonov et al., 2001).

Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει για το στέλεχος WNV NY99, το οποίο προκάλεσε την αρχική εστία στην πόλη της Νέας Υόρκης, των ΗΠΑ, το 1999. Ειδικότερα, το στέλεχος αυτό προκάλεσε 59 περιπτώσεις μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, συμπεριλαμβανομένων επτά θανάτων (Mostashari et al., 2001). Μάλιστα, πρόκειται για ένα στέλεχος της γενεαλογικής γραμμής 1 το οποίο εμφάνιζε πολλές ομοιότητες με το στέλεχος που προκάλεσε την επιδημία στο Ισραήλ το 1998 (Jia et al., 1999). Έτσι, ο WNV εισήχθη στη Βόρεια Αμερική για πρώτη φορά. Από τότε, ο WNV συνέχισε να εξαπλώνεται, έως το 2000 στις γειτονικές πολιτείες του New Jersey και Κονέκτικατ (CDC, 2001). Ενδεικτικά αξίζει να αναφερθεί ότι έως και το 2001 είχε ήδη εξαπλωθεί σε 10 πολιτείες, έως το 2002 σε 40 πολιτείες και μέχρι το 2004 και στις 48 συνεχόμενες πολιτείες των ΗΠΑ (Moudy et al., 2007). Ένας νέος ιικός γονότυπος, ο WNO2, αντικατέστησε το NY99 στέλεχος στα κρούσματα του 2002–2003. Τα κρούσματα του WNV μετέπειτα αναφέρθηκαν και σε άλλα μέρη της Βόρειας Αμερικής όπως το Οντάριο και το Κεμπέκ στον Καναδά κατά τα έτη 2001–2003, 2007 και 2012. Επίσης αναφέρθηκαν περιστατικά ανθρώπινης εγκεφαλίτιδας στα Νησιά της Καραϊβικής κατά τα τέλη του 2001 και του 2003. Βρέθηκαν επίσης αντισώματα κατά του WNV στο αίμα πτηνών και αλόγων στην Τζαμάικα, στη Δομινικανή Δημοκρατία, στη Γουαδελούπη, στο Πουέρτο Ρίκο, στο Μεξικό, στο Τρινιδάδ και στην Κούβα (Komar & Clark, 2006). Σημαντική επίτευξη ήταν η απομόνωση του WNV από αιμοδότες το 2007 στο Πουέρτο Ρίκο. Έτσι, βρέθηκε ότι υπεύθυνη για την δεδομένη εξάπλωση ήταν η μετάλλαξη V159A στο γονίδιο του φακέλου που ήταν χαρακτηριστικό του γονότυπου WN02, ο οποίος αντικατέστησε το στέλεχος NY99 στις ΗΠΑ (Hunsperger et al., 2009). Υπενθυμίζεται ότι έως και τότε είχαν αναφερθεί κρούσματα WNV με προσβολή του ΚΝΣ σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες συμπεριλαμβανομένης της Δυτικής Ουκρανίας (1985), της Ρουμανίας (1996), της Ρωσίας (1999), της Γαλλίας (2000–2003), της Ιταλίας (2008–2009) και της Ουγγαρίας (2008) (David & Abraham, 2016).

Συνολικά, για τα έτη 2009–2013, ποικίλα προγράμματα επιτήρησης για τον ιό του Δυτικού Νείλου σε ευρωπαϊκές χώρες έχουν καταγράψει κρούσματα στην Ιταλία (με στελέχη της γενεαλογικής γραμμής 1 και 2), Αλγερία, Βουλγαρία, Κροατία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιταλία, Κόσσοβο, Μαυροβούνιο, πρώην Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της

Μακεδονίας, Ρωσία, Σερβία, Ισπανία, Πορτογαλία, Κροατία και Αυστρία (Merdić et al., 2013; Napoli et al., 2013; Stiasny, Aberle, & Heinz, 2013), ενώ φαίνεται ότι δεν έχει επηρεαστεί σημαντικά το Ηνωμένο Βασίλειο από τον WNV, καθώς οροθετικότητα έχει εμφανιστεί σε μικρό βαθμό κυρίως σε πτηνά (Morgan, 2006). Ξεχωριστή αναφορά πρέπει να γίνει για τον ιό Kunjin (ένα υποείδος της γενεαλογίας 1 του WNV) που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1960 στην Αυστραλία και συνέχισε να προκαλεί σε ανθρώπους και άλογα λοιμώξεις στη βορειοδυτική επικράτεια της Αυστραλίας. Σημαντικό για τον WNV έτος ήταν και το 2011, όπου έλαβε χώρα μια επιδημία WNV, που έπληξε πλήθος ίππων στη νοτιοανατολική Αυστραλία και όπως διαπιστώθηκε προκλήθηκε από ένα στέλεχος WNV (NSW2011) που ήταν πιο νευροδιηθητικό από τα προηγούμενα κυκλοφορούντα στελέχη (Doherty et al., 1963; Frost et al., 2012; Russell & Dwyer, 2000). Το 2013, εμφανίστηκε ανθρώπινο κρούσμα WNV, στην επαρχία Σιντζιάνγκ της βορειοδυτικής Κίνας, η οποία εμφάνισε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τον Ιαπωνικό ιό εγκεφαλίτιδας (Li X-L et al., 2013). Η λοίμωξη με WNV εκδηλώθηκε σε τρεις από τους 108 ασθενείς (2,8%) με εγκεφαλίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, με αποτέλεσμα να κάνει την εμφάνισή της η πρώτη αναφερόμενη περίπτωση εγκεφαλίτιδας WNV στη Σρι Λάνκα (Lohitharajah et al., 2015).

Όσον αφορά την Ελλάδα, ως προς τις ανακλύσασες λοιμώξεις από WNV, αξίζει να υπογραμμιστεί ότι η μεγαλύτερη επιδημία σημειώθηκε το 2010, ενώ πριν από τότε η νόσος δεν είχε αναφερθεί στο παρελθόν εντός των συνόρων της (Anastasiadou et al., 2013; Papa et al., 2010). Τότε λοιπόν, πέρα από τα υποκλινικά και ήπια περιστατικά, 197 ασθενείς παρουσίασαν προσβολή του ΚΝΣ, ενώ 33 από αυτούς (17%) απεβίωσαν. Τα κρούσματα παρατηρήθηκαν κυρίως στην Κεντρική Μακεδονία της Βόρειας Ελλάδας, όπου η συχνότητα εμφάνισης της νόσου εκτιμήθηκε στα 15 άτομα ανά 100.000 πληθυσμού, με τα υψηλότερα κρούσματα να εντοπίζονται στις επαρχίες της Πέλλας και της Ημαθίας (28,26 και 27,06 ανά 100.000 πληθυσμού, αντίστοιχα) (Danis et al., 2011). Λίγες ημέρες μετά την έναρξη της επιδημίας, ο φυλογενετικός κλάδος 2 του WNV (στέλεχος Nea Santa/2010/Greece) ανιχνεύθηκε σε κουνούπια που συλλέχθηκαν σε περιοχές όπου είχαν παρατηρηθεί ανθρώπινα κρούσματα (Papa, Xanthoroulou et al., 2011). Πανομοιότυπα στελέχη εντοπίστηκαν σε όλες τις μετέπειτα μελέτες στις οποίες διενεργήθηκε αιμοληψία σε κουνούπια, άγρια και οικόσιτα πτηνά (Chaskoroulou et al., 2011; Papa et al., 2012; Valiakos et al., 2011).

Έτσι, διεξήχθη το συμπέρασμα ότι η επιδημία προκλήθηκε από αυτό το συγκεκριμένο στέλεχος, το οποίο είναι γενετικά παρόμοιο με αυτό που απομονώθηκε από ένα νεκρό οικόσιτο πτηνό στην Ουγγαρία το 2004. Ωστόσο θα πρέπει να τονιστεί ότι στην περίπτωση της Ελλάδας παρουσιάστηκαν 44 μεταλλάξεις, μία από τις οποίες είχε ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση των αμινοξέων H249P στην πρωτεΐνη NS3 (Para, Bakonyi et al., 2011). Μάλιστα, αυτή η συγκεκριμένη μετάλλαξη είχε προηγουμένως συσχετιστεί με αυξημένη ικανότητα αντιγραφής σε κορονοϊούς σε στελέχη του φυλογενετικού κλάδου 1 του WNV (Brault et al., 2007). Αν και φαίνεται ότι πολλοί παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεση του WNV, αυτή η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να εξηγήσει τη διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης και στα ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ Ελλάδας και Ουγγαρίας, όπου στην τελευταία διαγνώστηκαν 6 μόλις περιπτώσεις προσβολής του ΚΝΣ μεταξύ 2003 και 2007 (κατά μέσο όρο, ετησίως) και 14 περιπτώσεις το 2008 (Anastasiadou et al., 2013; Krisztalovics et al., 2008). Συνολικά, στην εικόνα 3, απεικονίζεται η κατανομή των σπουδαιότερων επιδημιών του ιού του Δυτικού Νείλου σε παγκόσμια κλίμακα (David & Abraham, 2016).

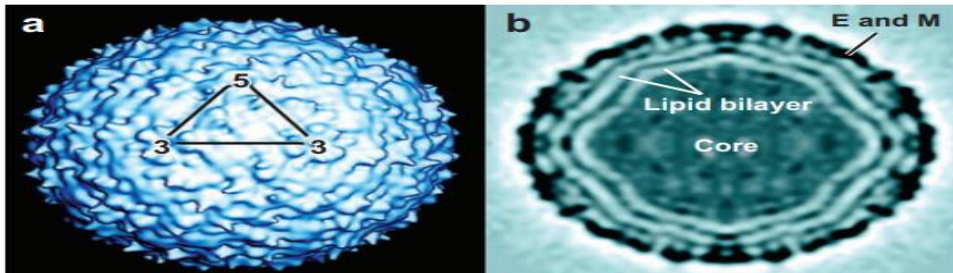


Εικόνα 3: Κατανομή των σπουδαιότερων επιδημιών του ιού του Δυτικού Νείλου σε παγκόσμια κλίμακα.

2. Ιολογία

2.1 Ταξινόμηση του ιού του Δυτικού Νείλου

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) είναι μέλος του γένους *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*, η οποία περιέχει περίπου 70 μέλη, τα περισσότερα από τα οποία μεταδίδονται είτε από κουνούπια είτε από τσιμπούρια (Calisher et al., 1989). Ο WNV ταξινομείται εντός του ορολογικού συμπλέγματος των ιών της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας βάσει της διασταυρούμενης αντίδρασης εξουδετέρωσης και διαφόρων μοριακών γενετικών αναλύσεων (Kuno et al., 1998). Πρόσφατες μελέτες έχουν χαρακτηρίσει εκτενώς τις δομές των ανέπαφων ισωμάτων WNV με την χρήση κρυοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Εικόνα 4) (Kramer, Styer, & Ebel, 2008).



Εικόνα 4: *a) Εξωτερική κάτοψη δομής ισωμάτος WNV, b) Εγκάρσια διατομή ισωμάτος WNV.*

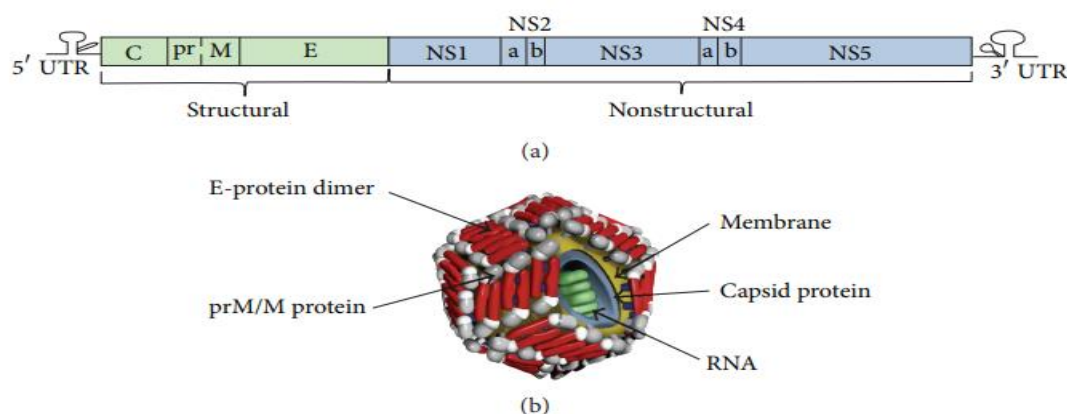
Μάλιστα, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η δομή του ισωματίου (virion) είναι παρόμοια με τη δομή άλλων φλαβοϊών. Έτσι, το ισωμάτιο του WNV, όπως και αυτό των άλλων φλαβοϊών, είναι σφαιρικό και μεγέθους περίπου 40-60 nm σε διάμετρο. Τα ανώριμα ισωμάτια μετατρέπονται σε ώριμα με την απελευθέρωση του N-τελικού πεπτιδίου από μία πρωτεάση τύπου φουρίνης στο διαμέρισμα *trans Golgi* του μολυσμένου κυττάρου (Stadler et al., 1997). Τα ώριμα ισωμάτια χαρακτηρίζονται από δομική αλλαγή, περιστροφή και αναδιάταξη των 60 τριμερών *prM-E* προκειμένου να σχηματιστούν 90 αντιπαράλληλα ομοδιμερή με σχεδόν εικοσαεδρική συμμετρία που καλύπτει την λιπιδική μεμβράνη (David & Abraham, 2016; Kuhn et al., 2002).

Τα ώριμα ισωμάτια περιέχουν ένα μόνο αντίγραφο του ιικού RNA συσκευασμένου μέσα σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη του καψιδίου. Ειδικότερα, το καψίδιο που περιέχει το γονιδίωμα περιβάλλεται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα προερχόμενη από τον ξενιστή η οποία με την σειρά της φέρει διμερή της πρωτεΐνης του φακέλου του ιού και της πρωτεΐνης της μεμβράνης. Μάλιστα όπως έχει διαπιστωθεί, η αντιγονική και γενετική, τρισδιάστατη δομή του WNV και των

πρωτεϊνών που το αποτελούν είναι παρόμοιες με αρκετούς άλλους φλαβοϊούς και αποτελούν τη βάση για αυτή την ταξινόμηση (Mukhopadhyay et al., 2003).

2.2 Οργάνωση Γονιδιώματος WNV

Όπως όλοι οι φλαβοϊοί, έτσι και ο WNV περιέχει ένα γονιδίωμα θετικής πολικότητας. Ειδικότερα περιέχει ένα μονόκλωνο RNA [ssRNA (+)], μεγέθους περίπου 11 kb. Το γονιδίωμα περικλείεται μέσα σε ένα περίβλημα ενός εικοσαεδρικού νουκλεοκαψιδίου με ώριμα ιοσωμάτια που εμφανίζονται σφαιρικά σε μορφολογία με κατά προσέγγιση διάμετρο 50 nm (Beasley, Davis, Estrada-Franco et al., 2004; Hayes and Sejvar et al., 2005). Το γονιδίωμα περιέχει ένα ενιαίο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη που διασπάται τόσο κατά την μετάφραση όσο και μετα-μεταφραστικά. Επιπλέον, η διάσπαση της πολυπρωτεΐνης διευκολύνεται τόσο από το κύτταρο ξενιστή όσο και από τις ιικές πρωτεάσες και παράγει δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες (Brinton, 2002). Οι τρεις δομικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες του καψιδίου (C), τις πρωτεΐνες της προ-μεμβράνης (prM) και τις πρωτεΐνες του φακέλου (E) (Εικόνα 5) (Chancey et al., 2015).



Εικόνα 5: Γονιδιωματική οργάνωση WNV και σύσταση *virion*. *a)* Αναπαράσταση του γονιδιώματος του WNV συμπεριλαμβανομένων των 3 δομικών πρωτεϊνών που συνθέτουν το ιοσωμάτιο και των 7 μη δομικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τον ιϊκή αντιγραφή και ανοσολογική διαφυγή, *b)* Λεπτομερής δομική σύσταση ιοσωματίου WNV.

Έτσι, καθίσταται σαφές ότι υπάρχουν επτά μη δομικές (NS) πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν τις NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5 και όλες παίζουν κρίσιμο ρόλο στην αντιγραφή του γονιδιώματος (Perera-Lecoin et al., 2013). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης πλαισιώνεται και στις δύο πλευρές από 5' και 3' μη

μεταφραζόμενες περιοχές (UTRs), αντίστοιχα (Tuplin et al., 2011; Yun et al., 2012). Το γονιδίωμα WNV αποτελείται από 96 νουκλεοτίδια στο 5' NCR και 632 νουκλεοτίδια στο 3' NCR, με ορισμένες παραλλαγές μεταξύ των διαφόρων στελεχών (Wengler & Wengler, 1981). Ωστόσο θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι κάθε μία από τις ιικές πρωτεΐνες, είτε είναι δομική είτε μη δομική, διαδραματίζει διαφορετικό και συγκεκριμένο ρόλο στη βιολογία ή/και στην παθογένεση των λοιμώξεων από WNV (Πίνακας 1) (Habarugira, Suen et al., 2020).

Ιϊκή πρωτεΐνη	Θέση στο γονιδίωμα (Νουκλεοτίδια)	Βασικός Ρόλος
C	97-465	<ul style="list-style-type: none"> • Ενθλάκωση και αφαίρεση περιβλήματος RNA • Ενεργοποίηση της οδού απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου
prM/M	466-741-742-966	<ul style="list-style-type: none"> • Συναρμολόγηση Virion • Σύντηξη μεμβράνης ιού-κυττάρου ξενιστή
E	967-2469	<ul style="list-style-type: none"> • Ιϊκή σύνδεση και είσοδος στους κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή • Προστασία σωματιδίων ιού • Σύντηξη μεμβράνης ιού-κυττάρου ξενιστή

NS1	2470-3525	<ul style="list-style-type: none"> • Αντιγραφή ιικού RNA • Ενίσχυση της προσκόλλησης του ιού στο ενδοπλασματικό δίκτυο • Σταθερότητα ιών • Ανοσοδιαφυγή (αναστολή ενεργοποίησης συμπληρώματος)
NS2A	3526-4218	<ul style="list-style-type: none"> • Αντιγραφή ιικού RNA και συγκρότηση ιοσωμάτων • Ανοσοδιαφυγή (διαταραχή της μεταγραφής της IFN)
NS2B	4219-4611	<ul style="list-style-type: none"> • Συμπαράγοντας για δράση πρωτεάσης NS3 • Αντιγραφή και συναρμολόγηση ιών
NS3	4612-6468	<ul style="list-style-type: none"> • Πρωτεάση σερίνης (N-τελικό άκρο) • RNA ελικάση (C-τελικό άκρο)
NS4A	6469-6915	<ul style="list-style-type: none"> • Αναδιάταξη ιογενούς μεμβράνης • Αναστολέας της απόκρισης στην ιντερφερόνη α/β του

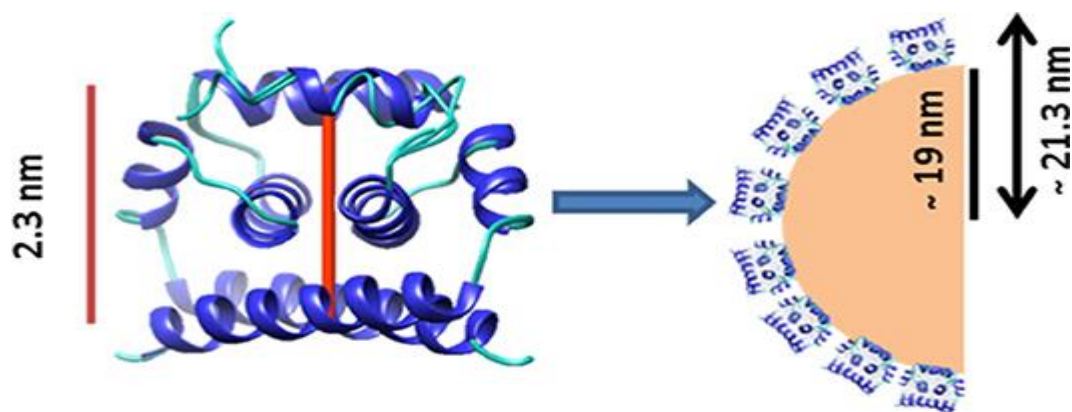
		ξενιστή
NS4B	6916-7680	<ul style="list-style-type: none"> • Ανοσοδιαφυγή (αναστολέας της απόκρισης στην ιντερφερόνη α/β του ξενιστή) • Αναδιπλασιασμός ιών (ενισχυτής της δραστηριότητας NS3hel)
NS5	768-10395	<ul style="list-style-type: none"> • Ανταγωνιστής IFN-α και β ανταγωνιστής • Αποφυγή της έμφυτης ανοσοαπόκρισης (ανταγωνιστής IFN) • Μεθυλοτρανσφεράση (N-τελικό άκρο), RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (C-τελικό άκρο)

Πίνακας 1: Σύνοψη των πρωτεϊνών του WNV και των βασικών τους λειτουργιών.

2.3 Η πρωτεΐνη του καψιδίου (C)

Η πρωτεΐνη του καψιδίου αποτελείται από περίπου 105 κατάλοιπα αμινοξέων, τα περισσότερα από τα οποία είναι φορτισμένα και κατανεμημένα στην πρωτεΐνη, με ορισμένες γενετικές παραλλαγές να εμφανίζονται μεταξύ των διαφόρων στελεχών του WNV που έχουν απομονωθεί (Jones et al., 2003; Londono-Renteria & Colpitts, 2016; Martins et al., 2012). Η τρισδιάστατη δομή της εν λόγω πρωτεΐνης φαίνεται στην εικόνα 6, ενώ υποδεικνύεται επίσης και ο τρόπος αλληλεπίδρασής της με τα λιπίδια των μεμβρανών (Martins et al., 2019). Η πρωτεΐνη C διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού μέσω της αλληλεπίδρασής της με τις λιγάσες E3 όπως η HDM2 (Van Marle et al., 2007). Επίσης διαθέτει βασικότατο ρόλο στην

αποικοδόμηση των πρωτεϊνών δέσμευσης του ιού μέσω της οδού του πρωτεασώματος (Bhuvanakantham & Ng, 2013). Ο βασικός ρόλος της πρωτεΐνης C έγκειται στη συγκρότηση των νουκλεοκασιδίων, προστατεύοντας έτσι το ιικό γενετικό υλικό (RNA). Κατά τη διάρκεια της ιικής αντιγραφής, η ενθυλάκωση και η αποκάλυψη του RNA ενισχύεται με τη δέσμευση της πρωτεΐνης C στο ιικό RNA. Όπως και σε άλλους φλαβοϊούς, η πρωτεΐνη C είναι λειτουργικά εύκαμπτη, υπό την έννοια ότι μπορεί να επιβιώσει και να προσαρμοστεί σε σοβαρές ή επιβλαβείς μεταλλάξεις που θα ήταν δυνητικά θανατηφόρες για άλλα είδη ιών. Η παρουσία της ιικής πρωτεΐνης C στο κύτταρο ξενιστή παίζει επίσης ρόλο στην παθογένεση της νόσου, ενώ επάγει κυτταροτοξικά αποτελέσματα σε μολυσμένα κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2. Επιπλέον, η πρωτεΐνη C επάγει την ανοδική ρύθμιση της κασπάσης-9 και την ενεργοποίηση της οδού απόπτωσης και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο (Byk et al., 2016; Oh et al., 2006).

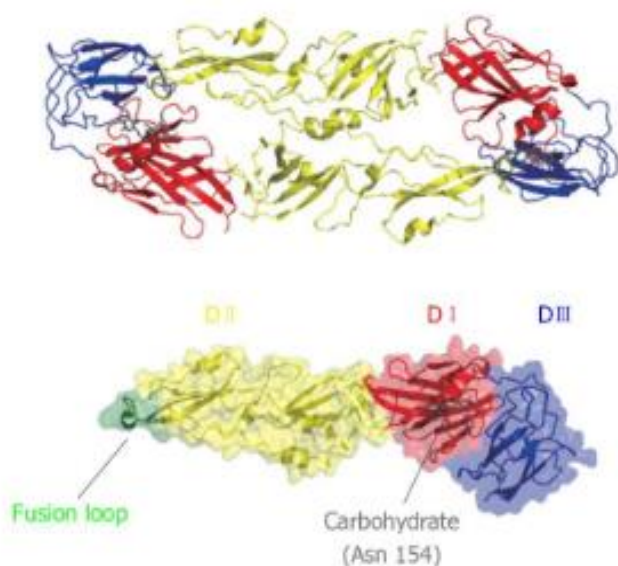


Εικόνα 6: Απεικόνιση τρισδιάστατης δομής πρωτεΐνης C & αλληλεπίδρασης της με τα λιπίδια των μεμβρανών.

2.3.1. Η πρωτεΐνη του φακέλου (E)

Η πρωτεΐνη E είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και έχει προστατευτικό ρόλο ως προς τα άλλα ιικά συστατικά, συμβάλλοντας στην διατήρηση της ακεραιότητας του φακέλου (Heinz & Stiasny, 2012; Londono-Renteria & Colpitts, 2016). Όπως λοιπόν έχει διαπιστωθεί, η αρχιτεκτονική της πρωτεΐνης E διατηρείται μεταξύ των διαφορετικών ειδών των φλαβοϊών, συμπεριλαμβανομένου του WNV (Mandl et al., 1989). Η πρωτεΐνη E έχει τρεις διακριτές δομικές περιοχές: την I (DI), την DII και την DIII (Εικόνα 7) (Martín-Acebes & Saiz, 2012). Όλες συνδέονται μεταξύ τους με

μια εύκαμπτη, εξαρτώμενη από το pH περιοχή άρθρωσης. Στην επιφάνεια των ισοματίων (ώριμα ή ανώριμα), οι τρεις διακριτές περιοχές είναι διατεταγμένες σε ένα αντιπαράλληλο διμερές (Rey et al., 1995). Η εν λόγω πρωτεΐνη συνιστά την πιο ανοσογόνο από τις φλαβοϊικές πρωτεΐνες και λόγω του κρίσιμου ρόλου της στην είσοδο του ιού στο κύτταρο στόχο, είναι ο κύριος στόχος για τα περισσότερα εμβόλια και θεραπευτικά πρωτόκολλα φαρμάκων μέσω ποικίλων ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων. Μάλιστα, ότι τα πιο ισχυρά εξουδερωτικά αντισώματα έναντι του WNV έχουν χαρτογραφηθεί στην EDIII (Slon et al., 2018). Τα εξουδερωτικά αντισώματα επί της ουσίας δρουν αναστέλλοντας την προσκόλληση ισοματίων-κυττάρου, την ενδοκυττάρωση ή την σύντηξη των 2 μεμβρανών (Heinz & Stiasny et al., 2012; Londono & Colpitts et al., 2016).



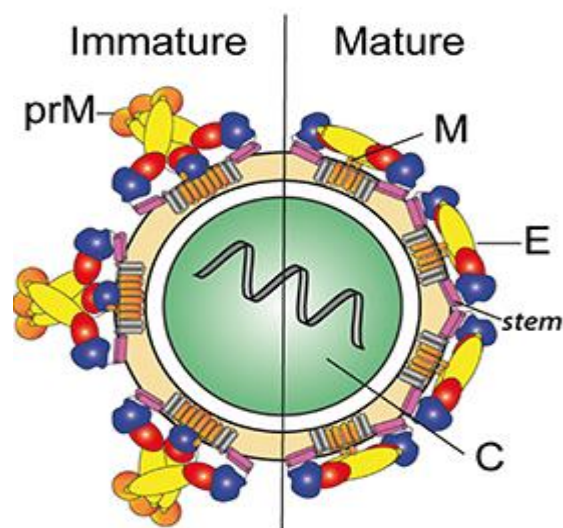
Εικόνα 7: Τριδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης E του WNV.

Όπως συμβαίνει και σε πολλούς φλαβοϊούς, η πρωτεΐνη E των περισσότερων στελεχών WNV περιέχει μια διατηρημένη N-συνδεδεμένη θέση γλυκοζυλίωσης στη θέση 154-156 αμινοξέων στην DI. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη του WNV δεν περιέχουν θέση N-συνδεδεμένης γλυκοζυλίωσης στην E. Παρόλ'αυτά το προϊόν της απομόνωσης της πρωτεΐνης E του στελέχους Kunjin του WNV (WNVKUN) αποδείχθηκε ότι δεν είναι γλυκοζυλιωμένο (Adams et al., 1995). Θεωρητικά, φαίνεται ότι υφίσταται μια συσχέτιση μεταξύ της γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης E και της νευροδιηθητικότητας του WNV σε διάφορα είδη ξενιστών, αν και αυτό έχει πρόσφατα αμφισβητηθεί (Beasley et al., 2005; Prow et al., 2016). Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση διαφαίνεται ότι η N-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση προφανώς δεν αποτελεί

προϋπόθεση για τη λοιμογόνο δράση του WNV σε διάφορα είδη πτηνών (Maharaj et al., 2019).

2.3.2. Η πρωτεΐνη prM/M

Η πρωτεΐνη της μεμβράνης (M) προκύπτει από τη διάσπαση της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης prM από το ένζυμο της φουρίνης που εντοπίζεται στο trans-Golgi (Εικόνα 8) (Koblischke et al., 2020). Το τμήμα «pr» εκκρίνεται, ενώ η πρωτεΐνη M, με τις δύο περιοχές που διαπερνούν την μεμβράνη, αποτελεί μέρος της μεμβράνης του ιού. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκτίθεται στην επιφάνεια του ανώριμου ισοωματίου, ενώ ένας από τους βασικούς ρόλους της prM θεωρείται ότι είναι η αποτροπή της πρόωρης σύντηξης της πρωτεΐνης. Έ με την μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή (Beasley et al., 2005). Όπως καθίσταται εύληπτο η διάσπαση της prM από τη φουρίνη είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η ιϊκή ωριμότητα (Slon Campos et al., 2018).



Εικόνα 8: Δομική απεικόνιση της PrM στο ανώριμο ισομάτιο και της πρωτεΐνης M στο ώριμο ισομάτιο του WNV.

2.3.3. Η Πρωτεΐνη NS1

Η μη δομική πρωτεΐνη 1 (NS1) έχει μοριακό βάρος περίπου 46–55 kDA (Εικόνα 9) (Edeling et al., 2014; Rastogi et al., 2016). Πρόκειται για μια ιϊκή πρωτεΐνη η οποία εμφανίζεται ως διμερές και εκκρίνεται ως διαλυτό εξαμερές λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας, οι οποίες αποτελούνται από 3 σταθερές διμερείς υπομονάδες. Η διμερής μορφή είναι βαρύνουσας σημασίας για την αποτελεσματική αντιγραφή του ιού. Στο μολυσμένο κύτταρο, η NS1 υπάρχει τόσο εξωκυτταρικά [σχετιζόμενη με την κυτταρική μεμβράνη (mNS1)] όσο και ενδοκυτταρικά και ο ρόλος της ποικίλλει ανάλογα με το σημείο στο οποίο εντοπίζεται. Ειδικότερα, η εξωκυτταρική μορφή της NS1 διαθέτει κομβικό ρόλο στη ρύθμιση και διαφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της τροποποίησης της δράσης του συμπληρώματος, ενώ η ενδοκυτταρική μορφή εμπλέκεται έμμεσα στον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση του ιού. Έχει μάλιστα αναφερθεί ότι η NS1 ενισχύει την προσκόλληση του ιού στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και διασφαλίζει τη σταθερότητα του ιού μέσα στο κύτταρο ξενιστή (Muller & Young et al, 2013). Ο ακριβής λόγος για τον οποίο η πρωτεΐνη NS1 είναι τόσο κρίσιμη για την αντιγραφή του WNV άπτεται της ικανότητάς της να διαφεύγει της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και της αναστολής του TLR3 (Chung et al., 2006).



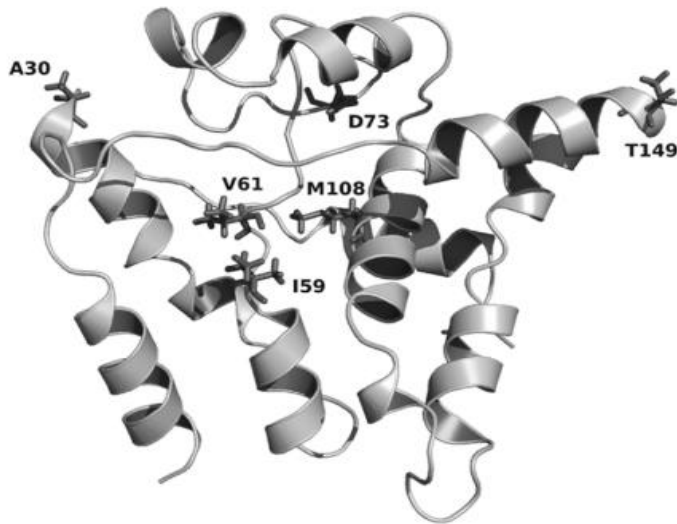
Εικόνα 9: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης NS1 του WNV.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η NS1 εκκρίνεται ενεργά κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από τον WNV. Έτσι, συνιστά έναν χρήσιμο ορολογικό δείκτη. Εξάλλου, η NS1 είναι ένας πιθανός διαγνωστικός δείκτης για την διάκριση των μολυσμένων ζώων από τα εμβολιασμένα, στις περιπτώσεις κατά τις οποίες τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται δεν περιέχουν WNV-NS1 (Brand, 2010; Macdonald et al., 2005; Zainah et al., 2009).

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει για την NS1', η οποία συνιστά μια προέκταση της πρωτεΐνης NS1 και έχει αναφερθεί σε διάφορους φλαβοϊούς συμπεριλαμβανομένου του WNV, του ιού της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας και του ιού του δάγκειου πυρετού (DENV). Η NS1' έχει μοριακό βάρος περίπου 52–53 kDa, ενώ έχει υποτεθεί ότι η εν λόγω προέκταση προκαλείται από τη διάσπαση σε μια εναλλακτική τοποθεσία στο NS2A λόγω ολίσθησης της ριβοσωμικής υπομονάδας η οποία μετατοπίζει το πλαίσιο ανάγνωσης καθοδικά του γονιδίου της πρωτεΐνης NS2A. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι παρά τις όποιες προσπάθειες εντοπισμού της θέσης διάσπασης οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί, τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Ακόμη, έχει αποδειχτεί ότι η NS1 διαδραματίζει βασικό ρόλο στη νευροδιηθητική δράση του WNV (Melian et al., 2010; Muller & Young, 2013).

2.3.4. Η Πρωτεΐνη NS2A

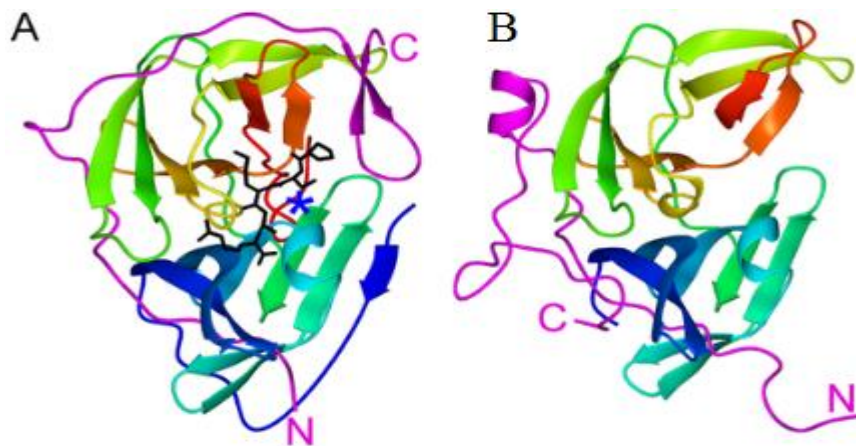
Η πρωτεΐνη NS2A των φλαβοϊών αποτελεί ένα μικρό μόριο που σχετίζεται με την μεμβράνη και το οποίο αποτελείται από 231 αμινοξέα. Αυτή η πρωτεΐνη παίζει βασικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού, στη συναρμολόγησή του και στην ανοσία του ξενιστή καθώς διαταράσσει την απόκριση στην ιντερφερόνη (IFN) του ξενιστή (Leung et al., 2008). Στην εικόνα 10 απεικονίζεται η τρισδιάστατη δομή αυτής της πρωτεΐνης, ενώ υποδεικνύονται και οι ακριβείς θέσεις των καταλοίπων, οι οποίες επιδρούν στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (Danecsek & Schein, 2010). Μάλιστα, όπως φαίνεται, τρία από τα προαναφερθέντα κατάλοιπα (I59, V61, M108) ομαδοποιούνται σε μια αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα, ενώ το συνολικό επιφανειακό φορτίο της πρωτεΐνης είναι θετικό (Danecsek & Schein, 2010). Εντύπωση δε προκαλεί το γεγονός ότι η ικανότητα δέσμευσης της NS2a πιθανότατα οφείλεται σε αυτές τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου (Mackenzie et al., 1998).



Εικόνα 10: Τρισδιάστατη δομή της NS2A πρωτεΐνης και της θέσης των καταλοίπων τα οποία επιδρούν στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

2.3.5. Η Πρωτεΐνη NS2B

Η NS2B είναι μια μικρή, υδρόφοβη πρωτεΐνη που αποτελεί βασικό συμπράγοντα της NS3 για την ολοκλήρωση της δραστηριότητας της ιικής πρωτεάσης. Μάλιστα, αυτές οι δύο πρωτεΐνες φαίνεται ότι διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό σε διαφορετικούς φλαβοϊούς και είναι απαραίτητες για την αναπαραγωγή του ιού (Εικόνα 11) (Londono-Renteria & Colpitts, 2016; Su et al., 2009).



Εικόνα 11: A) Τρισδιάστατη απεικόνιση NS2B-NS3 στον WNV, B) Τρισδιάστατη απεικόνιση NS2B-NS3 στον δάγκειο ιό.

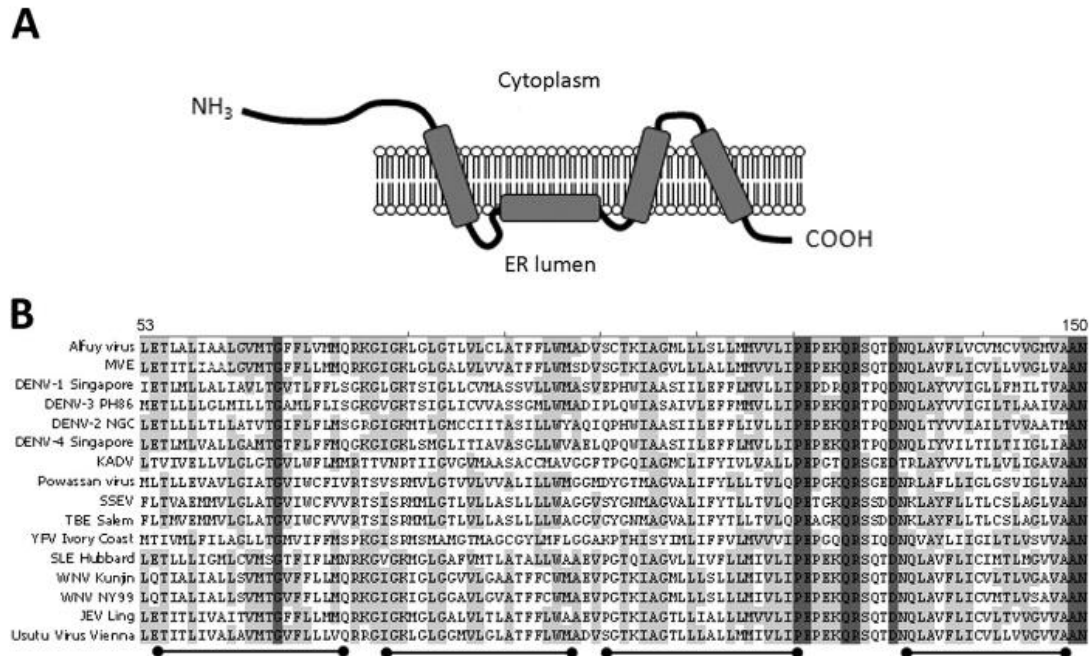
2.3.6. Η Πρωτεΐνη NS3

Η NS3 είναι η δεύτερη μεγαλύτερη φλαβοϊκή πρωτεΐνη μετά την NS5 με μοριακό βάρος περίπου 69 kDa. Η NS3 είναι πολυλειτουργική, υπό την έννοια ότι συμπεριλαμβάνει μια πρωτεάση σερίνης που εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο και μια RNA ελικάση με εντόπιση στο C-τελικό άκρο (Gorbalenya et al., 1989; Wengler et al., 1991). Η δράση της πρωτεάσης NS3 εξαρτάται από την NS2B, με την τελευταία να αποτελεί συμπαραγοντα για την πρώτη. Η πρωτεάση NS2B-NS3 είναι ζωτικής σημασίας για την αντιγραφή του ιού και διασπά τη νεοσυντιθέμενη πολυπρωτεΐνη στις θέσεις σύνδεσης NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A και NS4B/NS5 καθώς και εσωτερικά σε θέσεις της NS4A. Η αλληλεπίδραση της ελικάσης NS3 RNA με την NTPάση είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού RNA και την συγκρότηση των ιοσωμάτων (Li et al., 2014). Συνολικά, δεν θα ήταν υπερβολή να ειπωθεί ότι λόγω του πολυλειτουργικού της ρόλου στην αναπαραγωγή του ιού, η NS3 έχει προταθεί ως ένας πολύ καλός στόχος για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Chappell et al., 2008).

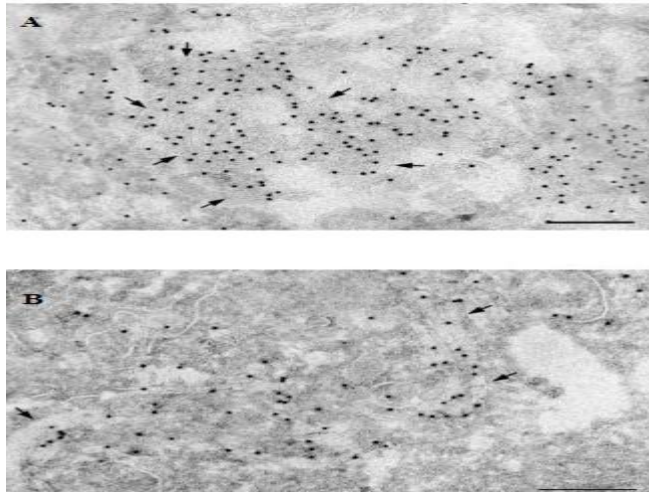
2.3.7. Η Πρωτεΐνη NS4A

Η NS4A συνιστά μια μικρή υδρόφοβη, μη διατηρημένη και αποκλειστικά διαμεμβρανική πρωτεΐνη που έχει βασικότατο ρόλο στη διαδικασία αναπαραγωγής του ιού μέσω της αναδιάταξης της ιικής μεμβράνης (Εικόνα 12) (Ambrose & Mackenzie, 2011b). Μάλιστα, αυτές οι αναδιατάξεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης επιβεβαιώθηκαν με την βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από τον Roosendaal και τους συνεργάτες του. Όπως επιπλέον έδειξε η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα, δεν απαιτείται η παρουσία της πεπτιδικής αλληλουχίας του καρβοξυτελικού της άκρου προκειμένου να επιτευχθεί αυτή η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (Εικόνα 13) (Roosendaal et al., 2006). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η αλληλεπίδραση NS4A-NS1 απαιτείται για τη σύνθεση του ιικού RNA, ενώ η NS4A διαδραματίζει ποικίλους ρόλους κατά την αντιγραφή του ιού ανάλογα με το ακριβές σημείο της διάσπασης. Ακόμη, εικάζεται ότι η NS4A μπορεί να συνιστά συμπαραγοντα με ρυθμιστικό ρόλο για την δραστηριότητα της ATPάσης της

ελικάσης NS3, ενώ έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την ανοσολογική διαφυγή (Ambrose et al., 2011; Shiryaev et al., 2009; White et al., 2011).



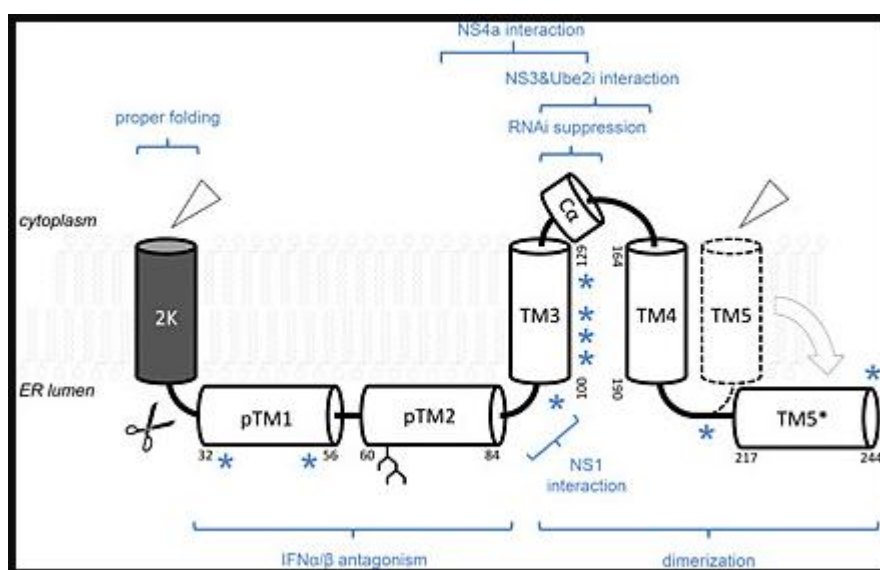
Εικόνα 12: A) Τοπολογία της NS4A στην μεμβράνη του Ενδοπλασματικού Δικτύου, B) Απεικόνιση δομικής ομοιότητας της αλληλουχίας NS4A μεταξύ διαφόρων φλαβοϊών.



Εικόνα 13: Επαγωγή σχηματισμού χαρακτηριστικών μεμβρανικών σχηματισμών έπειτα από μόλυνση με φλαβοϊό A) με διατήρηση της πεπτιδικής αλληλουχίας του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, B) με απομάκρυνση της πεπτιδικής αλληλουχίας του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης.

2.3.8. Η Πρωτεΐνη NS4B

Η πρωτεΐνη NS4B έχει κρίσιμο ρόλο στην ανοσολογική διαφυγή μέσω αναστολής της σηματοδότησης, η οποία επάγει την παραγωγή των ιντερφερονών έναντι του WNV. Στο πλαίσιο αυτό παρουσιάζεται στην εικόνα 14 και η δομική και λειτουργική τοπολογία της πρωτεΐνης NS4B (Zmurko et al., 2015). Επιπλέον, η *in vivo* εξασθένηση της αναπαραγωγής του WNV λόγω διαφόρων μεταλλάξεων στο NS4B υποδηλώνει το ρόλο της στην αντιγραφή του ιού. Αν και δεν υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις, πιστεύεται ότι η αλληλεπίδραση των NS1 και NS4B ρυθμίζει την αντιγραφή του WNV (Wicker et al., 2012; Youn et al., 2012).

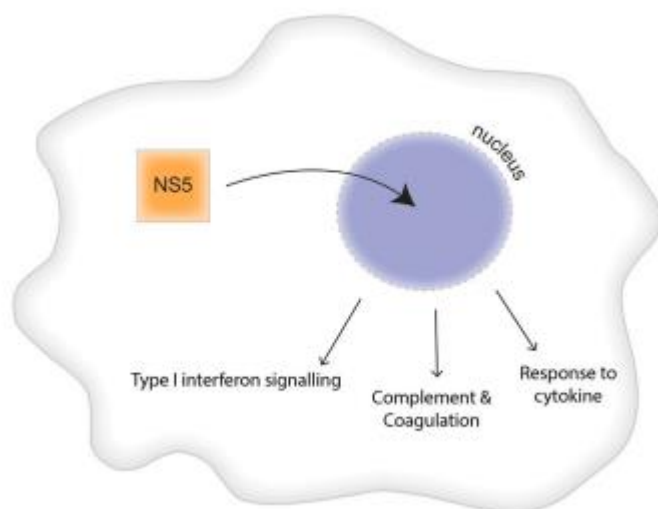


Εικόνα 14: Τοπολογία πρωτεΐνης NS4B.

2.3.9. Η Πρωτεΐνη NS5

Η πρωτεΐνη NS5 είναι η μεγαλύτερη (περίπου 96 kDa) και πιο καλά διατηρημένη μεταξύ των μη δομικών πρωτεϊνών του γονιδιώματος του WNV. Όπως συμβαίνει και στους περισσότερους φλαβοϊούς, η πρωτεΐνη WNV NS5 αποτελείται από μία N-τελική μεθυλοτρανσφεράση (MTάση) και μια C-τελική εξαρτώμενη από RNA πολυμεράση RNA (RdRp). Μάλιστα φαίνεται ότι τα δύο αυτά ένζυμα παίζουν κρίσιμο ρόλο στην αντιγραφή του ιού. Κατά τη διαδικασία αναπαραγωγής του ιού, η επικράτεια της MTάσης NS5 εμπλέκεται στην κάλυψη του RNA (RNA capping) (Hall et al., 2009). Η NS5 είναι επίσης ένας ανταγωνιστής IFN- α και β , κατά

συνέπεια συνιστά καθοριστικό παράγοντα της λοιμογόνου δράσης του ιού μέσω αποφυγής της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης, ενώ φαίνεται ότι αναστέλλει επίσης την μετάφραση των γονιδίων που διεγείρονται από τις IFNs (ISGs) (Best, 2017; Shah et al., 2018). Ειδικότερα, το σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο φαίνεται ότι συμμετέχει η πρωτεΐνη NS5 δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας παρουσιάζεται στην εικόνα 15 (López et al., 2021).

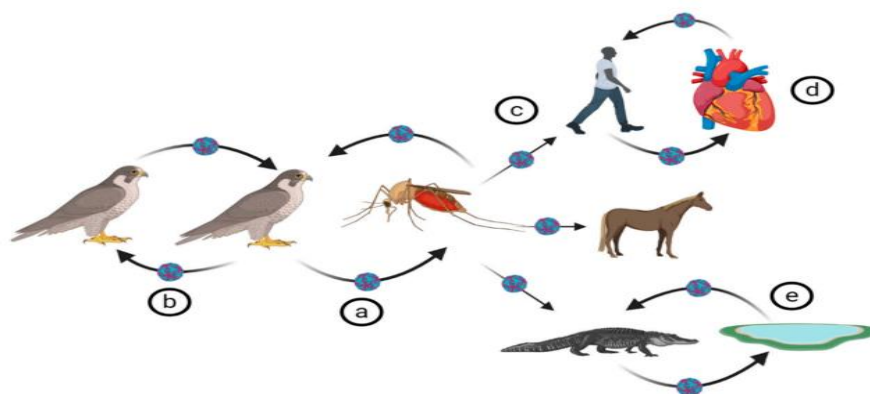


Εικόνα 15: Σηματοδοτικό μονοπάτι με το οποίο η NS5 τροποποιεί την ανοσιακή απόκριση.

2.4 Κύκλος ζωής του WNV

Ο κύκλος ζωής του WNV περιλαμβάνει κάποια ζώα τα οποία λειτουργούν ως δεξαμενές ιών. Περιλαμβάνει κυρίως πτηνά, τα οποία μπορούν να φιλοξενήσουν τον ιό χωρίς σημεία κλινικής νόσου, φορείς κουνουπιών οι οποίοι <<υποστηρίζουν>> επίσης την αναπαραγωγή του ιού καθώς και τελικούς ή προσωρινούς (υπό την έννοια της τυχειότητας) ξενιστές. Ως ξενιστής ορίζεται ένας οργανισμός εντός του οποίου διαβιώνει ένα παθογόνο και δύναται να επηρεαστεί θετικά ή αρνητικά από το εκάστοτε παθογόνο και να αναπτυχθεί μεταξύ τους μια θετική ή αρνητική σχέση ανατροφοδότησης. Ο φορέας από την άλλη ορίζεται ως ένας οργανισμός ο οποίος εξυπηρετεί την μετάδοση ενός παθογόνου από τον ένα ξενιστή στον άλλο. Οι προσωρινοί ξενιστές μολύνονται κυρίως κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος ενός κουνουπιού και μπορεί στη συνέχεια να αναπτύξουν κλινική νόσο (Εικόνα 16) (Colpitts et al., 2012; Habarugira, Suen et al., 2020). Από τους τελικούς ξενιστές

ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει για τους κροκόδειλους που σε αντίθεση με άλλους τελικούς ξενιστές (που καλούνται «αδιέξοδοι» ξενιστές) ενισχύουν το ιικό φορτίο. Οι εκάστοτε φορείς αποκτούν τον ιό από έναν ιαμικό σπονδυλωτό ξενιστή έπειτα ή και κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος. Μετά λοιπόν από την κατάποση του γεύματος αίματος, ο WNV φτάνει στο μεσέντερο του φορέα-κουνουπιού, όπου ο ιός ενισχύεται και εξαπλώνεται στους σιελογόνους αδένες του πριν μολύνει τον τελικό ξενιστή κατά τη διάρκεια του επακόλουθου γεύματος αίματος του κουνουπιού. Αρχικά θεωρήθηκε ότι, στο κουνούπι, η αναπαραγωγή του ιού περιορίζεται αυστηρά στο μεσέντερο λόγω της αδυναμίας ανίχνευσης του ιού έξω από αυτό. Ωστόσο, ο WNV-NS1 ανιχνεύθηκε με ανοσοϊστοχημεία σε σιελογόνους αδένες, σε νευρώνες στα γάγγλια και στα οφθαλμικά κύτταρα εκτός από τους ιστούς του μεσεντερίου. Είναι ενδιαφέρον δε, όπως συμβαίνει και με άλλους φλαβοϊούς, το γεγονός ότι ο WNV δεν προκαλεί εμφανή ασθένεια στα κουνούπια (Girard et al., 2004; Kato et al., 2008). Μετά την αντιγραφή στο μεσέντερο και άλλους ιστούς, ο ιός ξεκινά ένα ανάδρομο ταξίδι προς τους σιελογόνους αδένες των κουνουπιών μέσω της αιμολέμφου. Εν τω μεταξύ στους σιελογόνους αδένες των κουνουπιών, τα σωματίδια του ιού συσσωματώνονται εν αναμονή της σίτισης του κουνουπιού (Colmant et al., 2018).



Εικόνα 16: Κύκλος ζωής και μετάδοση του WNV, a) Συντήρηση WNV μεταξύ πτηνών (δεξαμενή) και φορέων-κουνουπιών, b) απευθείας μετάδοση WNV μεταξύ πτηνών σε φάρμα, c) μετάδοση WNV σε διάφορους ξενιστές (άνθρωπος, άλογο και κροκόδειλος) μέσω τσιμπήματος κουνουπιών, d) μετάδοση WNV μέσω μετάγγισης αίματος και μεταμόσχευσης οργάνων στον άνθρωπο, e) μόλυνση με WNV κροκοδείλου μέσω μολυσμένου με WNV νερού.

Οι σπονδυλωτοί ξενιστές του WNV μολύνονται κατά τη διάρκεια της πρόσληψης ενός γεύματος αίματος από ένα κουνούπι το οποίο είναι μολυσμένο με WNV. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει μάλιστα το γεγονός ότι τα κουνούπια πριν να απομυζήσουν

το αίμα διερευνούν τα αιμοφόρα αγγεία εγγέοντας σε αυτά σίελο, η οποία εκτός από τις αντιπηκτικές ιδιότητές της, περιέχει και πρωτεΐνες που παρεμβαίνουν στην απόκριση των T κυττάρων του ξενιστή, με αποτέλεσμα την αρχική ανοσοδιαφυγή και εξάπλωση του ιού (Schneider et al., 2010).

Εν συνεχεία ο ιός κατορθώνει να μολύνει τα κύτταρα ξενιστές των σπονδυλωτών μέσω της ενδοκυττάρωσης που προκαλείται από κυτταρικούς υποδοχείς μετά από κυτταρική ιική σύντηξη. Αν και άλλοι υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας μαννόζης και αρκετές γλυκοζαμινογλυκάνες έχουν προταθεί για το σκοπό αυτό, έχει βρεθεί ότι ο υποδοχέας DC-SIGNR είναι ο κύριος μεσολαβητής για την είσοδο του WNV στο εσωτερικό των κυττάρων. Μόλις λοιπόν ο ιός εισέλθει στα ενδοσωματικά κυστίδια του κυττάρου ξενιστή, η ιική πρωτεΐνη E υφίσταται όξυνση, ενεργοποιώντας διαμορφωτικές αλλαγές που επάγουν την συγχώνευση ικών και κυτταρικών μεμβρανών. Όπως μάλιστα έχει διαπιστωθεί η βέλτιστη σύντηξη της ικής μεμβράνης και των κυτταρικών ενδοσωμάτων/λιποσωμάτων επιτυγχάνεται σε pH 6,3–6,9. Αφότου λοιπόν επιτευχθεί η βέλτιστη σύντηξη, το νουκλεοκαψίδιο και το ιικό RNA απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή προκειμένου να ξεκινήσει η αντιγραφή. Μετά την πραγματοποίηση της αντιγραφής, τα νέα σωματίδια του ιού αποκτούν ένα λιπιδικό περίβλημα καθώς εκκολάπτονται στον αυλό του ER και ωριμάζουν μέσω διάσπασης του prM (αφαίρεση του pr με φουρίνη) με την πραγματοποίηση εξωκυττάρωσης και την συνακόλουθη απελευθέρωσή τους από το κύτταρο. Επιπλέον, έχει υποτεθεί ότι ο υποδοχέας DC-SIGN αποτελεί έναν βασικό παράγοντα της λοίμωξης, που εξαρτάται από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα του ξενιστή, αν και η επακόλουθη εξάπλωση του ιού στα παρακείμενα μολυσμένα κύτταρα θα μπορούσε να είναι ανεξάρτητη από τον DC-SIGN (Davis, C.W et al., 2006).

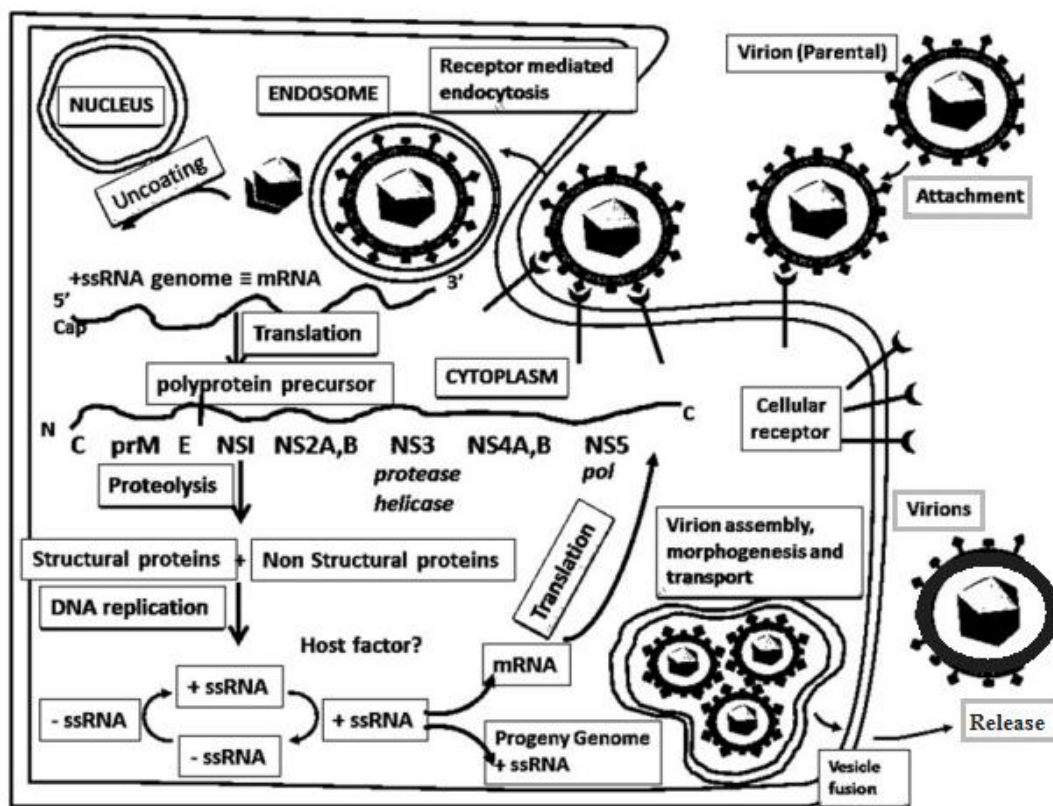
2.5 Διαδικασία αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος του WNV

Η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος του WNV δύναται να πραγματοποιηθεί σε μια σειρά από κυτταροκαλλιέργειες που προέρχονται από ιστούς θηλαστικών, πτηνών, αμφιβίων ή εντόμων. Το αρχικό βήμα για την είσοδο του ιού εντός του κυττάρου-ξενιστή συνίσταται στη σύνδεση της κύριας γλυκοπρωτεΐνης E φακέλου σε

έναν κυτταρικό μοριακό υποδοχέα (Smit et al., 2011). Ειδικά όσον αφορά την προσκόλληση του ιού *in vitro*, υπάρχει διαθέσιμος ένας αριθμός μορίων, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι χρησιμεύουν ως συν-υποδοχείς, όπως το DCSIGN και το DC-SIGN-R σε δενδριτικά κύτταρα. Επιπλέον έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες προσκόλλησης για φλαβοϊούς πρωτεΐνες δέσμησης λαμινίνης και πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Jindadamrongwech et al., 2004; Reyes-Del et al., 2005). Μάλιστα, η πρωτεΐνη δέσμησης της λαμινίνης έχει αποδειχθεί ότι έχει υψηλή ειδικότητα για την αλληλεπίδραση με την DII της πρωτεΐνης E του WNV (Bogachek et al., 2008).

Ο WNV πραγματοποιεί την είσοδό του στα κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης διαμεσολαβούμενης από κλαθρίνη μετά από σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς (Chu & Ng, 2004). Το όξινο pH του ενδοσώματος επάγει διαμορφωτικές αλλαγές στη γλυκοπρωτεΐνη E με αποτέλεσμα την διάσπαση των ομοδιμερών της γλυκοπρωτεΐνης E σε μονομερή. Η DII περιοχή της πρωτεΐνης E προβάλλεται προς τα έξω ενώ ο βρόχος σύντηξης της DII είναι εκτεθειμένος στην μεμβράνη-στόχο. Έπειτα εισάγονται οι βρόχοι σύντηξης των πρωτεϊνών E στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός ασταθούς τριμερούς λόγω της αλληλεπίδρασης των βρόχων σύντηξής του. Μάλιστα η αλληλεπίδραση των 3 E μονομερών σταθεροποιείται περαιτέρω από τις αλληλεπιδράσεις των DI των τριών πρωτεϊνών E (Liao, et al., 2010). Ακολουθεί ο σχηματισμός μιας φουρκέτας (βρόχος αντιγραφής) λόγω της αναδίπλωσης της DIII περιοχής. Αυτές οι αλλαγές επάγουν με την σειρά τους την δημιουργία ενός σχηματισμού, η διεύρυνση του οποίου οδηγεί στην απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου μέσα στο κύτταρο ξενιστή. Ακολουθεί απελευθέρωση του ιικού RNA από το νουκλεοκαψίδιο και έναρξη της μετάφρασης. Ο θετικής φοράς κλώνος RNA χρησιμεύει σαν μήτρα προκειμένου η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση να δημιουργήσει συμπληρωματικούς κλώνους αρνητικής φοράς. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η πρωτεάση σερίνης NS3 και η πεπτιδάση σήματος του ξενιστή διασπούν την πολυπρωτεΐνη σε πολλαπλές θέσεις. Έπειτα δημιουργείται ένα εικοσαεδρικό κέλυφος από την περιέλιξη της πρωτεΐνης C γύρω από το νέο αναδιπλασιασμένο RNA (Valiakos et al., 2013). Το νεοσχηματισμένο νουκλεοκαψίδιο περιβάλλεται από κυτταρική μεμβράνη, η οποία προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και από την οποία θα εκβλαστώνουν αργότερα στον αυλό ανώριμα ιοσωμάτια, επί των οποίων οι πρωτεΐνες E και prM θα σχηματίσουν 60 ετεροτριμερείς ακίδες. Αφού λοιπόν γίνει η εκβλάστηση των

ανώριμων ισωμάτων, τα τελευταία θα μεταφερθούν στο δίκτυο trans-Golgi, όπου το χαμηλότερο pH επιφέρει δομική αναδιάταξη. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι παρά τις όξινες συνθήκες η PrM παραμένει αμετάβλητη προεξέχοντας από την επιφάνεια του ιού. Αργότερα, το πεπτίδιο pr διαχωρίζεται από το ισωμάτιο με εξωκυττάρωση και αυτό οδηγεί στην παραγωγή ενός μείγματος ανώριμων, ώριμων και μερικώς ώριμων ισωμάτων από τα κύτταρα που είναι μολυσμένα με φλαβοϊό. Μάλιστα, μελέτες έχουν αποδείξει ότι τόσο ανώριμα όσο και τα πλήρως ώριμα ισωμάτια μπορούν να ξεκινήσουν την λοίμωξη (Εικόνα 17) (David & Abraham, 2016; Konishi & Mason, 1993; Wengler & Wengler, 1989).



Εικόνα 17: Ο κύκλος αντιγραφής του γονιδιώματος του WNV.

3. Οικολογία WNV

3.1 Φορείς WNV

Τα κουνούπια *Culex* αναφέρονται ως οι κύριοι φορείς του WNV (Εικόνα 18) (Rossi et al., 2010). Ωστόσο, αρκετά άλλα είδη κουνουπιών έχουν προταθεί επίσης ως φορείς, αν και αυτή τους η ικανότητα ποικίλλει. Ωστόσο υπάρχουν παραλλαγές στους φορείς του WNV σε ολόκληρο τον κόσμο ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και μήκος. Πιο συγκεκριμένα, στην Αφρική, όπου όπως προαναφέρθηκε ο ιός απομονώθηκε αρχικά, ο *Cx. univittatus* αποτελεί τον πιο ικανό φορέα μετάδοσης του WNV στον άνθρωπο. Αφότου λοιπόν ανακαλύφθηκε ο WNV, οι επιστήμονες προσπάθησαν να εντοπίσουν ποιά είδη κουνουπιών θα μπορούσαν να αποτελέσουν ικανούς φορείς του ιού. Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκαν αρκετά πειράματα μετάδοσης σε διάφορα είδη κουνουπιών.



Εικόνα 18: Κουνούπι είδους *Culex*, που συνιστά τον βασικότερο φορέα του WNV.

Η πρώτη επιτυχημένη πειραματική μετάδοση του ιού έγινε το 1942 στο *Aedes albopictus*, το οποίο αποτελεί και έναν πιθανό ικανό φορέα, ενώ πολλές άλλες πειραματικές λοιμώξεις αφορούσαν δύο συγκεκριμένα είδη κουνουπιών, το *Culex pipiens* και το *Cx. tritaeniorhynchus*, με το τελευταίο να είναι το πιο άφθονο πληθυσμιακά στην Αφρική (Hubálek & Halouzka, 1999; Hurlbut et al., 1956). Ωστόσο όπως διαπιστώθηκε, υπάρχουν και άλλα είδη κουνουπιών όπως τα *Cx. univittatus*, *Cx. theileri*, *Cx. neavei*, *Ae. caballus*, *Ae. circumluteolus*, *Coquillettidia* spp., *Cx. poicilipes*, *Ae. albocephalus*, *Cx. quinquefaciatus*, *Mansonia* spp. και *Cx.*

Neavei, τα οποία διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του ιού τόσο στον άνθρωπο όσο και σε ίππους σε διάφορα μέρη της Αφρικής όπως η Νότια Αφρική, η Αίγυπτος, η Σενεγάλη και το Σουδάν (Miller et al., 2000). Επιπλέον, βρέθηκε ότι το *Cx. interrogator* και το *Cx. nigripalpus* μεταδίδουν τον ιό στο Μεξικό και σε άλλα μέρη της Λατινικής Αμερικής, ενώ όταν ο WNV εισήχθη στη Βόρεια Αμερική, το 1999, δύο μόνο είδη κουνουπιών, το *Cx. restuans* και το *Cx. salinarius*, μπορούσαν να τον μεταδώσουν (Ulloa et al., 2009). Ωστόσο, αργότερα περαιτέρω μελέτες επιβεβαίωσαν τον ρόλο και άλλων κουνουπιών συμπεριλαμβανομένων των *Ochlerotatus triseriatus* και *Ochlerotatus japonicus japonicus*. Αν και μελέτες που διενεργήθηκαν μετέπειτα ανίχνευσαν τον WNV σε περίπου 150 είδη κουνουπιών, συνήχθη το συμπέρασμα ότι οι βασικοί φορείς του WNV στις ΗΠΑ είναι το *Cx. pipiens*, το *Cx. tarsalis* και το *Cx. quinquefasciatus* (DeGroot et al., 2008).

Οι κύριοι φορείς του WNV στην Ευρώπη περιλαμβάνουν το *Cx. pipiens*, το *Cx. modestus*, το *Cx. molestus*, το *Ochlerotatus caspius*, το *Cx. torrentium*, το *Anopheles maculipennis* και το *Coquillettidia richiardii*. Μάλιστα, ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει για το κουνούπι του γλυκού νερού *annulirostris* διότι συνιστά τον κύριο φορέα του WNV στην Αυστραλία. Στο πλαίσιο αυτό μάλιστα διερευνήθηκαν και άλλα είδη κουνουπιών στην Αυστραλία συμπεριλαμβανομένων των *Aedes alternans*, *Ae. nomenensis*, *Ae. tremulus*, *Ae. vigilax*, *Cx. australicus*, *Cx. squamosus*, *Anopheles amictus* και *Cx. quinquefasciatus*, αλλά διαπιστώθηκε ότι κανένα από τα προαναφερθέντα κουνούπια δεν ήταν τόσο ικανό όσο το *Cx. annulirostris* (Brown et al., 2002).

Όπως είναι ευρέως γνωστό, ο WNV είναι ενδημικός στις χώρες της Μέσης Ανατολής, συμπεριλαμβανομένου του Ισραήλ, της Τουρκίας, της Ιορδανίας, του Ιράν και του Λιβάνου. Σε αυτές λοιπόν τις χώρες, ο WNV μεταδίδεται σε μεγάλο βαθμό από το *Cx. pipiens*, το *Cx. perexiguus* και το *Ae. Caspius* (Orshan et al., 2008). Στην Ασία, το Πακιστάν και την Ινδία όπου ο WNV είναι επίσης ενδημικός, βρέθηκε ότι ο εν λόγω ιός μεταδίδεται κυρίως από το *Cx. fatigans*, το *Cx. tritaeniorhynchus*, το *Cx. vishnui*, το *Cx. bitaeniorhynchus*, το *Cx. univittatus*, το *Cx. pipiens fatigans*, το *Ae. albopictus* και το *Cx. tritaeniorhynchus* (Paramasivan et al., 2003). Ακόμη ο WNV έχει απομονωθεί και από αρθρόποδα πέρα από τα κουνούπια. Αυτά περιλαμβάνουν τσιμπούρια (*Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ornithodoros*

maritimus και *Argas hermanni*) και ακάρεα κοτόπουλου (*Ornithonyssus sylviarum*) (Habarugira, Suen et al., 2020).

3.2 Ξενιστές του WNV

Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου το 74%-100% των κουνουπιών *Cx. tarsalis* μολύνονται με τον ιό μετά την κατανάλωση γευμάτων αίματος ιικής συγκέντρωσης $10^{7,1}$ PFU/mL, ενώ μόνο το 0%-36% δύναται να μολυνθεί μετά από κατανάλωση μολυσμένου αίματος ιικής συγκέντρωσης $10^{4,9}$ PFU/mL (Goddard et al., 2002). Στο πλαίσιο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η μέγιστη εκτιμώμενη συγκέντρωση WNV που έχει βρεθεί σε ανθρώπινο αίμα κατά τον έλεγχο αιμοδοτών το 2002 ήταν περίπου $10^{3,2}$ PFU/mL. Κατά συνέπεια, φαίνεται απίθανο οι άνθρωποι να εμφανίζουν επίπεδα ιαμίας WNV ικανά ώστε να μολύνουν τα κουνούπια (Hayes, Komar et al., 2005).

Τα πτηνά θεωρείται ότι αποτελούν τους πιο σημαντικούς ξενιστές του WNV. Σε εργαστηριακές μελέτες, διαπιστώθηκε ότι τα είδη *Passeriformes* (πουλιά τραγουδιού), *Charadriiformes* (παραθαλάσσια πτηνά), *Strigiformes* (κουκουβάγιες) και *Falconiformes* (γεράκια) ανέπτυξαν ικανά επίπεδα ιαμίας για να μολύνουν τα κουνούπια, ενώ τα είδη *Columbiformes* (περιστέρια), *Piciformes* (δρυοκολάπτες) και *Anseriformes* (πάπιες) όχι (Komar et al., 2003). Επίσης διαπιστώθηκε ότι τα είδη *Quiscalus quiscula*, *Carpodacus mexicanus* και *Passer domesticus* ήταν εξαιρετικά μολυσματικά για τα κουνούπια με ποσοστά θνησιμότητας >40%. Το γεγονός αυτό έχει επιβεβαιωθεί από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια διαφόρων επιδημιών WNV σε πολλές περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών (Komar et al., 2005).

Τα σπουργίτια φαίνεται ότι φέρουν ποικίλα χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να αποτελέσουν ξενιστές του WNV. Ωστόσο θα πρέπει να υπογραμμιστεί το γεγονός ότι ο ρόλος των πτηνών στη διασπορά του WNV παραμένει απλά εικασία υπό την έννοια ότι οι τοπικές μετακινήσεις μόνιμων, μη αποδημητικών πτηνών καθώς και τα μακρινά ταξίδια αποδημητικών πτηνών θα μπορούσαν δυνητικά να συμβάλλουν στην εξάπλωση του WNV χωρίς όμως κάτι τέτοιο να έχει αποδειχτεί απτά (Rappole & Hubálek, 2003). Αν και ο WNV έχει απομονωθεί και από τρωκτικά στη Νιγηρία καθώς και από μια νυχτερίδα στην Ινδία, φαίνεται ότι τα περισσότερα θηλαστικά δεν

μπορούν να δημιουργήσουν επίπεδα ιαιμίας ικανά να συμβάλλουν στην μετάδοση του ιού (Ratterree et al., 2004). Για το σκοπό διερευνήθηκαν και 3 ερπετά και 1 αμφίβιο (Klenk & Komar, 2003). Ωστόσο διαπιστώθηκε ότι δεν ήταν ικανά να λειτουργήσουν ως ξενιστές ενός βορειοαμερικανικού στελέχους του WNV, ενώ υπήρξαν και κάποιες κλινικές εκδηλώσεις οι οποίες αναπτύχθηκαν σε αυτά τα ζώα. Στον αντίποδα αυτών των ευρημάτων βρίσκεται η δυνατότητα μετάδοσης του ιού από νεαρούς αλιγάτορες σε κουνούπια (*Alligator mississippiensis*) (Klenk et al., 2004). Στη Ρωσία, ο βάτραχος *Rana ridibunda* φαίνεται να συνιστά μια «δεξαμενή» του ιού (Kostiukov et al., 1985). Επίσης, έχει παρατηρηθεί η μετάδοση του WNV να γίνεται μεταξύ εκτρεφόμενων αλιγατόρων, οικόσιτων γαλοπουλών στο Ουισκόνσιν και οικόσιτων χηνών στον Καναδά. Συνολικά, μετάδοση μέσω στενής επαφής έχει επιβεβαιωθεί εργαστηριακά τόσο σε πτηνά όσο και σε αλιγάτορες, αλλά δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί σε πληθυσμούς άγριων σπονδυλωτών (Hayes, Komar et al., 2005; Klenk et al., 2004; Kostiukov et al., 1985).

3.3 Ζώα-Δεξαμενές του WNV

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορα ζωικά είδη όπως ο ινδικός ελέφαντας (*Elephas maximus indicus*), ο ινδικός ρινόκερος (*Rhinoceros unicornis*), ο λεμούριος (*Lemur catta*), το κόκκινο πάντα (*Ailurus fulgens fulgens*), η λεοπάρδαλη του χιονιού (*Panthera uncia*) και το ελάφι-γουρούνι (*Babyrousa babyrousa*) είναι ευαίσθητα στην λοίμωξη από WNV. Ωστόσο, συνήχθη το συμπέρασμα ότι μόνο συγκεκριμένα είδη πτηνών μπορούν να παράγουν ικανή συγκέντρωση του ιού ώστε να μολύνουν τα κουνούπια, κάτι που αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη βιωσιμότητα του προαναφερθέντος κύκλου μόλυνσης. Επίσης, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα πτηνά δεν παίζουν μόνο ρόλο ως δεξαμενή του ιού, αλλά αποτελούν και ενισχυτές του ιικού φορτίου καθώς και πηγή ιικής μόλυνσης για τους τελικούς ξενιστές. Μάλιστα, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την έρευνα του ρόλου των πτηνών στην παθογένεια του WNV προέκυψε από την ανίχνευση του ιού στο αίμα, τον σπλήνα και τον εγκέφαλο περιστερών στο Δέλτα του Νείλου στην Αίγυπτο (McLean et al., 2002).

Ακολούθησε η διεξαγωγή μεταγενέστερων μελετών ευαισθησίας σε οικόσιτα και άγρια πτηνά (Kilpatrick et al., 2007). Έτσι, προέκυψε ότι ποικίλα είδη πτηνών έχουν διαγνωστεί με σοβαρή νόσο του WNV συμπεριλαμβανομένων των εξής: πέρδικα chukar (*Alectoris chukar*), οικόσιτες χήνες (*Anser anser domesticus*), οικόσιτοι φασιανοί *Impeyan* (*Lophophorus impeyanus*), *Strigiformes* (κουκουβάγιες), *Columbiformes* (περιστέρια), *Cathartidae* (γύπες), *Corvidae* (κοράκια και συγγενικά είδη), *Gruidae* (γερανοί), *Pelicanidae* (πελεκάνοι), τρυγόνια (*Streptopelia turtur*), αετοί (*Haliaeetus leucoccephalus*), κουκουβάγια (*Nyctea scandiaca*), φλαμίνγκο (*Phoenicopterus spp.*), κορμοράνοι (*Phalacrocorax spp.*) και αμερικανικά κοράκια (*Corvus brachyrhynchos*) (Wünschmann & Ziegler, 2006).

Αν και ομολογουμένως πολλά είδη πτηνών είναι γενικά δεξαμενές για τον WNV, οι έρευνες που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια των επιδημιών του WNV μεταξύ 1999 και 2001 στις ΗΠΑ, αποκάλυψαν ότι τα είδη *Corvus* είναι τα πιο ευαίσθητα στην εν λόγω ασθένεια και αποτελούν τον κύριο ικό ενισχυτή. Μετά την επιδημία του WNV το 1999 σε αλιγάτορες της Αμερικής, πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι οι αμερικανικοί αλιγάτορες και οι κροκόδειλοι του αλμυρού νερού είναι επίσης ενισχυτές του WNV με αρκετά υψηλές ικές συγκεντρώσεις στο αίμα τους οι οποίες είναι ικανές να μεταδώσουν δυνητικά τον ιό στα κουνούπια (Habarugira, Moran et al., 2020; LaDeau et al., 2007).

Επιπρόσθετα, άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι τα ρακούν (*Procyon lotor*) θεωρήθηκε ότι συνιστούν πιθανές δεξαμενές και ενισχυτές του WNV στην Ευρώπη, αλλά αυτή η υπόθεση εξακολουθεί να αμφισβητείται και κατά συνέπεια απαιτείται η διενέργεια περισσότερων μελετών πάνω στο θέμα αυτό. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι βάσει μελετών, τα ποσοστά επιπολασμού του WNV σε ρακούν στις Η.Π.Α. κυμαίνονται σε ένα ποσοστό της τάξης του 34 με 54% (Bentler et al., 2007). Τέλος, όπως διαπιστώθηκε, οι σκίουροι (*Sciurus niger*) έχουν την ικανότητα να διατηρούν την λοίμωξη από WNV και να συμβάλλουν στην εξάπλωση του ιού στον τελικό ξενιστή (Platt et al., 2008).

3.4 Μετάδοση του WNV στα σπονδυλωτά & πιθανοί τρόποι μετάδοσής του στον άνθρωπο

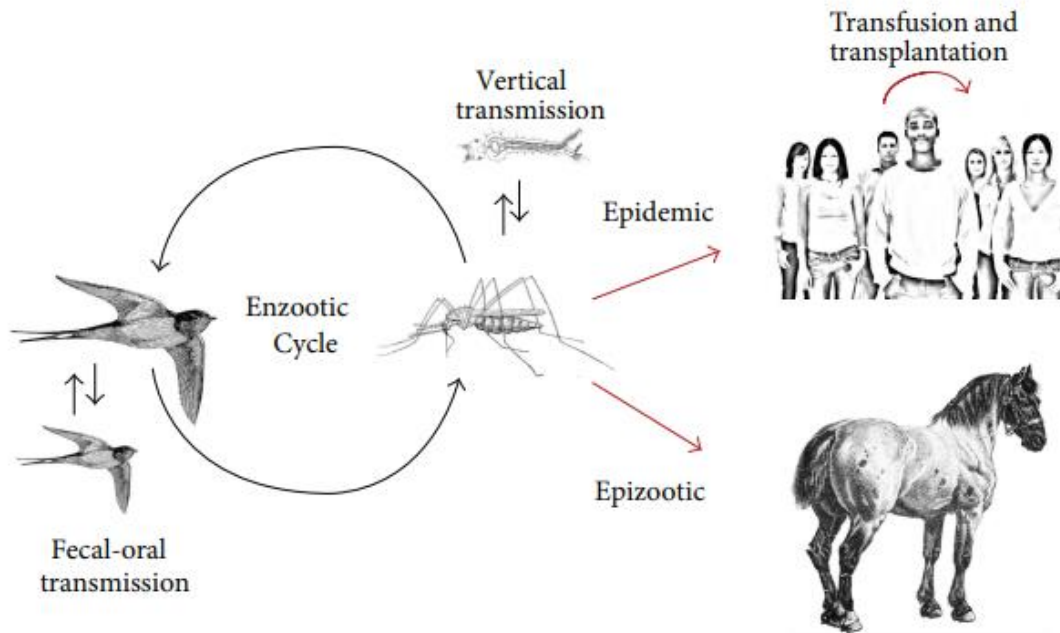
Ο WNV μεταδίδεται στους σπονδυλωτούς ξενιστές του από έναν μολυσμένο φορέα- συνήθως κουνούπι-κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σίτισης του τελευταίου με αίμα. Όπως έχει προαναφερθεί τα κουνούπια διερευνούν τα αγγεία του ξενιστή χρησιμοποιώντας την προβοσκίδα τους μέσω της οποίας εγχέουν φαρμακολογικά ενεργείς πρωτεΐνες σιέλου. Αν και πολλά αιματοφάγα έντομα μπορούν να λάβουν το γεύμα τους χωρίς να διαθέτουν λειτουργικούς σιελογόνους αδένες, η αποτελεσματικότητα της όλης διαδικασίας σίτισής τους περιορίζεται σημαντικά στην περίπτωση απουσίας των σιελογόνων (Hudson et al., 1960; Ribeiro et al, 1985). Έτσι, για να καταπολεμηθεί το αιμοστατικό σύστημα του ξενιστή, όλα τα αιματοφάγα έντομα εγχέουν τουλάχιστον ένα αγγειοδιασταλτικό, έναν αναστολέα της πήξης και έναν αναστολέα αιμοπεταλίων, ενώ συχνά η σιελός τους περιλαμβάνει επίσης ανοσοτροποποιητικές, πεπτικές και αντιμικροβιακές πρωτεΐνες (Schneider & Higgs, 2008). Αν και έχουν περιγραφεί πολυάριθμες πρωτεΐνες στη σιέλο των αιματοφάγων εντόμων, εξακολουθούν να παραμένουν άγνωστες ισάριθμες ή και περισσότερες, ειδικά όσον αφορά την ιογενή λοίμωξη. Κατά τη διάρκεια της «ανίχνευσης», η σιέλος των κουνουπιών εγχέεται κυρίως εξωαγγειακά στο στρώμα του δέρματος (Styer et al., 2007). Φυσικά, τα δερματικά αιμοφόρα αγγεία είναι οι απώτεροι στόχοι για τα αιματοφάγα έντομα. Κατά συνέπεια προκειμένου να εντοπιστούν αυτές οι δομές, η προβοσκίδα πρέπει να περιηγηθεί σε ένα πολύ ελαστικό περιβάλλον που να έχει υψηλή αντοχή στον εφελκυσμό. Έτσι, για να προχωρήσει αποτελεσματικά η όλη διαδικασία σε αυτό το περιβάλλον, η σιέλος των κουνουπιών μπορεί να περιέχει συστατικά που υγροποιούν υπό μία έννοια το σημείο του δαγκώματος. Έχει ταυτοποιηθεί στο *C. quinquefasciatus* μια ενδονουκλεάση της σιέλου με ακριβή λειτουργία τη διευκόλυνση της αιματικής ανίχνευσης στο δέρμα του ξενιστή (Calvo & Ribeiro, 2006).

Αν και το δέρμα του ξενιστή λειτουργεί ως σημαντικός φραγμός σε πολλές λοιμώξεις, το αντιγόνο του WNV έχει ανιχνευθεί στο δέρμα σε πολλαπλές φάσεις της λοίμωξης, κατά συνέπεια δεν αποτρέπει αποτελεσματικά τη νόσο σε αυτή την περίπτωση. Μάλιστα, η αντιγραφή του WNV έχει παρατηρηθεί σε ιστό δέρματος στη θέση του τσιμπήματος από 1 έως και 3 ημέρες μετά την μόλυνση (Schneider et al., 2006). Ο WNV έχει επίσης αποδειχθεί ότι εξαπλώνεται σε περιοχές του δέρματος ετερόπλευρα ως προς το σημείο της αρχικής μόλυνσης (Brown et al., 2007).

Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί ότι ο μολυσματικός WNV παραμένει στο δέρμα στη θέση έγχυσης για τουλάχιστον 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Αυτό επιβεβαιώνεται και από μελέτες οι οποίες τεκμηριώνουν ότι τόσο τα κερατινοκύτταρα όσο και οι ινοβλάστες είναι επιρρεπείς στην μόλυνση από WNV in vitro και in vivo. Ένα ακόμη εύρημα αποτέλεσε το γεγονός ότι το αντιγόνο του WNV ανιχνεύθηκε στα κερατινοκύτταρα με ανοσοϊστοχημεία και ανάλυση FACS (FACS), στις 4 και 5 ημέρες μετά την μόλυνση. Επίσης ο ιός εντοπίστηκε σε ένα μικρό υποσύνολο κυττάρων του δέρματος που στερούνταν τον δείκτη κερατίνης K10, υποδηλώνοντας έτσι ότι τα κύτταρα του δέρματος εκτός από τα κερατινοκύτταρα μπορεί επίσης να αποτελέσουν σημαντικές πρώιμες δεξαμενές του WNV (Lim P.Y. et al., 2011).

Όσον αφορά τους πιθανούς τρόπους μετάδοσης του WNV στον άνθρωπο θα πρέπει να τονιστεί ότι πλην της μετάδοσης μέσω κουνουπιών, μπορεί επίσης να αποκτηθεί νοσοκομειακά κυρίως μέσω μεταμοσχεύσεων οργάνων, χρήσης μολυσμένης βελόνας, αιμοκάθαρσης και μετάγγισης μολυσμένου αίματος. Αυτοί οι τρόποι μετάδοσης αναφέρθηκαν για πρώτη φορά κατά την πρώτη επιδημία του WNV στις ΗΠΑ (Iwamoto et al., 2003; Pealer et al., 2003). Επίσης, έχει αναφερθεί μία περίπτωση διαπλακουντιακής μετάδοσης του WNV στον άνθρωπο καθώς και μια περίπτωση μετάδοσης του WNV μέσω του θηλασμού. Εναλλακτικά, θεωρείται ότι μπορεί να μεταδοθεί και μέσω αερολύματος μεταξύ των χειριστών ζώων και των εργαζομένων σε εργαστήριο (Habarugira, Moran et al., 2020).

Φυσικά, οι μεταγγίσεις αίματος και οι μεταμοσχεύσεις οργάνων από άτομα που είχαν μολυνθεί στο παρελθόν συνιστούν πηγές μόλυνσης από τον WNV που απειλούν την ανθρώπινη ζωή και γι'αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή (Yango et al., 2014). Μάλιστα, ο WNV έχει διαγνωστεί σε άτομα που έλαβαν αίμα καθώς και συστατικά αίματος, συμπεριλαμβανομένων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, του πλάσματος και των αιμοπεταλίων. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι ο ιός μπορεί να είναι παρών και βιώσιμος σε συμπαγή όργανα παρά τα αρνητικά ορολογικά αποτελέσματα. Έτσι, οι μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων αποτελούν έναν πιθανό κίνδυνο για τους δέκτες (Pisani et al., 2016). Συνολικά λοιπόν η μετάδοση του WNV σε ένα ευρύτερο πλαίσιο, λαμβάνοντας υπόψη τους επιζωοτικούς και ενζωοτικούς κύκλους μετάδοσης, απεικονίζεται στην εικόνα 19 (Chancey et al., 2015).



Εικόνα 19: Μετάδοση του WNV λαμβάνοντας υπόψη τους επιζωοτικούς και ενζωοτικούς κύκλους μετάδοσης.

3.5 Παράγοντες κινδύνου μόλυνσης και λοίμωξης από WNV

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες, τόσο γνωστοί όσο και άγνωστοι, που συμβάλλουν στην ενίσχυση του ιού και στην επακόλουθη επιζωοτική δραστηριότητα του WNV (Paz & Semenza, 2013). Μεταξύ των πιο κρίσιμων παραγόντων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αφθονία των κουνουπιών και την συνακόλουθη ενίσχυση του WNV συμπεριλαμβάνονται οι κλιματικές συνθήκες, ιδιαίτερα η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η υγρασία και οι βροχοπτώσεις (Paz et al., 2013). Μάλιστα, μελέτες του *Cx. ripiens* έχουν βρει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος και της πληθυσμιακής αύξησης των φορέων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι υψηλές θερμοκρασίες επηρεάζουν επίσης τον ρυθμό αναπαραγωγής του ιού, οδηγώντας σε μεγαλύτερη μολυσματικότητα (Kilpatrick et al., 2008). Η βροχόπτωση αποτελεί έναν ακόμη βασικό παράγοντα που συνήθως συνδράμει στην αφθονία των κουνουπιών παρέχοντας άφθονα περιβάλλοντα αναπαραγωγής για τα κουνούπια, αν και οι έντονες βροχοπτώσεις και οι πλημμύρες μπορούν επίσης δυνητικά να μειώσουν τις περιοχές αναπαραγωγής των κουνουπιών. Οι συνθήκες ξηρασίας μπορούν να προάγουν την μετάδοση του WNV

αναγκάζοντας τα πτηνά και τα κουνούπια να μοιράζονται τον ίδιο βιότοπο καθώς εντείνουν τον ανταγωνισμό για τις ίδιες πηγές νερού (Montgomery & Murray, 2015).

Η μολυσματικότητα των κουνουπιών εξαρτάται πλήρως από την ύπαρξη ενός πληθυσμού πτηνών ο οποίος δεν έχει ανοσία στον εν λόγω ιό (Reisen, Fang, & Martinez, 2005). Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει για τα πτηνά καθώς είναι επί της ουσίας υπεύθυνα για τη διατήρηση του ιού στο περιβάλλον και αποτελούν τον κρίσιμο σύνδεσμο για τον κύκλο της μετάδοσης. Όπως φαίνεται με την ταχεία επέκταση του WNV σε όλη τη Βόρεια Αμερική, τα πτηνά εξάπλωσαν τον ιό σε νέες γεωγραφικές περιοχές. Την συγκεκριμένη εξάπλωση μάλιστα ακολούθησε και το είδος κουνουπιού *Culex ripiens*, διότι ως ορνιθόφιλο προτιμά να τρέφεται με πτηνά-ξενιστές, ιδιαίτερα passeriformes (Gomes et al., 2013; Hamer et al., 2009).

Άξια αναφοράς είναι και μια μελέτη που έλαβε χώρα στο Ιλινόις, η οποία διαπίστωσε ότι το 80% των γευμάτων αίματος που συλλέχθηκαν από τα *Cx. ripiens* είχαν προέλευση από πτηνά (Hamer et al., 2009). Μάλιστα, ταυτοποιήθηκαν 25 διαφορετικά είδη πτηνών, με το American Robins (*Turdus migratorius*) να συνιστά το 48% αυτών. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι όσον αφορά τις πηγές γεύματός τους από τα θηλαστικά, το 83% ήταν ανθρώπινο. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα διάφορα είδη κουνουπιών εμφανίζουν ποικιλομορφία στις συμπεριφορές αναζήτησης ξενιστή. Πολλοί ερευνητές μάλιστα υποστηρίζουν ότι τα ανθρώπινα κρούσματα συμβαίνουν μόνο όταν υφίσταται σημαντική επιζωοτική δραστηριότητα (Montgomery & Murray, 2015).

Επιπρόσθετα, υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης έχει διαπιστωθεί ότι διατρέχουν άνθρωποι που ζουν σε κοντινή απόσταση από στάσιμες πηγές νερού όπου αναπαράγονται τα κουνούπια. Ενδεικτικά, αξίζει να αναφερθεί ότι στο Χιούστον του Τέξας, όπου τα κουνούπια χρησιμεύουν ως ο κύριος φορέας μετάδοσης της νόσου, μια σχετικά πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε ότι οι ασθενείς με λοίμωξη από WNV ήταν πολύ πιο πιθανό να κατοικούν σε περιοχές με πυκνότερη βλάστηση που είναι κοντά σε στάσιμες πηγές νερού (Nolan, Zangeneh et al., 2012). Ομοίως, στο Ελ Πάσο του Τέξας, όπου το *Cx. tarsalis* συνιστά τον κύριο φορέα του WNV, οι ασθενείς με την συγκεκριμένη νόσο διαπιστώθηκε ότι ήταν κοντά σε αυλές που πλημμύριζαν τακτικά από αρδευτικά κανάλια (Cardenas et al., 2011). Φυσικά εκτός από το να βρίσκεται κάποιος σε περιοχές με υψηλή αφθονία φορέων του WNV, ο κίνδυνος μόλυνσης

μπορεί να επηρεαστεί και από το χρόνο που τα άτομα παραμένουν σε εξωτερικούς χώρους καθώς και από το αν λαμβάνουν προσωπικές προφυλάξεις κατά των κουνουπιών. Στο Χιούστον, μια έρευνα η οποία πραγματοποιήθηκε σε άστεγους διαπίστωσε ότι ο χρόνος που πέρασαν τα άτομα σε εξωτερικούς χώρους επηρέασε σε μεγάλο βαθμό την μολυσματικότητα, με το 12,5% αυτών να αναφέρουν ότι παρέμειναν πάνω από 12 ώρες σε εξωτερικούς χώρους έως ότου τελικά εμφανιστούν θετικοί για τον WNV (Meyer et al., 2007).

Άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η αύξηση του χρόνου που περνούν τα άτομα σε εξωτερικούς χώρους σχετίζεται με μεγαλύτερη πιθανότητα λοίμωξης από WNV (Mostashari et al., 2001). Επιπλέον φαίνεται ότι τα παιδιά έχουν 5 φορές περισσότερες πιθανότητες να μολυνθούν από WNV σε σύγκριση με τους ενήλικες (Mandalakas et al., 2005). Όσον αφορά τους συμπεριφοριστικούς παράγοντες κινδύνου αξίζει να αναφερθεί η μελέτη της Lindsey και των συνεργατών της, οι οποίοι έδειξαν ότι η κατάχρηση αλκοόλ συνιστά σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη λοίμωξης από τον WNV (Lindsey et al., 2012). Οι μεμονωμένοι γενετικοί παράγοντες κινδύνου, επηρεάζουν τόσο τις έμφυτες όσο και τις επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις καθώς μπορούν να συμβάλλουν σε εμφάνιση σοβαρής νευροδιηθητικής νόσου και ακόμη και στο θάνατο μετά από μόλυνση με WNV. Φυσικά ο κίνδυνος για ανάπτυξη σοβαρής λοίμωξης φαίνεται ότι σχετίζεται άμεσα με ορισμένους γονιδιωματικούς παράγοντες, την ηλικία, το ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου, την ύπαρξη χρόνιας νεφρικής νόσου, την συνλοίμωξη από ιό ηπατίτιδας C και την ανοσοκαταστολή (Murray et al., 2006). Ωστόσο οι ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα της τεχνολογίας και της βιοπληροφορικής έχουν καταστήσει εφικτή την λεπτομερή ανάλυση πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων για την κατανόηση της ευαισθησίας του εκάστοτε ατόμου σε ασθένειες (Li, S, et al., 2014).

Σε γενετικό λοιπόν επίπεδο έχει βρεθεί ότι συγκεκριμένοι δείκτες σχετίζονται με την αυξημένη ευαισθησία ανάπτυξης σοβαρής λοίμωξης από WNV. Ειδικότερα έχουν ενοχοποιηθεί στο πλαίσιο αυτό νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) πολλών γονιδίων. Ορισμένοι τύποι HLA φαίνεται επίσης ότι σχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο πιο σοβαρής έκβασης καθώς και ορισμένα στοιχεία απόκρισης στην ιντερφερόνη όπως η OAS-1 (ολιγοαδενυλική συνθετάση 1b) που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του RNA και μια μετάλλαξη που επηρεάζει το μάτισμα της RNaseL, η

οποία έχει αντι-πολλαπλασιαστικό ρόλο έναντι της ιντερφερόνης (Yakub et al., 2005).

Μια άλλη γονιδιωματική μελέτη διερεύνησε περισσότερα από 1500 συμπτωματικά άτομα και έδειξε ότι η πιο σοβαρή νευρολογική νόσος σχετίζεται με SNPs στον RFC1 που είναι αντιγραφικός παράγοντας, στο SCN1a που είναι ένα κανάλι νατρίου και στην ANPEP που είναι μια αμινοπεπτιδάση (Loeb et al., 2011). Επίσης μια νουκλεοτιδική απαλοιφή στο CCR5, που είναι γνωστό ότι δρα προστατευτικά στην μόλυνση με HIV, συσχετίστηκε με την σοβαρότητα της λοίμωξης από WNV, πιθανώς λόγω της μειωμένης λειτουργίας των οδών CCR5 που υφίσταται σε μολυσμένους ξενιστές (Lim et al., 2010).

Πέρα από κάθε αμφιβολία η γήρανση σχετίζεται με την προοδευτική μείωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού (Ruan et al., 2014). Μάλιστα, αρκετά αντικά μονοπάτια παρουσιάζουν μειωμένη αποτελεσματικότητα όσον αφορά την αντιμετώπισή τους λόγω περιορισμού της έμφυτης ανοσίας που παρατηρείται σε κύτταρα από γηραιότερους δότες (Shaw et al., 2013). Πρωταρχική αιτία για αυτό φαίνεται να είναι το γεγονός ότι τα μακροφάγα επιδεικνύουν μια εξαρτώμενη από την ηλικία ανεπάρκεια στις αποκρίσεις που διαμεσολαβείται από υποδοχείς τύπου Toll (TLR3), οδηγώντας έτσι σε πρώιμη και παρατεταμένη αύξηση του επιπέδου των παραγόμενων κυτοκινών. Επιπλέον, η IFN τύπου I που επάγεται από τον WNV ήταν σημαντικά μειωμένη στα δενδριτικά κύτταρα (DCs) από μεγαλύτερους ηλικιακά δότες σε σύγκριση με τους νεότερους. Αυτά τα ελλείμματα στις ρυθμιστικές οδούς των αντι-ικόν αποκρίσεων θα μπορούσαν δυνητικά να συμβάλλουν στην αύξηση αφενός της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και αφετέρου της ευαισθησίας σε λοιμώξεις από τον WNV (Qian et al., 2011).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο παράδοξος ρόλος των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων στην λοίμωξη. Πρόκειται ουσιαστικά για τα πρώτα κύτταρα που ανταποκρίνονται στην λοίμωξη, καθώς επιτρέπουν την αναπαραγωγή του WNV και συνεπώς μπορούν να λειτουργήσουν ως πρώιμη δεξαμενή αναπαραγωγής του WNV. Ωστόσο με το που εκτεθούν στην IFN, συμβάλλουν στην απομάκρυνση του ιού (Bai et al., 2010; Ben-Nathan et al., 1996). Τα μακροφάγα είναι επίσης κρίσιμα αφού οι επίμυες που δεν τα διαθέτουν είναι πιο ευαίσθητοι στην μόλυνση από WNV, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζουν υψηλότερη και πιο εκτεταμένη ιαιμία καθώς και υψηλότερη

θνησιμότητα. Φυσιολογικά, έπειτα από μόλυνση με WNV ο πληθυσμός των γδ Τ κυττάρων αυξάνεται ταχέως και προάγει μια προστατευτική προσαρμοστική ανοσοαπόκριση με την παραγωγή IFN γ και τη διευκόλυνση της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων (Wang et al., 2003). Έτσι, δεν προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι τα άτομα με σοβαρή νόσο διέθεταν χαμηλότερα επίπεδα πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (pDCs), τα οποία είναι κρίσιμα για τις αντι-ικικές αποκρίσεις (Qian et al., 2015).

Ακόμη, μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους έδειξαν ότι η ύπαρξη ελλείψεων στην έκφραση ή τη λειτουργία των μονοπατιών που αφορούν τις χημειοκίνες CXCL10 και CCL2 και την παραγωγή IFN, μειώνει την αποτελεσματικότητα των αντι-ικών αποκρίσεων (Tobler et al., 2008). Ειδικά όσον αφορά την παραγωγή IFN τύπου I και άλλων κυτοκινών αξίζει να υπογραμμιστεί ότι διευκολύνουν τον έλεγχο της αντιγραφής του ιού, καθώς αναγνωρίζουν το RNA του WNV μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων αναγνώρισης των παθογόνων όπως είναι οι TLRs 3, 7 και 8 και οι RIG-I και MDA5 (Errett et al., 2013; Thackray et al., 2014). Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νευροδιηθητικής λοίμωξης από τον WNV διαδραματίζει και η διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB), η οποία ενισχύεται από την απόκριση σε συγκεκριμένες κυτοκίνες (Wang et al., 2013). Κατά συνέπεια, οι παράγοντες οι οποίοι μειώνουν την ακεραιότητα του BBB, θα σχετίζονται άμεσα και με την νευρολογική προσβολή από τον WNV (Πίνακας 2) (Montgomery & Murray, 2015).

Παράγοντας ανοσοποιητικού	Άνθρωπος	Επίμυς	Δράσεις
Κυτοκίνες	IFN α/β	IFN α/β	<ul style="list-style-type: none"> • IFN ελέγχει την πρόιμη αντιγραφή του ιού στον εγκέφαλο
	IL-1	IL-1	<ul style="list-style-type: none"> • IL-1 αυξάνεται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης για να απομακρυνθεί ο ιός από τον εγκέφαλο

	IL-4	ifit2	<ul style="list-style-type: none"> IL-4 προστατεύει έναντι σοβαρής λοίμωξης και είναι μειωμένη στα μακροφάγα ανθρώπων με σοβαρή λοίμωξη WNV
Χημειοκίνες	CCL2 CXCL10	CXCL10 Ccr2 CXCR3	<ul style="list-style-type: none"> CCL2 & CXCL10 περιορίζουν αρχική λοίμωξη από WNV CXCL10 κατευθύνει τα CD8 T κύτταρα
Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού		Caspase 12 ICAM-1 IL-22 MIF MMP9 TLR3 TLR7 TNF α	<ul style="list-style-type: none"> Η μειωμένη ακεραιότητα του BBB προάγει την είσοδο του ιού στον εγκέφαλο

Πίνακας 2: Παράγοντες ανοσοποιητικού που σχετίζονται άμεσα με την νευρολογική προσβολή από WNV.

4. Παθογένεια λοίμωξης από WNV- Παθογενετικοί μηχανισμοί

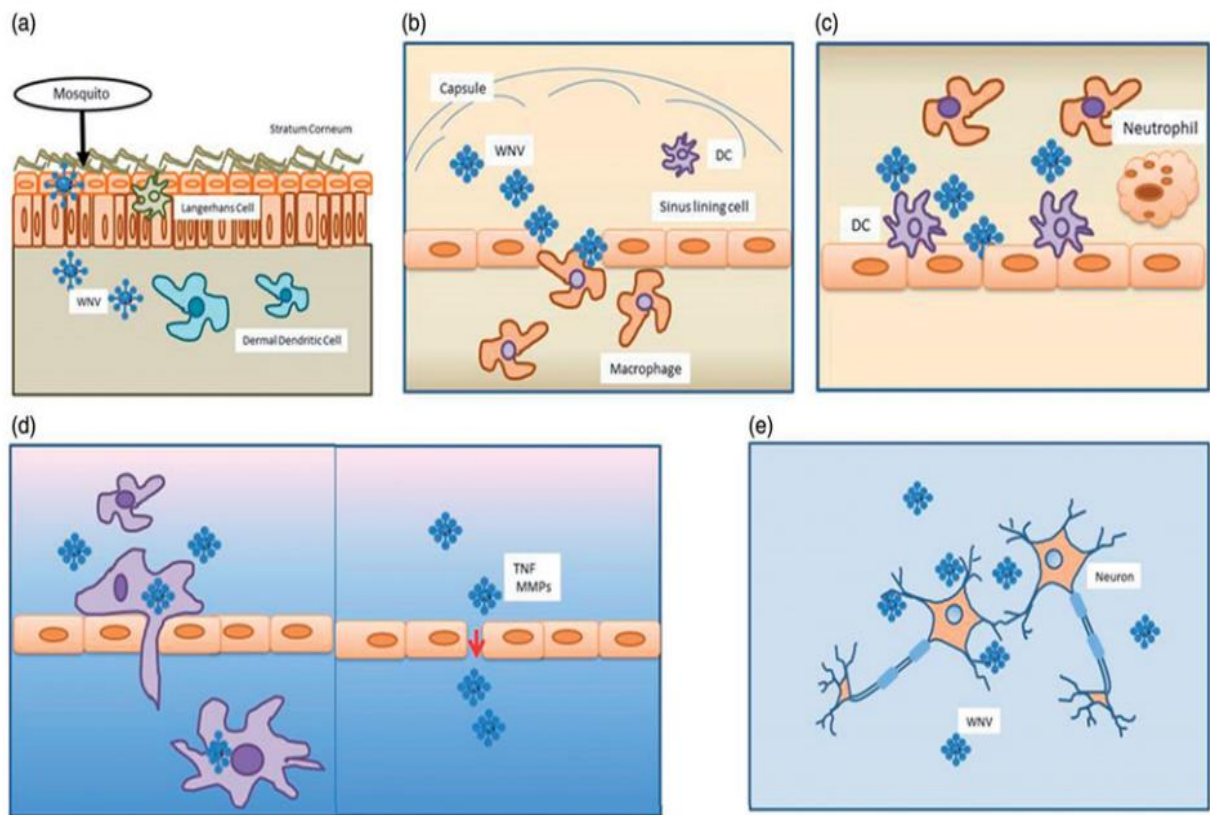
4.1 Τροπισμός & Παθογενετικοί μηχανισμοί WNV

Πιστεύεται ότι ο WNV, έπειτα από ένα τσίμπημα μολυσμένου κουνουπιού, μολύνει τα κερατινοκύτταρα και τα κύτταρα Langerhans, τα οποία μάλιστα μεταναστεύουν στους επιχώριους λεμφαδένες όπου λαμβάνει χώρα η αρχική αντιγραφή του ιού (Ho et al., 2001; Lim, P.Y. et al., 2011). Εν συνεχεία ο WNV εξαπλώνεται συστηματικά στα σπλαχνικά όργανα, όπως ο νεφρός και ο σπλήνας,

όπου και λαμβάνει χώρα ένας δεύτερος κύκλος αντιγραφής πιθανώς σε επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα (Rios et al., 2006). Ανάλογα από τα εκάστοτε επίπεδα ιαιμίας ο WNV μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) και να προκαλέσει μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Αυτό το γεγονός φυσικά δεν προκαλεί έκπληξη υπό την έννοια ότι έχει παρατηρηθεί και σε άλλους νευροτρόπους ιούς, όπως για παράδειγμα στον ιό της εγκεφαλίτιδας του Saint-Louis σε ποντίκια, όπου η πιθανότητα προσβολής του ΚΝΣ φάνηκε να συσχετίζεται τόσο με το επίπεδο όσο και με τη διάρκεια της ιαιμίας (Nathanson, 1980).

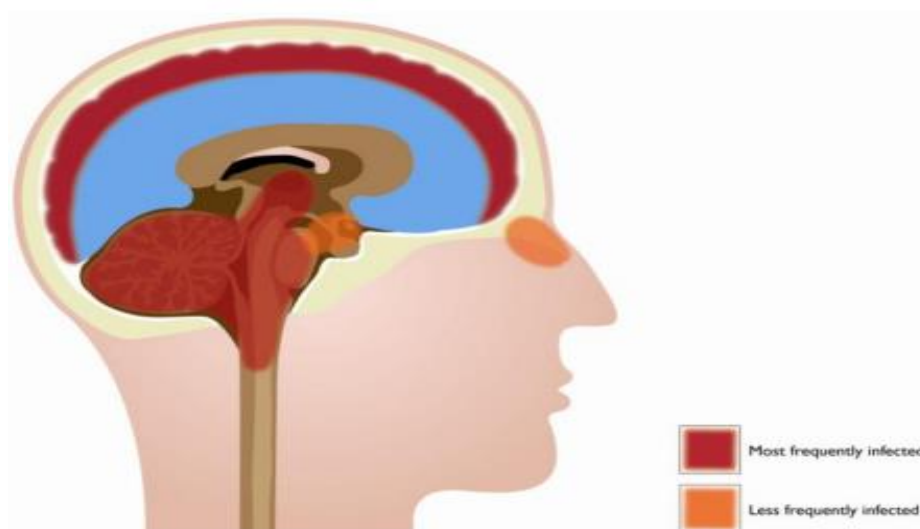
Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην νευρική προσβολή που επάγεται από τον WNV διαθέτει η γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου (E) του ιού καθώς η περιοχή III της εν λόγω πρωτεΐνης, αποτελεί την περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (Beasley & Barrett, 2002). Στο πλαίσιο αυτό έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την είσοδο του WNV στο ΚΝΣ: (i) προσβολή ή παθητική μεταφορά μέσω των επιθηλιακών κυττάρων του ενδοθηλίου ή του χοριοειδούς πλέγματος, (ii) προσβολή των οσφρητικών νευρώνων και εξάπλωση στον οσφρητικό βολβό, (iii) ένας μηχανισμός «δούρειος ίππος», στον οποίο ο ιός μεταφέρεται από μολυσμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που μπορούν να μετακινούνται στο ΚΝΣ και (iv) μέσω άμεσης αξονικής μεταφοράς από τους μολυσμένους περιφερικούς νευρώνες (Hunsperger & Roehrig, 2006; Kramer-Hämmerle et al., 2005; Monath et al., 1983). Αναφορικά με την διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό αξίζει να σημειωθεί ότι επί της ουσίας μπορεί να λάβει χώρα μόνο αφότου προσβληθούν τα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου εγκεφάλου. Σε αυτή λοιπόν την προώθηση του ιού στο ΚΝΣ συμβάλουν μόρια προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων και η σελεκτίνη E διότι μπορούν ουσιαστικά να βοηθήσουν στην διακίνηση των μολυσμένων με WNV κυττάρων στο ΚΝΣ μέσω του αποκαλούμενου μηχανισμού «δούρειου ίππου» (Verma et al., 2009). Όσον αφορά την νευραξονική εξάπλωση του WNV αξίζει να αναφερθεί ότι μπορεί να είναι τόσο σοβαρή ώστε να οδηγήσει σε οξεία παράλυση των άκρων (Samuel et al., 2007). Απ'ότι φαίνεται η νευρωνική προσβολή από τον WNV προκαλεί απώλεια της αρχιτεκτονικής τους, εκφυλισμό και κυτταρικό θάνατο που ακολουθείται από διήθηση από μονοπύρηνα κύτταρα. Μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις τόσο ανθρώπων όσο και τρωκτικών που έχουν προσβληθεί από τον WNV επάγεται τραυματισμός του εγκεφαλικού στελέχους, του ιπποκάμπου και του νωτιαίου μυελού. Στην εικόνα 20 απεικονίζονται οι βασικότεροι παθογενετικοί οδοί-μηχανισμοί που

χρησιμοποιεί ο WNV κατά την είσοδό του στον ανθρώπινο οργανισμό (David & Abraham, 2016).



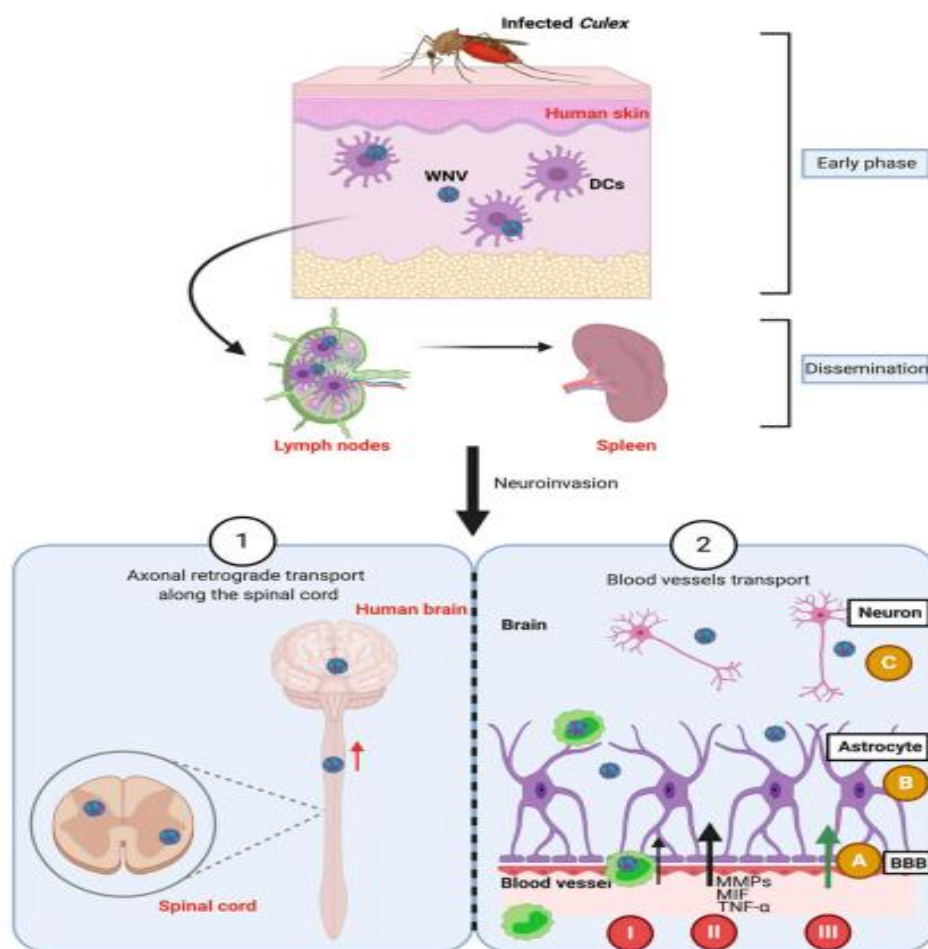
Εικόνα 20: Παθογενετικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τον ανθρώπινο ιό του Δυτικού Νείλου, α) Μόλυνση κερατινοκυττάρων και κυττάρων Langerhans, (b) Μετανάστευση στον λεμφαδένα, (c) Μετανάστευση στον σπλήνα, (d) Διέλευση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, (e) Προσβολή νευρώνων.

Στους ανθρώπους λοιπόν, ο WNV ανιχνεύεται συχνότερα στους νευρώνες στον εγκεφαλικό φλοιό, στον θάλαμο, στο εγκεφαλικό στέλεχος, στα βασικά γάγγλια, στην παρεγκεφαλίδα και στο νωτιαίο μυελό (κυρίως πρόσθιο κέρασ), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, η λοίμωξη έχει ανιχνευθεί στον οσφρητικό βολβό και στον ιππόκαμπο (Εικόνα 21) (Lim, S.M. et al., 2011).



Εικόνα 21: Απεικόνιση των πιο συχνά προσβαλλόμενων περιοχών του ανθρώπινου εγκεφάλου από τον WNV.

Ο WNV έχει εντοπιστεί στις ίδιες περιοχές του εγκεφάλου πειραματικά μολυσμένων ποντικών όπως και στους ανθρώπους που έχουν νοσήσει, υποδηλώνοντας έτσι ότι υφίσταται παρόμοιος τροπισμός του WNV σε ανθρώπους και ποντίκια (Armah et al., 2007). Μάλιστα, η εμφάνιση του ιού σε πολλές θέσεις στον εγκέφαλο και στη σπονδυλική στήλη υποδηλώνει ότι η αιματογενής εξάπλωση συνιστά έναν προφανή τρόπο εισόδου του στο ΚΝΣ. Επιπλέον, η ιστολογική ανάλυση δειγμάτων από θανατηφόρες ανθρώπινες περιπτώσεις παρείχε επίσης ενδείξεις γλοίωσης, υποδεικνύοντας έτσι τη συμμετοχή των μικρογλοιακών κυττάρων και των αστροκυττάρων στην λοίμωξη από WNV. Πειράματα in vitro έδειξαν επίσης ότι ο WNV μπορεί να μολύνει πρωτοταγείς νευρώνες, κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου και ποντικού, φλοιώδη αστροκύτταρα (HBCA), μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου (HBMVE) και ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ διαπιστώθηκε ταυτόχρονα ότι στις περιπτώσεις ιικής προσβολής της μικρογλοίας περιοριζόνταν η αποτελεσματικότητα του ιού (Cheeran et al., 2005; Jordan et al., 2000; Verma et al., 2010). Στην εικόνα 22 παρουσιάζονται επιγραμματικά τα βήματα της σπλαχνικής και νευρικής προσβολής που ακολουθεί ο WNV στον άνθρωπο (Fiacre et al., 2020).



Εικόνα 22: Απεικόνιση των βημάτων που ακολουθεί ο WNV κατά την σπλαχνική και νευρική προσβολή στον άνθρωπο.

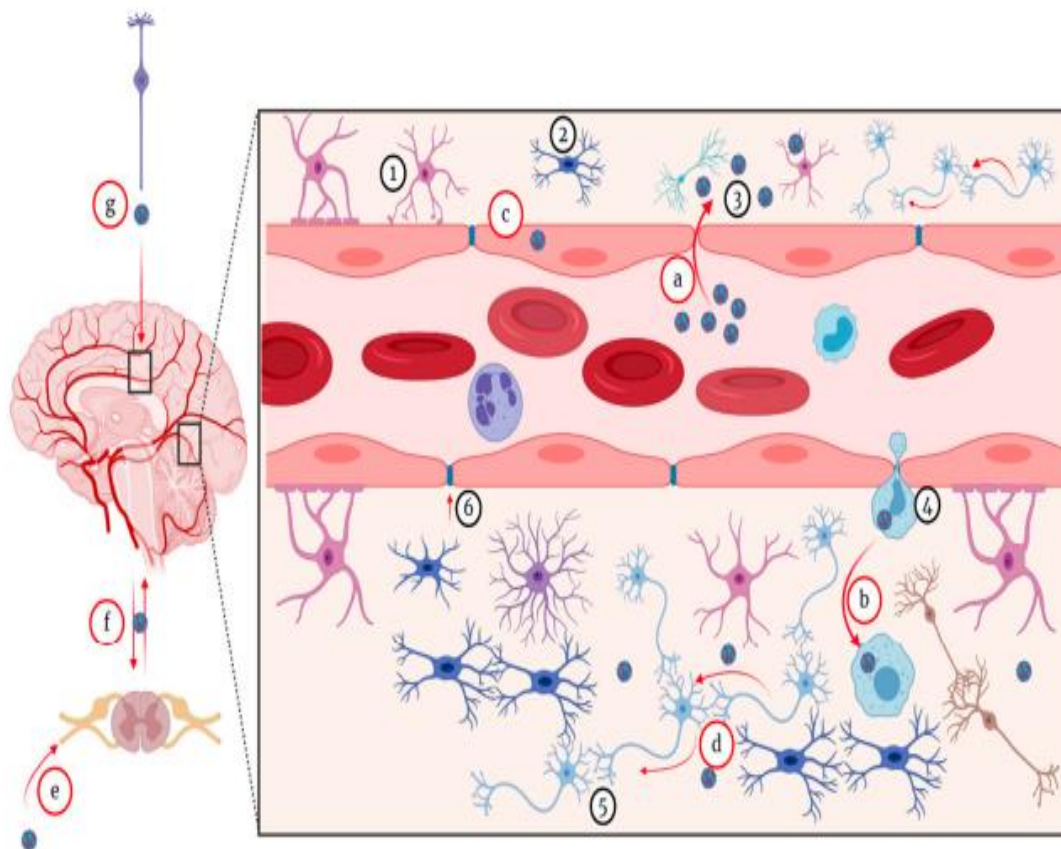
Ακόμη, βρέθηκε ότι η επαγωγή αλλαγών στις πρωτεΐνες του ξενιστή όπως στη σχετιζόμενη με τον θάνατο πρωτεϊνική κινάση 2 (Drak2), στο μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης (ICAM-1), στον ανασταλτικό παράγοντα της μετανάστευσης των μακροφάγων (MIP) και στην μητρική μεταλλοπρωτεάση 9 (MMP-9), συσχετίζεται με μεταβολές στη διαπερατότητα του BBB. Επίσης, όπως έχει προαναφερθεί αλλαγές στον υποδοχέα τύπου Toll 3 (TLR3) μπορούν να συμβάλλουν στην ιική προσβολή του ΚΝΣ μέσω ανοδικής ρύθμισης του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α) (Wang et al., 2004). Επιπρόσθετα, μεταβολές στις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η MCP-5, ο MIF, η IP-10, η MIC και η IFN-γ αποδείχτηκε ότι μπορούν να τροποποιήσουν την απόκριση του ξενιστή στην λοίμωξη από WNV και κατά συνέπεια να συμβάλλουν στην εκδήλωση των νευρολογικών συμπτωμάτων της νόσου (Garcia-Tapia et al., 2007).

4.2 Παθογένεια Νευροδιηθητικής Μορφής

Η νευροδιηθητική μορφή της λοίμωξης από WNV συνιστά αναμφίβολα την πιο σοβαρή μορφή της νόσου. Εμφανίζεται σε περίπου το 1% των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV σε ανθρώπους και ιπποειδή (DeBiasi & Tyler, 2006). Τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ιπποειδή, αυτή η μορφή ασθένειας χαρακτηρίζεται από εικόνα μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας και οξείας χαλαρής παράλυσης/πολιομυελίτιδας (Davis, L.E. et al., 2006). Οι εν λόγω βλάβες μπορεί να περιλαμβάνουν κοκκιοκυτταρική μηνιγγίτιδα και λεμφοπλασματοκυτταρική μηνιγγοεγκεφαλομυελίτιδα. Παρόμοια παθολογία έχει αναφερθεί σε φυσικά και πειραματικά μολυσμένους με WNV αλιγάτορες (Miller et al., 2003). Ωστόσο θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι επί του παρόντος, δεν υπάρχουν αναφορές για εκδήλωση νευροδιηθητικής μορφής λοίμωξης από τον WNV σε άλλα είδη κροκοδείλων. Όσον αφορά τις βλάβες που έχουν προκληθεί σε μολυσμένα πτηνά από την νευροδιηθητική μορφή αξίζει να αναφερθεί ότι είναι παρόμοιες με αυτές που έχουν παρατηρηθεί στα άλλα ζώα. Στην πλειονότητά τους λοιπόν περιλαμβάνουν μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με ήπια έως διάχυτη γλοίωση και γλοιακά οξίδια. Σε σπάνιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί πολυεστιακή νέκρωση στη φαιά ουσία του εγκεφάλου (Dawson et al., 2007). Σε κάθε περίπτωση όμως ο μηχανισμός της νευροπροσβολής που ακολουθείται από τον WNV παρουσιάζει 2 επικρατέστερα σενάρια που περιλαμβάνουν αιματογενείς και διανευρικές οδούς (Εικόνα 23) (Habarugira, Moran et al., 2020).

Έτσι, το πρώτο σενάριο συνίσταται στην άμεση εισβολή στο ΚΝΣ μέσω ενός ενδοθηλιακού μηχανισμού που ακολουθεί την προσβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, αυτός ο μηχανισμός μπορεί να τροποποιείται υπό την έννοια της εξειδίκευσης για τον εκάστοτε ξενιστή και ακόμη και για συγκεκριμένα στελέχη του WNV (Dropulić & Masters, 1990). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου αποτελούν τον κύριο στόχο του ιού στη νευροδιηθητική μορφή της νόσου στους ίππους, στον άνθρωπο ή στους επίμυες (Cantile et al., 2001). Μάλιστα, ο Lim και οι συνεργάτες του υπέθεσαν ότι υφίσταται άμεση συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων και της διάρκειας της ιαιμίας με την προσβολή του νευρικού συστήματος από τον WNV (Lim, S.M. et al., 2011). Ωστόσο, στην πράξη φαίνεται ότι τα είδη που είναι ευαίσθητα στην προσβολή από την νευροδιηθητική μορφή, όπως

το άλογο, τα πρωτεύοντα θηλαστικά και οι κροκόδειλοι, γενικά δεν αναπτύσσουν ουσιαστική και παρατεταμένη ιαμία. Συνεπώς κρίνεται ζωτικής σημασίας η διενέργεια περαιτέρω πειραμάτων στο εν λόγω ζήτημα προκειμένου να διαλευκανθεί.



Εικόνα 23: Νευροδιηθητικοί μηχανισμοί του WNV, a) Παθητική μετανάστευση ελεύθερων σωματιδίων του ιού κατά μήκος του διαταραχμένου αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) έπειτα από αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, b) Μηχανισμός «δούρειου ίππου» μέσω μετανάστευσης μολυσμένων μακροφάγων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, c) Άμεση μόλυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων, d) Ανάδρομη αξονική μεταφορά του WNV, e) Μετανάστευση WNV στον νωτιαίο μυελό, f) Μετανάστευση WNV από το νωτιαίο μυελό στον εγκέφαλο και αντίστροφα, g) Νευροδιηθητικός μηχανισμός με δράση μέσω του οσφρητικού νεύρου. Στην εικόνα απεικονίζονται επίσης: (1) αστροκύτταρα, (2) μικρογλοία, (3) σωματίδια WNV και (4) μεταναστευτικά μακροφάγα.

4.3 Αιματογενής οδός μετάδοσης WNV

Αν και έχει προταθεί η αιματογενής εξάπλωση του WNV, δεν έχει ακόμη αποδειχθεί οριστικά *in vivo*. Συνεπώς, αυτός ο μηχανισμός παραμένει αμφιλεγόμενος. Άλλωστε γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο αναφερόμαστε σε πιθανά σενάρια μετάδοσης του ιού. Από την μία πλευρά θεωρείται πιθανό να ακολουθείται η

ενεργός μεταφορά από τα μολυσμένα αιμοσφαίρια αφού ουσιαστικά η μετανάστευση των μολυσμένων κυττάρων ξεκινά πριν από την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας (Samuel & Diamond, 2005). Από την άλλη πλευρά έχει προταθεί και η παθητική αιματογενής διασπορά λόγω της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας που παρατηρείται κατά τη φλεγμονή στην οξεία φάση. Εναλλακτικά θα μπορούσε να υποτεθεί επίσης ότι η νευροδιήθηση μπορεί αρχικά να προκαλέσει φλεγμονή του νευρικού συστήματος, η οποία στη συνέχεια αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα πυροδοτώντας έτσι την αιματογενή διασπορά (Garcia-Tapia et al., 2007; Habarugira, Suen et al., 2020; Wang et al., 2004).

4.4 Παθητική Μετανάστευση WNV

Μια άλλη υπόθεση αφορά την παθητική μετανάστευση των ελεύθερων σωματιδίων του ιού μέσω του διαταραγμένου αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB). Αυτή η προσπέλαση του BBB συνιστά αποτέλεσμα της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας που προκύπτει λόγω των προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών οξείας φάσης που απελευθερώνονται (Arjona et al., 2007). Ωστόσο, πρόκειται και πάλι για μια υπόθεση που δεν έχει ακόμη επικυρωθεί λόγω της έλλειψης ενός καθολικού *in vitro* ή *in vivo* μοντέλου. Επίσης ένας λόγος για τον οποίο αμφισβητείται το συγκεκριμένο σενάριο συνίσταται στο γεγονός ότι σε μια μελέτη που διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ποντικού, αποδείχθηκε ότι η προσβολή του ΚΝΣ από τον WNV συμβαίνει πριν από την παραγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών (Li-Wang et al., 2015).

4.5 Μηχανισμός «Δούρειος ίππος»

Ο μηχανισμός «Δούρειος ίππος» έχει επίσης προταθεί σε αρκετές μελέτες WNV (Garcia-Tapia et al., 2006). Θεωρείται, μάλιστα ότι η προσβολή του ΚΝΣ από τον WNV μέσω του μηχανισμού του «Δούρειου Ίππου» αποτελεί το αποτέλεσμα της έκφρασης χημειοκινών, λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, που πυροδοτούν τη στρατολόγηση μολυσμένων περιφερικών λευκοκυττάρων στα αγγεία του εγκεφάλου. Εν συνεχεία, τα μολυσμένα λευκοκύτταρα φτάνουν στο παρέγχυμα του εγκεφάλου

μέσω του διαταραγμένου αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Αποτέλεσμα των προαναφερθέντων είναι η ανάπτυξη βλαβών στο ΚΝΣ και η εμφάνιση νευρολογικών κλινικών συμπτωμάτων (Garcia-Tapia et al., 2007). Η νευρολογική προσβολή μέσω του μηχανισμού του «δούρειου ίππου» αποδείχθηκε για έναν άλλο ιό της οικογένειας Flaviviridae, τον ιό της ιογενούς διάρροιας των βοοειδών (BVDV), όπου κατά τη διάρκεια της διαπλακουντιακής μόλυνσης του εμβρύου, μολυσμένα πρόδρομα κύτταρα μικρογλοίας, γνωστά και ως αμινοειδογλοιακά κύτταρα, μετέφεραν τον ιό στον εγκέφαλο μέσω της περικοιλιακής βλαστικής στιβάδας. Από εκεί ο ιός εξαπλώθηκε εν συνεχεία στους νευρώνες και στα νευρογλοιακά κύτταρα (Bielefeldt-Ohmann et al., 2012). Ωστόσο, επειδή η έμφυτη ανοσολογική απόκριση δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένη σε ένα έμβρυο κατά την μέση της κύησης, αυτό το σενάριο μπορεί να μην ισχύει και για την λοίμωξη από τον WNV ενηλίκων ανθρώπων και ζώων και επομένως θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες μελέτες για να αποσαφηνιστεί αυτό το φαινόμενο (Habarugira, Suen et al., 2020; Wang et al., 2004).

4.6 Μηχανισμός διαμέσου νευρικών οδών

Ο μηχανισμός διασποράς δια μέσω των νευρών έχει επίσης προταθεί ως μια άλλη πιθανή οδός προσβολής του εγκεφάλου από τον WNV. Ο μηχανισμός αυτός χαρακτηρίζεται από την μετανάστευση του ιού από το σημείο εισόδου του στο ΚΝΣ μέσω κινητικών και αισθητηρίων νευρών, ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, και κατά συνέπεια η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη σχετικά με αυτόν. Επί του παρόντος, έχουν προταθεί δύο σημεία εισόδου του ιού στον εν λόγω μηχανισμό. Το πρώτο αφορά τα περιφερικά σωματικά νεύρα και το δεύτερο το οσφρητικό νεύρο (Wang, H. et al., 2009). Έχει προταθεί λοιπόν ότι ο WNV εξαπλώνεται από το σημείο εισόδου στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα με ανάδρομη και πρόσθια αξονική μεταφορά και/ή μέσω μη νευρικών κυττάρων όπως τα νευρογλοιακά (αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα). Με αυτόν τον μηχανισμό πιστεύεται ότι η εξάπλωση του ιού διαμεσολαβείται από την απελευθέρωση του ιού από τον περιφερικό άξονα, ενώ συνεχίζει την πορεία του επάγοντας την μόλυνση γειτονικών νευρώνων και τελικά οδηγώντας σε παράλυση σε ορισμένους ξενιστές, όταν το ισχιακό νεύρο προσβάλλεται άμεσα (Maximova, Bernbaum, & Pletnev, 2016). Ειδικότερα, μια ενδεχόμενη παράλυση άκρου προκύπτει συνήθως ως αποτέλεσμα

νευρωνικής βλάβης που σχετίζεται με σοβαρή λοίμωξη και νέκρωση των νευρώνων του πρόσθιου κέρατος του νωτιαίου μυελού της οσφυοϊερής περιοχής (L5-S1) (Samuel et al., 2007).

4.7 Παθογένεια Δερματικής Λοίμωξης επαγόμενης από WNV

Η δερματική εκδήλωση λοιμώξεων από τον WNV έχει τεκμηριωθεί εκτενώς σε ανθρώπους. Χαρακτηρίζεται κυρίως από ένα ερυθριματώδες, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, που επηρεάζει τα άκρα και τον κορμό (Anderson et al., 2004). Μάλιστα όπως έχει προαναφερθεί και στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας τα κερατινοκύτταρα και οι ινοβλάστες του δέρματος και των επιθηλιακών κυττάρων επιτρέπουν την πραγματοποίηση της αντιγραφής του WNV τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Wünschmann et al., 2005). Η λοίμωξη των επιθηλιακών κυττάρων του δέρματος πιστεύεται ότι αποτελεί την αιτία του δερματικού εξανθήματος που παρατηρείται στο 25-45% των περιπτώσεων εγκεφαλομυελίτιδας από WNV στον άνθρωπο (Lim, P.Y. et al., 2011). Ο πολλαπλασιασμός του WNV στα κερατινοκύτταρα του δέρματος έχει αποδειχθεί σε διάφορα στάδια της λοίμωξης από τον WNV, ενώ μάλιστα πιστεύεται ότι τα εν λόγω κύτταρα συνιστούν και τον πρωταρχικό στόχο του ιού (Lim, P.Y. et al., 2011). Άξια αναφοράς είναι στο πλαίσιο αυτό η μελέτη που διεξήχθη από τον Appler και τους συνεργάτες του, που έδειξε την παραμονή του WNV στο δέρμα ποντικού έως και 14 μέρες από τον εμβολιασμό με τον ιό, ενώ το RNA του βρέθηκε ότι μπορεί να παραμείνει έως και 30 μέρες ανεξαρτήτως του αν τελικά θα αναπτυχθεί ή όχι η ασθένεια (Appler et al., 2010). Επιπρόσθετα, αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι αν και το RNA του WNVKUN ανιχνεύθηκε σε δερματικές βλάβες από εκτρεφόμενους κροκόδειλους του θαλασσινού νερού (*Crocodylus porosus*), μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί επιτυχώς ζωντανός ιός από τις προαναφερθείσες βλάβες (Isberg et al., 2019). Τέλος, ο WNV αναπτύχθηκε με επιτυχία σε μια κυτταρική σειρά ανθρώπινου δέρματος, τους ινοβλάστες HFF (Arnold et al., 2004).

4.8 Παθογένεια Γαστρεντερικής Λοίμωξης επαγόμενης από WNV

Η λοίμωξη από τον WNV έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση γαστρεντερικού συνδρόμου στον άνθρωπο η οποία χαρακτηρίζεται από διάρροια, εντερίτιδα, γαστρίτιδα, παγκρεατίτιδα και ηπατίτιδα (Racsa et al., 2014). Η γαστρεντερική λοίμωξη που προκαλείται από τον WNV έχει αναφερθεί έως και στο 30% των ανθρώπινων περιπτώσεων (Chowers et al., 2001). Ωστόσο, μέχρι σήμερα, η αναπαραγωγή του WNV στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (GIT) δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς. Σύμφωνα με την μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Klenk και τους συνεργάτες του, η από του στόματος μετάδοση του WNV στον Alligator mississippiensis έγινε μέσω της διατροφής του με μολυσμένα ποντίκια (Klenk et al., 2004). Έτσι, ο WNV απομονώθηκε από δείγματα κλοακών από περίπου το 84% των μολυσμένων *A. mississippiensis*, υποδεικνύοντας έτσι την πιθανή αναπαραγωγή του ιού στο GIT. Οι αλιγάτορες που είχαν μολυνθεί με το WNVNY99 εμφάνισαν μια κλινική εικόνα που χαρακτηριζόταν από ανορεξία, διάρροια και φούσκωμα, εμποδίζοντας επί της ουσίας τα προσβεβλημένα ζώα από το να βυθιστούν στο νερό. Συνολικά οι σχετικές βλάβες που έχουν παρατηρηθεί σε μολυσμένους αλιγάτορες μέχρι τώρα περιλαμβάνουν την αιμορραγική εντερίτιδα, την πολλαπλασιαστική εντερίτιδα, την ελκώδη-πολλαπλασιαστική οισοφαγίτιδα, την ινώδη και νεκρωτική κολίτιδα, την ιστιοκυτταρική και νεκρωτική ηπατίτιδα και τη νεκρωτική παγκρεατίτιδα (Nevarez et al., 2005).

4.9 Παθογένεια Νεφρικής Λοίμωξης επαγόμενης από WNV

Η ανίχνευση του ιικού RNA του WNV στα ούρα μολυσμένων χάμστερ και ανθρώπων έχει εγείρει ανησυχίες σχετικά με μια πιθανή προσβολή των νεφρικών κυττάρων και μια υπό αυτή την έννοια νεφρική μορφή της νόσου. Ο Barzon και οι συνεργάτες του, ανίχνευσαν το RNA του WNV σε δείγματα ούρων κατά την οξεία φάση της μόλυνσης στους ανθρώπους (Barzon et al., 2013). Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι στους μισούς από τους ασθενείς που ερευνήθηκαν, το ιικό RNA παρέμεινε στα ούρα για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι στο πλάσμα. Επιπλέον, το ιικό φορτίο ήταν σημαντικά υψηλότερο στα ούρα από ότι στο πλάσμα. Η υπόθεση της νεφρικής λοίμωξης υποστηρίζεται επίσης από την ανίχνευση του ιού στους νεφρούς ασθενών που υπέκυψαν στην λοίμωξη από WNV (Huang et al., 2002). Μάλιστα, το RNA του WNV ανιχνεύθηκε επίσης στα ούρα μολυσμένων ασθενών έως και ένα μήνα μετά

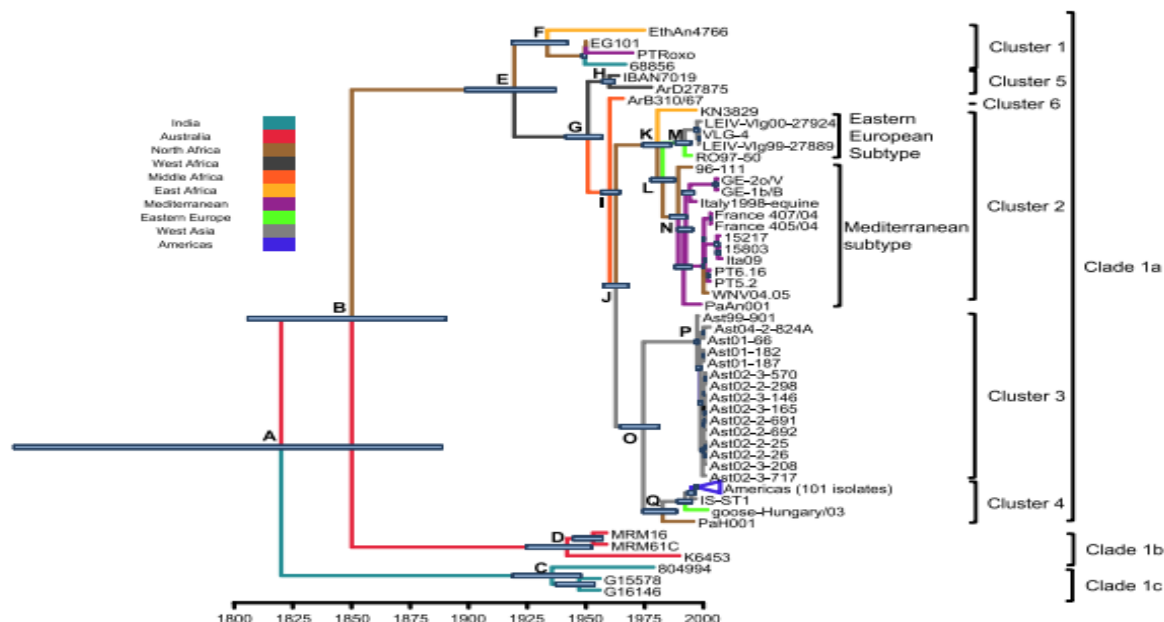
από την λοίμωξη (Baty et al., 2012). Εντύπωση δε προκαλεί το εύρημα ότι ο ιός μπορεί να εντοπιστεί στα ούρα εμβολιασμένων με WNV χάμστερ για έως και δύο μήνες μετά από την ανάρρωση (Tonry et al., 2005). Ωστόσο θα πρέπει να τονιστεί ότι αν και το χάμστερ αποτελεί ένα καλό ζωικό μοντέλο για τη διερεύνηση της νεφρικής λοίμωξης, η χρήση του στελέχους WNV 385-99, το οποίο έχει προσαρμοστεί στο χάμστερ, μπορεί να έχει επηρεάσει αυτά τα ευρήματα. Επομένως, θα άξιζε τον κόπο να διερευνηθεί αυτή η μορφή λοίμωξης σε άλλα συστήματα ζωικών μοντέλων όπως τα κουνέλια και τα ποντίκια. Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι αν και υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την λοίμωξη του νεφρικού παρεγχύματος από τον WNV σε μολυσμένα άτομα, αυτή η μορφή συχνά συνυπάρχει μαζί με άλλες μορφές της νόσου, και κυρίως με τη νευροδιηθητική μορφή. Αν και οι λόγοι αυτής της συσχέτισης δεν έχουν διευκρινιστεί, πιστεύεται ότι η κατάσταση ανοσοκαταστολής των μολυσμένων ανθρώπων θα μπορούσε να συνιστά μια πιθανή εξήγηση. Έτσι, η παθογένεια της νεφρικής μορφής είναι ασαφής και συνεπώς καθίσταται ξεκάθαρο ότι υπάρχει ανάγκη για μοντελοποίηση των λοιμώξεων εργαστηριακά σε περισσότερα ζωικά μοντέλα (Habarugira, Suen et al., 2020).

5. Φυλογενετική ανάλυση & Επιδημιολογικά δεδομένα του WNV

5.1 Φυλογένεια WNV & Γενετική διαφοροποίηση εντός των ειδών του WNV9

Με βάση τη βιολογία, την εξέλιξη, την παθογένεια και τη γεωγραφική κατανομή, ο WNV έχει ομαδοποιηθεί σε εννέα γενεαλογίες ή γενεαλογικές γραμμές (Εικόνα 24) (May et al., 2011; Hall et al., 2001; Mann et al., 2013; Rizzoli et al., 2015). Εκτός από τον ιό Koutango, που συνιστά το μοναδικό μέλος της γενεαλογίας 7, τα στελέχη της γενεαλογίας 1 και 2 του WNV είναι τα πιο λοιμογόνα και ευθύνονται για τα περισσότερα κρούσματα με σοβαρή νευρολογική προσβολή παγκοσμίως (Bakonyi et al., 2006). Η γενεαλογία 1 υποδιαιρείται σε 3 υποκατηγορίες, συμπεριλαμβανομένης της υποκατηγορίας 1a (κλάδος 1a) που περιέχει τις ιικές απομονώσεις από την Αφρική, την Ευρώπη και την Μέση Ανατολή (Lanciotti et al., 1999). Επιπλέον στην γενεαλογία 1 εντάσσεται η υποκατηγορία 1b

(κλάδος 1b) που περιέχει τα στελέχη WNVKUN από την Αυστραλία καθώς και η υποκατηγορία 1c (κλάδος 1c), η οποία είναι επίσης γνωστή και ως γενεαλογία 5. Η τελευταία περιλαμβάνει απομονώσεις του ιού από την Ινδία (Lanciotti et al., 2002).



Εικόνα 24: Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας για τον ιό του Δυτικού Νείλου.

Η γενεαλογία 2, είναι επίσης νευροτροπική αλλά παρουσιάζει μικρότερη μολυσματικότητα, ενώ περιλαμβάνει απομονώσεις από την Υποσαχάρια Αφρική, την Μαδαγασκάρη και την Ευρώπη. Οι ιοί αυτής της γενεαλογίας έχουν προκαλέσει πολλές επιδημίες σε ανθρώπους, άλογα και πτηνά (Bagnarelli et al., 2011; Ciccozzi et al., 2013). Οι γενεαλογίες 3 και 4 προέρχονται από μία απομόνωση ιικού στελέχους η καθεμία. Ειδικότερα όσον αφορά την γενεαλογία 3, αξίζει να αναφερθεί ότι είναι επίσης γνωστή και ως ιός Rabensburg και έχει μόνο ένα στέλεχος με προέλευση από την Τσεχική Δημοκρατία (Aliota & Kramer, 2012). Η γενεαλογία 4 αποτελείται από ένα στέλεχος WNV (LEIV-VIg99-27889-human, LEIV-VIg00-27924-human, Ast99-90 I-human) το οποίο έχει απομονωθεί από τη Ρωσία (Lvov et al., 2004).

Η γενεαλογία 6 έχει προταθεί με βάση την αλληλουχία του γονιδίου NS5 στον WNV που έχει απομονωθεί από την Ισπανία (HU2925/06) (Vázquez et al., 2010). Η γενεαλογία 7 αποτελείται από τον ιό Koutango (Flavivirus), που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1968 στο Koutango της Σενεγάλης και αργότερα στη Σομαλία (Butenko et al., 1986). Ο ιός Koutango αν και αρχικά ταξινομήθηκε ως ένα ανεξάρτητο είδος φλαβοϊού, αργότερα ταξινομήθηκε ως ένα στέλεχος του WNV

(Charrel et al., 2003). Μάλιστα ο ιός Koutango αποδείχθηκε ότι είναι περισσότερο παθογόνος από τα άλλα λοιμώδη στελέχη (Prow et al., 2014). Κάποιοι ερευνητές θεωρούν ότι υφίσταται και η γενεαλογία 8, στην οποία εντάσσουν τον ιό που απομονώθηκε από το *Culex perfuscus* στο Kedougou της Σενεγάλης (Fall et al., 2014).

Τέλος, το στέλεχος WNV-Uu-LN-AT-2013, που απομονώθηκε στην Αυστρία, προτάθηκε να αποτελέσει μέρος της γενεαλογίας 4 ως υποκατηγορία 4c. Αν και συνήχθη το συμπέρασμα ότι αυτή η απομόνωση δεν εμφανίζει εξειδίκευση ως προς κάποιο έντομο ή κουνούπι, δεν υπάρχουν αναφορές για την *in vivo* παθογένειά του είτε σε ανθρώπους είτε σε ζώα (Habarugira, Suen et al., 2020; Pachler et al., 2014). Στην εικόνα 25 φαίνεται η σχετική γεωγραφική κατανομή των γενοτύπων του WNV παγκοσμίως (Scherret et al., 2002).

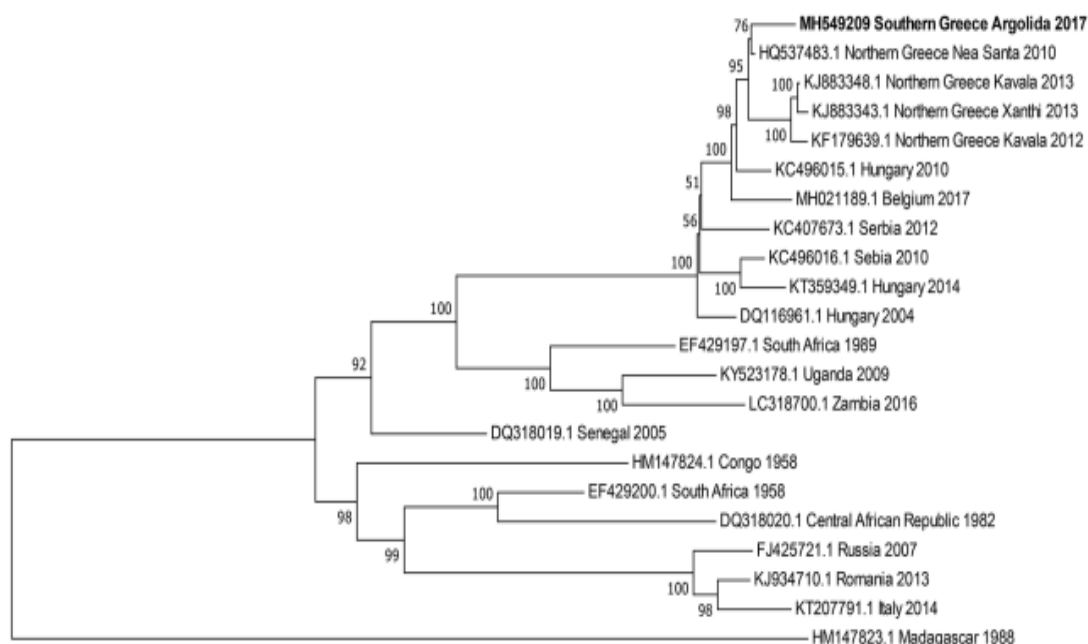


Εικόνα 25: Γεωγραφική κατανομή των γενοτύπων του WNV σε παγκόσμια κλίμακα.

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει για την περίπτωση της Ελλάδας καθώς ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι ο αιτιολογικός παράγοντας μιας συνεχιζόμενης έξαρσης κρουσμάτων της νόσου στην Ελλάδα με τις απαρχές της στο 2010. Μέχρι το 2014, διαδοχικές ετήσιες εστίες εμφανίζονταν κυρίως στην κεντρική και βορειοανατολική Ελλάδα (Gossner et al., 2017). Μετά από 2 χρόνια παύσης, από τον Ιούλιο έως και τον Οκτώβριο του 2017, έλαβε χώρα μια επιδημία στην περιοχή της Πελοποννήσου

στη νότια Ελλάδα που οδήγησε σε 48 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα και 5 θανάτους. Το 2018, τα κρούσματα διευρύνθηκαν περαιτέρω, με ένα σύνολο 243 ανθρώπινων κρουσμάτων και 50 θανάτων τα οποία αναφέρθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Valiakos et al., 2019).

Έτσι, ο Valiakos και οι συνεργάτες του συνέλεξαν νεκρά από τον WNV πτηνά και πιο συγκεκριμένα κίτσες, κατά τους μήνες του Ιουλίου και του Αυγούστου 2017, από πόλεις που εντοπίζονται στο νοτιοανατολικό άκρο της Πελοποννήσου. Από αυτά και πήραν δείγματα εγκεφαλικού ιστού κατά τη διάρκεια της νεκροψίας για ενοφθαλμισμό σε κυτταροκαλλιέργειες (Valiakos et al., 2019). Εν συνεχεία πραγματοποίησαν ενίσχυση του γονιδιώματος του WNV με PCR και διεξήγαγαν αλληλούχηση BLAST η οποία έδειξε ότι το Argolida-Greece-2017 στέλεχος εμφάνιζε την υψηλότερη ομοιότητα αλληλουχίας (99,79%) με το Nea Santa-Greece-2010 (Para, Bakonyi, et al., 2011). Μάλιστα αξίζει να σημειωθεί ότι το εν λόγω στέλεχος ήταν υπεύθυνο για την μεγαλύτερη επιδημία ανθρώπινης λοίμωξης από WNV για το 2010. Φυλογενετική ανάλυση επιβεβαίωσε αυτή τη στενότερη σχέση με το στέλεχος Nea Santa σε σχέση με άλλα στελέχη εντός του συμπλέγματος Hungary/04. Τα ευρήματα της συγκεκριμένης ερευνητικής ομάδας έδειξαν πιθανή εισαγωγή του στελέχους Nea Santa στην περιοχή της νότιας Ελλάδας. Συνολικά, το στέλεχος Argolida-Greece-2017 έχει συνολικά 23 νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις (3 από αυτές στην αμετάφραστη 3' περιοχή του ιικού γονιδιώματος) και 4 αλλαγές αμινοξέων σε σύγκριση με το φυλογενετικά πιο κοντινό στέλεχος της Nea Santa. Οι αλλαγές αμινοξέων αφορούν την μετάλλαξη I159M στο γονίδιο του φακέλου κοντά στο NYS μοτίβο γλυκοζυλίωσης, τις μεταλλάξεις H22Y και A298V στο μη δομικό γονίδιο 1 (NS1) και την μετάλλαξη K805R στο γονίδιο NS5. Ωστόσο θα πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε περίπτωση αυτές οι αλλαγές δεν φαίνεται να επηρεάζουν τους λοιμογόνους παράγοντες του ιού (Botha et al., 2008). Έτσι, η προαναφερθείσα ερευνητική ομάδα κατόρθωσε να φτιάξει το φυλογενετικό δέντρο της γενεαλογικής γραμμής 2 του WNV στην Ελλάδα και συνέκριναν τη γενεαλογία 2 με τις άλλες γνωστές γενεαλογίες του ιού (Εικόνα 26) (Valiakos et al., 2019).



Εικόνα 26: Φυλογενετικό δέντρο της γενεαλογικής γραμμής 2 του WNV στην Ελλάδα και σύγκρισή της με άλλες γνωστές γενεαλογικές γραμμές του ιού.

5.2 Μοριακή επιδημιολογία του WNV

Όπως έχει αναφερθεί κατά την φυλογενετική ανάλυση του ιού, το γονιδίωμα του WNV διαχωρίζεται σε τουλάχιστον επτά βασικές γενεαλογίες με βάση την ομολογία μεταξύ των νουκλεϊκών οξέων των διαφόρων ικών στελεχών. Ενδεικτικά αξίζει να υπογραμμιστεί ότι οι κύριες γενεαλογικές γραμμές αποκλίνουν μεταξύ τους κατά 25%–30% ως προς τη νουκλεοτιδική τους σύσταση. Ωστόσο μόνο οι γενεαλογίες 1 και 2 έχουν εμπλακεί σε πρόκληση νόσου στον άνθρωπο, γι' αυτό και θα επικεντρωθούμε σε αυτές (Gray & Webb, 2014).

Η γενεαλογική γραμμή 1 WNV παρουσιάζει ευρεία γεωγραφική κατανομή, συμπεριλαμβανομένης της Αφρικής, της Ευρώπης, της Αυστραλίας, της Ασίας, της Βόρειας και Κεντρικής Αμερικής, καθώς και της Μέσης Ανατολής (Lanciotti et al., 1999). Η γενεαλογική γραμμή 2 του WNV μέχρι και τα μέσα της δεκαετίας του 2000, περιοριζόταν κυρίως στην Αφρική, αποτελώντας την κυριότερη αιτία μιας ήπιας εμπύρετης ασθένειας στους ανθρώπους με σπάνια εξέλιξη σε σοβαρή ασθένεια. Ωστόσο, το 2004 και το 2005, ο WNV της γενεαλογίας 2 εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε άγρια πτηνά στην Ουγγαρία, ενώ ακολουθήθηκε από ταχεία εξάπλωση σε

μεγάλο μέρος της κεντρικής Ευρώπης. Αυτοί οι ιοί της γενεαλογίας 2 έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές περιπτώσεις νευροδηθητικής νόσου των πτηνών, των ιπποειδών και του ανθρώπου καθώς και θανάτων, στη Ρωσία, στην Ουγγαρία, στην Ιταλία και στην Ελλάδα. Μάλιστα η επιδημία του WNV που ξέσπασε στην Ελλάδα το 2010 έχει αποδοθεί, όπως αναφέρθηκε, στη γενεαλογία 2 του WNV. Διαπιστώθηκε ότι ο βαθμός γονιδιωματικής ομοιότητας μεταξύ του στελέχους που απομονώθηκε στην Ελλάδα το 2010 με το στέλεχος του ιού που είχε απομονωθεί στην Ουγγαρία το 2004 ήταν ιδιαίτερα υψηλός. Τα στελέχη που ανήκουν στις γενεαλογίες 1 και 2 του WNV θεωρούνται πλέον ενδημικά στη νοτιοανατολική Ευρώπη, επιδεικνύοντας αύξηση ανώτερη του 700% των περιπτώσεων που αναφέρθηκαν στην περιοχή το 2009 (ECDC, 2012). Σε σύγκριση λοιπόν με τη γενεαλογική γραμμή 1, οι απομονώσεις της γραμμής 2 του WNV φαίνεται ότι έχουν μικρότερο γεωγραφικό εύρος, που εντοπίζονται στην Αφρική, στην Ευρώπη και στην περιοχή του Βολγκογκράντ της Ρωσίας. Μάλιστα θεωρείται ότι αφότου εμφανίστηκε ο WNV στην Αφρική, μετέπειτα εξαπλώθηκε στην Ευρώπη, στη Ρωσία και στην Μέση Ανατολή, πιθανότατα μέσω αποδημητικών πτηνών. Στο πλαίσιο αυτό αξίζει να αναφερθεί η φυλογενετική μοριακή ανάλυση που διενεργήθηκε από τον McMullen και τους συνεργάτες του, σύμφωνα με την οποία η γενεαλογία 2 του WNV εμφανίστηκε στην Αφρική σε τουλάχιστον τρεις διακριτές περιπτώσεις. Το πρώτο σχετικό συμβάν έλαβε χώρα κατά τον 19ο αιώνα/αρχές του 20ου αιώνα, όταν ο ιός εξαπλώθηκε σε μια περιοχή, πιθανότατα στην περιοχή της Μεσογείου, που τελικά οδήγησε σε απομόνωση του ιού στην Κύπρο το 1968. Το δεύτερο και το τρίτο συμβάν σημειώθηκε στα μέσα του 20ου αιώνα, όταν ο ιός εμφανίστηκε στη νοτιοδυτική Ρωσία και στην Ευρώπη και αργότερα απομονώθηκε από κρούσματα στην Ουγγαρία, στην Ιταλία και στην Ελλάδα (McMullen et al., 2013). Αν και η εν λόγω μελέτη έδειξε ότι ο WNV εμφανίστηκε στην Αφρική σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές περιπτώσεις, είναι πιθανό να υπήρχε συνεχής μετακίνηση του WNV μεταξύ των προαναφερθέντων περιοχών σε ετήσια βάση, αλλά να εντοπίστηκε μόνο όταν ο ιός έγινε πιο μολυσματικός και/ή εισήλθε σε νέες περιοχές (Bagnarelli et al., 2011; Papa, Xanthopoulou et al., 2011). Σαφώς, μια καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα στελέχη της γενεαλογίας 2 του WNV έχουν μετακινηθεί μεταξύ Αφρικής και Ευρασίας θα μπορούσε να αποκτηθεί με την διενέργεια αλληλούχισης περισσότερων ιικών γονιδιωματικών ακολουθιών (Gray & Webb, 2014; McMullen et al., 2013).

Καθώς ο ιός της γενεαλογικής γραμμής 2 εξαπλώθηκε και συνέχισε να εξελίσσεται, φαίνεται ότι έγινε πιο λοιμογόνος, οδηγώντας έτσι σε αυξημένο αριθμό κρουσμάτων σε πτηνά, ιπποειδή και ανθρώπους. Αυτό φυσικά το εξελικτικό μοτίβο είναι παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται με τα στελέχη της γενεαλογίας 1, τα οποία έχουν επίσης εξελιχθεί από έναν εξασθενημένο σε έναν παθογόνο φαινότυπο κατά τα ίδια 300-400 χρόνια. Μάλιστα, όσον αφορά τα απομονωμένα στελέχη της σειράς 2, η αλλαγή από τον εξασθενημένο στον μολυσματικό φαινότυπο, με βάση τον νευροδιηθητικό φαινότυπο ποντικού, χαρακτηρίζεται από έξι υποκαταστάσεις αμινοξέων: τις E-V159I, NS1-L338T, NS2A-A126S, NS3-N421SL, NSB και NSB -Y254F. Στις περισσότερες από αυτές τις θέσεις, τα αμινοξέα διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών γενεαλογικών γραμμών (Πίνακας 3) (McMullen et al., 2013).

Position	Lineage						
	1a	1b	2, clades a-c (attenuated)	2, clade d (virulent)	3	4	5
E-159	T	V/A/I	V	I	M	N	Q
NS1-338	Q	Q	L	T	L	L	Q
NS2A-126	L	L	A/L	S	G	N	Q
NS3-421	S	S	N	S	S	S	S
NS4B-20	I	I	L/S/V	P	P	T	L
NS5-254	Y	Y	Y	F	Y	Y	Y

Πίνακας 3: Υποκαταστάσεις αμινοξέων στις κικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μολυσματικότητα της γενεαλογίας 2 του WNV.

Στη θέση E-159, μια ισολευκίνη βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα προϊόντα απομόνωσης της γενεαλογίας 1b της ομάδας η οποία περιλαμβάνει τα λοιμώδη στελέχη της Βόρειας Αμερικής και τους προγόνους τους (TUN97, ISR98 και HUN03). Αυτές οι απομονώσεις έχουν βαλίνη στη θέση E-159. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι το 2002, στη θέση αυτή εντοπιζόταν μια αλανίνη. Αυτή η αντικατάσταση επί της ουσίας αντιστοιχεί στην μετάβαση από τον γονότυπο NY99 στον NA/WN02 στη Βόρεια Αμερική. Οι κλάδοι a και b της γραμμής 2 περιέχουν επίσης μια βαλίνη σε αυτή τη θέση, ενώ οι κλάδοι c και d περιέχουν μια ισολευκίνη (Beasley et al., 2003; Davis, C.T. et al., 2005; Ebel et al., 2004; McMullen et al., 2013).

Στη θέση 338 στην NS1, οι αδρανοποιημένοι κλάδοι της γραμμής 2 περιέχουν μια λευκίνη, η οποία βρίσκεται επίσης στις απομονώσεις των αδρανοποιημένων γραμμών

3 και 4. Τα λοιμώδη στελέχη της γενεαλογίας 2 (κλάδος d) έχουν θρεονίνη σε αυτή τη θέση. Η NS3-S421 είναι διατηρημένη σε όλες τις γραμμές, εκτός από την γραμμή 2 των αδρανοποιημένων κλάδων a, b & c που περιέχουν ασπαραγίνη. Η υποκατάσταση NS5-Y254 σε φαινυλαλανίνη είναι η μόνη μετάλλαξη που βρέθηκε σε λοιμογόνα στελέχη της γραμμής 2. Αυτή η θέση βρίσκεται στην περιοχή της μεθυλοτρανσφεράσης (MTάση) του NS5 κοντά στη θέση δέσμευσης του RNA και η μετάλλαξη σε αλανίνη έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει τη δραστηριότητα της μεθυλίωσης. Όμως ταυτόχρονα παρατηρείται και η υποκατάσταση μιας τυροσίνης από μια φαινυλαλανίνη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια μιας ομάδας υδροξυλίου. Αυτή η αλλαγή θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει σε αυξημένη δραστηριότητα της μεθυλοτρανσφεράσης, η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάδοση του ιού, οδηγώντας έτσι στην εδραίωση του λοιμογόνου φαινοτύπου του WNV που παρουσιάζεται και από τους κλάδους του πίνακα 3 που περιέχουν την μετάλλαξη (Zhou et al., 2007; Dong et al., 2008).

Τέλος, μια πρόσθετη υποκατάσταση αμινοξέος που πρέπει να σημειωθεί είναι η υποκατάσταση σε μια προλίνη στην NS3-249, η οποία βρίσκεται ταυτόχρονα στο στέλεχος GRE10 της γραμμής 2 (H249P) και στη γραμμή 1a, που αφορά ικές απομονώσεις από την Μέση Ανατολή και την Αμερική (T249P). Αυτή η υποκατάσταση έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε αυξημένη λοιμογόνο δράση και παθογένεση σε κοράκια της Αμερικής και άλλα πτηνά (Brault et al., 2007). Ενδιαφέρον δε προξενεί το γεγονός ότι το στέλεχος GRE10 που απομονώθηκε κατά τη διάρκεια της μεγαλύτερης επιδημίας της γραμμής 2 που έχει καταγραφεί μέχρι και σήμερα σε συνδυασμό με την φυλογενετική ανάλυση υποδηλώνει ότι αυτή η απομόνωση προήλθε από την περίοδο 1995–2009, η οποία συμπίπτει χρονολογικά με την πραγματοποίηση της αντικατάστασης στη NS3-249 της γενεαλογίας 1a. Συνολικά λοιπόν φαίνεται ότι η γενεαλογία 2 του WNV αποτελεί μια συνεχή απειλή για την Ευρώπη και ενδεχομένως και για άλλες περιοχές σε όλο τον κόσμο. Η καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο έχουν εξελιχθεί αυτά τα απομονωμένα στελέχη μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για την μελλοντική εξέλιξη αυτής της γενεαλογίας και να μας επιτρέψει να προβλέψουμε καλύτερα πώς αυτά τα απομονωμένα στελέχη θα οδηγήσουν μελλοντικά σε επιδημίες (May et al., 2011).

5.3 Επιδημιολογία και κλινική συμπτωματολογία λοίμωξης από WNV

Οι περισσότερες ανθρώπινες λοιμώξεις από τον WNV (~80%) είναι ασυμπτωματικές. Ωστόσο θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι συμπτωματικές λοιμώξεις προκαλούμενες από τον WNV διαφοροποιούνται ως προς την κλινική συμπτωματολογία τους από την αδιαθεσία που επάγεται από το κοινό κρυολόγημα, διότι στην πρώτη περίπτωση δύναται να προσβληθεί και το ΚΝΣ. Λιγότερο από το 1% των ανθρώπινων λοιμώξεων εξελίσσεται σε σοβαρή ασθένεια, για την οποία οι πιο συχνά αναφερόμενοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν την προχωρημένη ηλικία, την καταστολή του ανοσοποιητικού και την ύπαρξη άλλων χρόνιων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης, του διαβήτη και της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Ενδεικτικά αξίζει να αναφερθεί ότι το 2002, από τις περίπου 4000 περιπτώσεις που αναφέρθηκαν από το CDC, 150 αφορούσαν ασθενείς ηλικίας 19 ετών και κάτω και ενώ ο νεότερος θάνατος ήταν ένας 19χρονος ασθενής, η μέση ηλικία των θανατηφόρων περιπτώσεων ήταν τα 78 έτη. Στην επιδημία του 2003, καταγράφηκαν τουλάχιστον 31 περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας από τον WNV και 79 περιπτώσεις μηνιγγίτιδας από τον WNV, οι οποίες μάλιστα εμφανίστηκαν σε παιδιά και εφήβους. Ωστόσο, δεν υπήρξαν θάνατοι οι οποίοι να προκλήθηκαν από τον WNV σε παιδιά ή εφήβους (Hayes & O'Leary, 2004). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ένας στους τέσσερις με πέντε (20-25%) που έχουν μολυνθεί από τον WNV αναπτύσσουν ήπια ασθένεια, ενώ ένα άτομο στα 150 (0,67%) αναπτύσσει νευροδιηθητική λοίμωξη από τον WNV (WNND) (Arya et al., 2004). Μεταγενέστερες επιδημιολογικές μελέτες χρησιμοποιώντας δεδομένα από το CDC σχετικά με ασυμπτωματική μόλυνση, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μία στις 244 έως μία στις 353 λοιμώξεις θα εξελιχθούν σε WNND (Busch et al., 2006).

Στο πλαίσιο αυτό αξίζει να αναφερθεί και μια μελέτη για τις λοιμώξεις που προκλήθηκαν από την γενεαλογία 2 του WNV στην Ελλάδα το 2010 (Ladbury et al., 2013). Η συγκεκριμένη λοιπόν ερευνητική ομάδα εκτίμησε ότι μία στις 124 έως και 141 λοιμώξεις μπορεί να οδηγήσει σε WNND, με περίπου το 18% των μολυσμένων ατόμων να εμφανίζει συμπτώματα. Μεταξύ των ασθενών με WNND, διαπιστώθηκε ότι το 50–71% αναπτύσσει εγκεφαλίτιδα, το 15–35% μηνιγγίτιδα και το 3–19% αναπτύσσει οξεία χαλαρή παράλυση (Klein et al., 2002; Sirbu et al., 2011).

Αξιοσημείωτο δε είναι το γεγονός ότι από τα σοβαρά περιστατικά οδηγείται σε θάνατο το 3% έως 19% των περιπτώσεων εγκεφαλίτιδας. Ακόμη ο Loeb και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η σωματική και πνευματική αναπηρία υποχωρεί αφότου παρέλθει περίπου ένα έτος από την λοίμωξη από WNV (Loeb et al., 2008). Ωστόσο η κατάσταση αυτή δύναται να τροποποιηθεί σε ασθενείς με προϋπάρχουσες συννοσηρότητες. Όπως είναι αναμενόμενο αυτοί οι ασθενείς χρειάζονται περισσότερο χρόνο προκειμένου να αποκατασταθεί πλήρως η κατάσταση της υγείας τους. Παρά ταύτα, τα αποτελέσματα που άπτονται του το εν λόγω ζητήματος είναι ιδιαίτερα συγκεκριμένα καθώς άλλες μελέτες ασθενών που έχουν προσβληθεί από WNV έχουν καταγράψει σωματικά συμπτώματα ή/και γνωστικά ελλείμματα που επιμένουν για περισσότερο από ένα έτος μετά την λοίμωξη σε περισσότερο από το ήμισυ των περιπτώσεων WNND. Συνήθως όμως η επιμονή των συμπτωμάτων για περισσότερο από 6 μήνες αφορούσε ασθενείς με WNND, υπέρταση και διαβήτη (Cook et al., 2010). Επιπλέον μια μακροχρόνια μελέτη παρακολούθησης ασθενών με WNV ανέφερε την νευροδιηθητική λοίμωξη από WNV ως παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη χρόνιας νεφρικής ασθένειας (Nolan, Podoll et al., 2012). Επίσης πιστεύεται ότι τόσο ο κίνδυνος ασθένειας όσο και ανάπτυξης νευροδιηθητικής λοίμωξης από WNV είναι χαμηλότερος στην περίπτωση του υποτύπου Kunjin (κλάδος 1b) που κυκλοφορεί στην Αυστραλία. Μάλιστα μέχρι πρόσφατα, θεωρούνταν ότι οι ιοί της γενεαλογικής γραμμής 2 δεν μπορούσαν να προκαλέσουν WNND στους ανθρώπους. Ωστόσο, επιδημίες της γενεαλογίας 2 του WNV τα τελευταία 10 χρόνια στη Ρωσία και στην Ελλάδα έχουν προκαλέσει τόσο WNND όσο και θάνατο, με ποσοστά θνησιμότητας που είναι παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν με τα στελέχη της γενεαλογίας 1 του WNV. Τέλος, έχει παρατηρηθεί προσβολή του ΚΝΣ από στελέχη της γενεαλογίας 2 του WNV τόσο σε άλογα όσο και σε ανθρώπους και στη Νότια Αφρική (Zaayman & Venter, 2012; Chancey et al., 2015).

5.4 Επιδημιολογία λοίμωξης από WNV σε Αφρική και Μέση Ανατολή

Ο ιός του Δυτικού Νείλου παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Αφρική, στον Δυτικό Νείλο στην περιοχή της Ουγκάντα, το 1937, ενώ παρήλθαν πάνω από 60

χρόνια προτού ο ιός διασχίσει τον Ατλαντικό. Αν και απομονώθηκε για πρώτη φορά από ένα εμπύρετο ανθρώπινο κρούσμα, ο WNV παρατηρήθηκε ότι προκαλεί σχετικά ήπια νόσο σε ανθρώπους και τουλάχιστον στις πρώιμες επιδημίες που μελετήθηκαν, δεν είχαν παρατηρηθεί θάνατοι. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να γίνει μια σημαντική παρατήρηση. Αν και η εισαγωγή και εξάπλωση του WNV στον τότε Νέο Κόσμο θα μπορούσε να μελετηθεί όπως συνέβη, πιστεύεται ότι οι επιδημίες του WNV εμφανίστηκαν αρχικά πέρα από την Αφρική, στην Μέση Ανατολή και τη Νότια Ασία, ανεξάρτητα από την καταγραφή των κρουσμάτων στις περιοχές αυτές. Μάλιστα με μια έρευνα που διενεργήθηκε κατά τα έτη 1939-1940, διαπιστώθηκε ότι η ανθρώπινη οροθετικότητα για τον WNV, στην Ουγκάντα του Σουδάν, στο Κονγκό και στην Κένυα, άγγιζε το 50% σε ορισμένες τοποθεσίες. Διαπιστώθηκε επίσης οροθετικότητα στη Δυτική Νιγηρία, σε δείγματα που συλλέχθηκαν το 1951 και το 1955. Μάλιστα, το 1954 εντοπίστηκαν θετικά στον ιό δείγματα από ανθρώπους που δεν είχαν ταξιδέψει, πιθήκους, κατοικίδια ζώα και νεαρά πτηνά (Kokernot et al., 1956). Μετά την πρώτη απομόνωση του ιού το 1937, ο WNV απομονώθηκε και πάλι το 1950. Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια μιας ορολογικής έρευνας που διεξήχθη σε 251 άτομα, κυρίως παιδιά που διαβιούσαν στο Κάιρο, ο ιός εντοπίστηκε στον ορό τριών παιδιών, αν και μόνο το ένα εξ αυτών είχε διαγνωστεί με WNV και είχε πυρετό. Η ίδια έρευνα έδειξε ότι περισσότερο από το 70% των συμμετεχόντων στην μελέτη ηλικίας 4 ετών και άνω, διέθετε αντισώματα κατά του WNV και ότι πάνω από το 50% των βρεφών έφερε μητρικά αντισώματα κατά του WNV, υποδεικνύοντας έτσι ότι η μόλυνση με WNV ήταν ευρέως διαδεδομένη στον πληθυσμό και ότι τα περισσότερα άτομα είχαν μολυνθεί σε νεαρή ηλικία (Taylor et al., 1953). Μία άλλη έρευνα που διεξήχθη στη βορειοανατολική Αίγυπτο απέδειξε την οροθετικότητα ενηλίκων και παιδιών σε ποικίλες τοποθεσίες στην κοιλάδα του Νείλου, εξαιρουμένης μόνο μιας παράκτιας τοποθεσίας, υποδεικνύοντας έτσι ότι ο WNV δεν ήταν αποκλειστικά ενδημικός στην Αίγυπτο (Smithburn et al., 1954). Ο WNV απομονώθηκε επίσης από κουνούπια *Culex spp.* στην Αίγυπτο, το 1952 (Taylor et al., 1953).

Η πρώτη γνωστή απομόνωση του ιού του Δυτικού Νείλου στο Ισραήλ ήταν από ένα εμπύρετο παιδί το 1951, στο πλαίσιο μιας επιδημίας που συνέβη σε έναν αγροτικό οικισμό κοντά στη Χάιφα. Μάλιστα, η νοσηρότητα στα παιδιά σε αυτή την επιδημία ήταν ουσιαστικά υψηλότερη από ό,τι στους ενήλικες, με τα επακόλουθα κρούσματα στο Ισραήλ κατά τα έτη 1952 και 1953 να εμφανίζονται κυρίως σε εφήβους και

ενήλικες (Bernkopf, Levine, & Nerson, 1953; Goldblum, Sterk, & Paderski, 1954). Τότε απομονώθηκε και πάλι ο WNV, τόσο από ανθρώπινα κρούσματα όσο και από οικόσιτα πτηνά. Ωστόσο, ο WNV πιστεύεται ότι ήταν παρόν στο Ισραήλ πριν από αυτές τις απομονώσεις, γιατί είχαν παρατηρηθεί παρόμοια κλινικά περιστατικά με εκείνα των επιδημιών μεταξύ 1942 και 1950. Οι ασθένειες σε αυτές τις περιπτώσεις ήταν γενικά αυτοπεριοριζόμενες με βραδύτερη ανάρρωση στους ενήλικες από ότι στα παιδιά (Weinberger et al., 2001). Οι πρώτοι θάνατοι λόγω της προσβολής του ΚΝΣ από τον WNV σημειώθηκαν σε μια ομάδα ηλικιωμένων ασθενών το 1957. Ωστόσο, γενικά, η νευρολογική προσβολή από τον WNV θεωρούνταν ιδιαίτερα ασυνήθιστη. Το 2000, αναφέρθηκε η πρώτη επιδημία WNV στο Ισραήλ μετά το 1980, με 417 ορολογικά επιβεβαιωμένα κρούσματα και 35 θανάτους. Όπως μάλιστα διαπιστώθηκε από ικές απομονώσεις, η επιδημία αυτή σχετιζόταν πιο στενά φυλογενετικά με απομονώσεις από τα κρούσματα των επιδημιών που έλαβαν χώρα το 1996 στη Ρουμανία και το 1999 στη Ρωσία. Από τότε, στο Ισραήλ σημειώνονται τακτικά ετήσια κρούσματα κατά τους θερινούς μήνες, διαφορετικής κάθε φορά έκτασης, όπως συμβαίνει και στην Αμερική (Anis et al., 2014).

Η ορολογική επιβεβαίωση του WNV στην Τουρκία έγινε για 1^η φορά τη δεκαετία του 1970, ενώ επαναλήφθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 2000. Μία επιδημία WNV εμφανίστηκε στην Τουρκία το 2010-11 ταυτόχρονα με άλλα κρούσματα στην περιοχή της Μεσογείου, προκαλώντας 47 κρούσματα, συμπεριλαμβανομένων 40 περιπτώσεων WNNND και 10 θανάτων (Kalaycioglu et al., 2012). Οροθετικότητα για τον WNV αναφέρθηκε επίσης στο Ιράν τη δεκαετία του 1970. Επίσης το 2008-2009 διεξήχθη μια έρευνα σε ασθενείς με πυρετό και απώλεια συνείδησης. Τότε λοιπόν εντοπίστηκαν 9 θετικές στον ιό περιπτώσεις μέσω διενέργειας διαφόρων ανοσολογικών μεθόδων, ενώ ταυτόχρονα έγιναν και μοριακές μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της RT-PCR. Μια μελέτη που διεξήχθη σε ίππους τα έτη 2008-2009 εντόπισε IgM-θετικά ζώα, ενώ ο επιπολασμός του WNV έφτανε έως και το 88% σε ορισμένες περιοχές, με την υψηλότερη ιική δραστηριότητα να εντοπίζεται στις δυτικές και νότιες επαρχίες του Ιράν (Ahmadnejad et al., 2011; Chinikar et al., 2012). Ορολογική επιβεβαίωση του ιού έχει επίσης πραγματοποιηθεί στην Ιορδανία και τον Λίβανο, αν και δεν έχουν αναφερθεί ανθρώπινα κρούσματα στις χώρες αυτές. Ο WNV συνέχισε να κυκλοφορεί εντός των ορίων της βόρειας και υποσαχάριας Αφρικής στα τέλη του 20^{ου} και στις αρχές του 21^{ου} αιώνα, προκαλώντας

την δημιουργία εστιών στην Αλγερία, στο Μαρόκο, στην Τυνησία, στην Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό και στη Νότια Αφρική, ενώ αναφέρθηκαν σποραδικά κρούσματα και οροθετικότητα σε ανθρώπους ή/και άλογα σε όλη την ήπειρο. Η ενεργή μετάδοση του ιού συνεχίστηκε στη Βόρεια Αφρική, με την εκδήλωση επιδημιών στο Μαρόκο το 2010 και στην Τυνησία το 2012 καθώς και συνεχιζόμενες σποραδικές μεταδόσεις στην Αίγυπτο και στην Αλγερία (Sghaier et al., 2012).

Το παρατηρούμενο μοτίβο των λοιμώξεων στη Νότια Αφρική πριν από το 1974 ήταν σποραδικό, με σχετικά ήπιες ανθρώπινες λοιμώξεις και επιζωοτίες, ενώ επιδημίες σε ανθρώπους σημειώθηκαν το 1974 και το 1984 (Jupp, 2001). Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι τα χαμηλά επίπεδα επιπολασμού των επαγόμενων από WNV λοιμώξεων που είχαν παρατηρηθεί μέχρι τότε στη Νότια Αφρική είχαν αποδοθεί στην μειωμένη λοιμογονικότητα των στελεχών της γενεαλογίας 2 του WNV. Ωστόσο, βάσει μεταγενέστερων αναφορών για την WNND που προκαλείται από λοιμώξεις στελεχών της γενεαλογίας 2 του WNV στη Νότια Αφρική προτάθηκε ότι ίσως είχε υποτιμηθεί η πλήρης κλινική έκταση της λοίμωξης με WNV, (Burt et al., 2002). Το 2010, καταγράφηκε η πρώτη περίπτωση θανάτου αλόγου που εγκυμονούσε από στέλεχος της γενεαλογίας 1 του ιού στη Νότια Αφρική. Το 2011 καταγράφηκε στην Μαδαγασκάρη ένας θάνατος από WNND, αν και οι λοιμώξεις που προκαλούνται από στελέχη της γενεαλογίας 2 στη Μαδαγασκάρη χαρακτηρίζονται γενικά ως ήπιες (Larrieu et al., 2013).

Το 2006, αναφέρθηκαν στη Γουινέα 11 περιπτώσεις οξείας πυρετικής νόσου, η οποία προκλήθηκε από τον WNV (Jentes et al., 2010). Μια μελέτη επιπολασμού που έλαβε χώρα το 2009 στην Γκάνα έδειξε ότι ο WNV είναι ενδημικός, με τα περισσότερα κρούσματα να εμφανίζονται στην παιδική ηλικία (Wang, Sarkodie et al., 2009). Επίσης, το 2009 καταγράφηκε ένας μόνο θάνατος λόγω WNND στη Γκαμπόν. Μια μελέτη στη Νιγηρία έδειξε ότι το 25% των εμπύρετων ασθενών, πολλοί από τους οποίους είχαν μολυνθεί από *Plasmodium falciparum* ή *Salmonella typhi*, ήταν οροθετικό και για WNV, υποδηλώνοντας έτσι ότι η λοίμωξη από WNV σε αυτήν την περιοχή μπορεί να ακολουθήσει μια λανθασμένη διάγνωση ή να επισκιαστεί από συνκυκλοφορούντες ιούς (Baba et al., 2013). Στη Σενεγάλη, το 2009 παρατηρήθηκε οροθετικότητα του ιού σε οικόσιτα πτηνά. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι στην ανατολική Αφρική, και ειδικότερα στο Τζιμπουτί, καταγράφηκαν λοιμώξεις από στελέχη της γενεαλογίας 2 του WNV κατά τα έτη 2010-2011 (Faulde et al., 2012).

Στην Κένυα διαπιστώθηκε οροθετικότητα έναντι του ιού σε τσιμπούρια κατά τα έτη 2010–2012 καθώς και σε κουνούπια κατά τα έτη 2007–2011 (Ochieng et al., 2013; Chancey et al., 2015). Τέλος, μελέτες υποστηρίζουν ότι η μετάδοση του ιού βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη σε ποικίλες περιοχές της υποσαχάριας Αφρικής (Chancey et al., 2015).

5.5 Επιδημιολογία λοίμωξης από WNV σε Ανατολική και Νότια Ασία, Αυστραλία και Ωκεανία

Κατά τις αρχές της δεκαετίας του 1950 και του 1960, καταγράφηκαν αρκετά κρούσματα λοίμωξης από WNV σε όλη την Ινδία και ανατολικά μέχρι τη Μιανμάρ (Rao, 1971). Σποραδικές περιπτώσεις λοίμωξης από τον WNV καταγράφηκαν στην Ινδία σε όλο το χρονικό διάστημα από το 1970 μέχρι και το 2000. Οι περισσότερες ιικές απομονώσεις στην Ινδία αφορούσαν πρωταρχικά τη γενεαλογία 5 (ή 1C), και δευτερευόντως την γενεαλογία 1A. Αν και είχε αποδειχθεί προγενέστερα ότι ο WNV προκαλεί νευρολογική νόσο, οι πρώτοι παιδικοί θάνατοι από WNNND αναφέρθηκαν στην Ινδία το 1981, όπου τρία παιδιά πέθαναν από εγκεφαλίτιδα λόγω λοίμωξης επαγόμενης από WNV. Μάλιστα έκτοτε έχουν αναφερθεί αρκετές παιδιατρικές περιπτώσεις WNNND σε κρούσματα από την Ινδία, σε αντίθεση με τη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη, στις οποίες οι παιδιατρικές περιπτώσεις είναι σχετικά σπάνιες (Khan, Dutta, Khan, et al., 2011). Οι μεταγενέστερες αναφορές για τον WNV στην Ινδία περιλαμβάνουν συνκυκλοφορία των γενεαλογιών WNV 1A και 5 και πιθανώς συνλοίμωξη με JEV. Μάλιστα, το 2006 σε πολλές περιοχές της βορειοανατολικής Ινδίας συνκυκλοφορούσε τόσο ο WNV όσο και ο JEV (Khan, Dutta, Chowdhury, et al., 2011). Παρατηρήθηκε επιδημία του 2010 στην πολιτεία Ταμίλ Ναντού η οποία προκλήθηκε από στέλεχος της γενεαλογίας 1 του WNV, το οποίο συνδέθηκε με την πρόκληση οφθαλμικής νόσου, μιας σπάνια αναφερόμενης επιπλοκής της λοίμωξης από τον WNV (Shukla et al., 2012).

Αξίζει να υπογραμμιστεί ότι στην Βορειοανατολική Ινδία τα στελέχη της γενεαλογίας 5 του WNV που απομονώθηκαν ήταν πιο επιθετικά και παθογόνα στους επίμυες εν συγκρίσει με ινδικές ιικές απομονώσεις από το 1982 και νωρίτερα. Περιπτώσεις WNNND έχουν επίσης αναφερθεί στο Πακιστάν, ενώ ο επιπολασμός των λοιμώξεων

από τον WNV κυμαίνεται από 12 έως 54% (Darwish et al., 1983). Απομονώσεις του WNV έχουν γίνει επίσης στην Μαλαισία και στην Καμπότζη, ενώ έχει παρατηρηθεί οροθετικότητα έναντι του WNV στην Μιανμάρ, στην Ταϊλάνδη και στις Φιλιππίνες. Το 2004 στην Ινδονησία απομονώθηκε και μελετήθηκε στέλεχος της γενεαλογίας 2 του WNV. Το 2009-2010 ο WNV απομονώθηκε από κλινικά δείγματα στο Νεπάλ, ενώ φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν ομοιότητα μεταξύ των στελεχών του Νεπάλ με τους ιούς της γενεαλογίας 1, αν και μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα ότι είχαν λάβει χώρα γεγονότα γενετικού ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα του εν λόγω στελέχους, διότι ένα τμήμα του εμφάνιζε μεγαλύτερη ομοιότητα με τη γενεαλογική γραμμή 2 παρά με την 1 (Chancey et al., 2015).

Στην Κίνα, η οροθετικότητα για τον WNV αναφέρθηκε για πρώτη φορά στα πτηνά της επαρχίας Γιουνάν το 1988. Αν και τα πρώτα επιβεβαιωμένα κρούσματα από τον WNV σε ανθρώπους στην Κίνα εμφανίστηκαν το 2013, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά το 2004 στην επαρχία Xinjiang, στα βορειοδυτικά της Κίνας, ξέσπασε μια επιδημία νευρολογικής νόσου με βασικό σύμπτωμα τον πυρετό. Τότε μάλλον συνυπήρχε ο WNV με τον ιό της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας. Όσον αφορά την Σαγκάη, το 2010 η οροθετικότητα για τον WNV υπολογίστηκε ότι ήταν 14,9% στις γάτες και 4,9% στους σκύλους, ενώ βρέθηκαν και θετικά στον ιό αιχμάλωτα πτηνά (Lan et al., 2011). Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί κρούσματα του ιού σε ανθρώπους της Νότιας ή της Ανατολικής Κίνας. Στη Νότια Κορέα, το 2009 διενεργήθηκε μια μελέτη σε πτηνά, εκ των οποίων διαπιστώθηκε ότι τα 5 από τα 1531 έφεραν αντισώματα κατά του WNV (Yeh, Park, & Ostlund, 2011).

Ο ιός Kunjin, ο οποίος αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι στενά συγγενικός ιός με τον WNV αλλά πλέον θεωρείται διακριτό υποείδος της γενεαλογίας 1 του WNV, απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Αυστραλία το 1960. Τα συμπτώματα του WNV/Kunjin στην Αυστραλία θεωρούνται σχετικά ήπια, με σπάνια προσβολή του ΚΝΣ, ενώ μάλιστα δεν έχουν αναφερθεί θάνατοι από το εν λόγω στέλεχος (Mackenzie et al., 1994). Το στέλεχος Kunjin συνέχισε έκτοτε να προκαλεί περιπτώσεις ασθενειών των ιπποειδών και των ανθρώπων στην Αυστραλία, κυρίως στα βορειοδυτικά, ενώ φαίνεται ότι ανταγωνίζεται για την επικράτηση με τον φλαβοϊό MVEV (Russell & Dwyer, 2000). Το 2011 έλαβε χώρα μια επιδημία WNV σε ίππους στη νοτιοανατολική Αυστραλία που αποδόθηκε σε ένα στέλεχος του WNV το οποίο ονομάστηκε WNVNSW2011. Το στέλεχος αυτό αν και σχετιζόταν στενά με

τον ιό Kunjin, έφερε δύο αμινοξικές μεταλλαγές οι οποίες είχαν προηγουμένως βρεθεί ότι σχετίζονταν με αυξημένη μολυσματικότητα σε στελέχη του WNV από Βόρεια Αμερική του WNV (WNV NY99). Αυτές οι μεταλλάξεις μάλιστα απέδωσαν στο στέλεχος WNVNSW2011 πιο νευροδιηθητικές ιδιότητες από ό,τι είχε παρατηρηθεί προηγουμένως σε στελέχη από Αυστραλία. Ωστόσο θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν αναφέρθηκαν κρούσματα σε ανθρώπους κατά την διάρκεια της επιδημίας αυτής (Prow, 2013; Williams et al., 2013).

5.6 Επιδημιολογία λοίμωξης από WNV στην Αμερική

Ο WNV εμφανίστηκε στο δυτικό ημισφαίριο των ΗΠΑ το καλοκαίρι του 1999, προκαλώντας τον θάνατο πολλών πτηνών και ίππων πριν ακόμη προσβάλλει τους ανθρώπους (Lanciotti et al., 1999). Αν και ο τρόπος εισαγωγής του ιού είναι ακόμα άγνωστος, το αρχικά απομονωμένο στέλεχος (NY99) φαίνεται ότι ήταν στενά συγγενικό με ένα ιικό στέλεχος που απομονώθηκε από μια χήνα το 1998 στο Ισραήλ και μετέπειτα εξαπλώθηκε ταχέως σε όλη τη χώρα μέχρι να αντικατασταθεί από το στέλεχος WN02, το 2002, το οποίο είναι ακόμη και τώρα το κυρίαρχο εκεί (Murray, Mertens, & Desprès, 2010). Σήμερα λοιπόν ο WNV αριθμεί έως και 2.330 θανάτους, με περισσότερες από 24.700 περιπτώσεις νευροδιηθητικής νόσου και 50.000 διαγνωσμένες ανθρώπινες λοιμώξεις. Οι σημαντικότερες επιδημίες του ιού στην Αμερική έλαβαν χώρα το 2002, το 2003 και το 2012, ενώ πλέον ο ιός είναι ενδημικός στην ήπειρο αυτή. Εντύπωση δε προκαλεί το γεγονός ότι μέχρι τον μαζικό εμβολιασμό των αλόγων, είχαν σημειωθεί περισσότερα από 25.000 κρούσματα (Saiz et al., 2021).

Εκτός των ΗΠΑ, η πρώτη ανθρώπινη λοίμωξη της ηπείρου επιβεβαιώθηκε στον Καναδά το 2002, ενώ το μέγιστο των 2.215 κρουσμάτων καταγράφηκε το 2007 (Murray, Walker, & Gould, 2011). Για το σκοπό αυτό ο Καναδάς διαθέτει προγράμματα επιτήρησης ανθρώπων, αλόγων, πτηνών και κουνουπιών σε όλη τη χώρα. Στο Μεξικό, ο ιός εντοπίστηκε σε άλογα το 2002, ενώ στους ανθρώπους το 2004. Μετά από αυτό, ο WNV εξαπλώθηκε στο Ελ Σαλβαδόρ, στο Μπελίζ, στη Γουατεμάλα, στην Κόστα Ρίκα και στη Νικαράγουα, όπου καταγράφηκε ένα μόνο ανθρώπινο κρούσμα το 2006. Η δραστηριότητα του WNV στην Καραϊβική

επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά στα νησιά Κέιμαν το 2001, ενώ έκτοτε έχει καταγραφεί σε πτηνά ή/και άλογα, καθώς και σε ανθρώπους, στη Δομινικανή Δημοκρατία, στη Τζαμάικα, στη Γουαδελούπη, στο Τρινιδάδ, στο Πουέρτο Ρίκο, στην Αϊτή και στην Κούβα (Komar & Clark, 2006).

Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι ο ιός εντοπίστηκε στη Νότια Αμερική και ειδικότερα σε ίππους στην Κολομβία το 2004, ενώ έκτοτε έχουν περιγραφεί σποραδικά περιστατικά σε πτηνά και άλογα στη Βενεζουέλα, στη Βραζιλία, στη Βολιβία και στην Αργεντινή, με τέσσερα περιστατικά ανθρώπινης εγκεφαλίτιδας (Kramer, Ciota, & Kilpatrick, 2019). Συνεπώς μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι ανθρώπινες περιπτώσεις λοίμωξης από WNV στη Νότια Αμερική είναι περιορισμένες χωρίς να εμφανίζουν σημαντικές εξάρσεις. Ταυτόχρονα παρατηρείται η διαμόρφωση μιας έντονης αντίθεσης όσον αφορά τον αντίκτυπο του WNV μεταξύ των χωρών που εντοπίζονται νότια και βόρεια στην Αμερική. Έχουν μάλιστα προταθεί αρκετές εξηγήσεις σε μια προσπάθεια ερμηνείας του φαινομένου, συμπεριλαμβανομένης της δημιουργίας λανθασμένων διαγνώσεων λόγω (i) της κυκλοφορίας των άλλων φλαβοϊών (διασταυρούμενες αντιδράσεις), (ii) της ανοσοπροστασίας από προηγούμενη έκθεση σε φλαβοϊούς, (iii) της μη αποτελεσματικής επιτήρησης της νόσου ή (iv) ακόμη και λόγω της κυκλοφορίας εξασθενημένων στελεχών (Beasley, Davis, Estrada-Franco et al., 2004; Elizondo-Quiroga & Elizondo-Quiroga, 2013).

5.7 Επιδημιολογία λοίμωξης από WNV στην Ευρώπη

Ο WNV ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στην Ευρώπη το 1958 στην Αλβανία, ενώ η πρώτη επιδημία του WNV εμφανίστηκε στη Νότια Γαλλία το 1962-1963, προκαλώντας WNND τόσο σε ανθρώπους όσο και σε άλογα (Bardos et al., 1959; Hubálek & Halouzka, 1999). Έπειτα από την επιδημία αυτή δεν αναφέρθηκαν άλλα κρούσματα WNND σε ανθρώπους μέχρι και το 1985. Ο ιός απομονώθηκε από κουνούπια στην Πορτογαλία και την Τσεχική Δημοκρατία, από αποδημητικά πτηνά στη Σλοβακία και στη Δυτική Ουκρανία καθώς και από κρότωνες στην Ουγγαρία και την Μολδαβία. Ο WNV ανιχνεύθηκε επίσης σποραδικά σε αποδημητικά πτηνά και οικόσιτα ζώα σε όλες τις χώρες της Νότιας και Ανατολικής Ευρώπης καθώς και της λεκάνης της Μεσογείου, αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι ο ιός δεν αποτελεί κίνδυνο για

τη δημόσια υγεία λόγω της απουσίας αναφερόμενων περιπτώσεων WNN (Hubálek & Halouzka, 1999; Couissinier-Paris, 2006). Ωστόσο, η κατάσταση έχει αλλάξει δραματικά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες με την εμφάνιση μιας σειράς από επιδημίες WNV σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες. Ανθρώπινες περιπτώσεις WNN παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στη Δυτική Ουκρανία το 1985, ενώ ακολούθησαν δύο μεγάλες επιδημίες. Η μία έλαβε χώρα στη Ρουμανία το 1996 και η άλλη στη Ρωσία το 1999. Κατά τη διάρκεια της επιδημίας στη Ρουμανία, νοσηλεύτηκαν 835 ασθενείς με νευρολογικά συμπτώματα, ενώ 343 κρούσματα επιβεβαιώθηκαν ότι είναι θετικά κατά του WNV. Η επιδημία προκάλεσε συνολικά 17 θανάτους. Μάλιστα, το ποσοστό θνησιμότητας ήταν ακόμη υψηλότερο στη Ρωσία διότι από τους 826 ασθενείς που διέθεταν συμπτώματα, οι 40 πέθαναν από οξεία άσηπτη μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (Platonov et al., 2001).

Τα έτη 2000–2003 έλαβε χώρα επιδημία του WNV στη Γαλλία, τα έτη 2008-2009 στην Ιταλία και το 2008 στην Ουγγαρία. Ειδικότερα, όσον αφορά την περίπτωση της Γαλλίας, τα κρούσματα WNN το 2000 επιβεβαιώθηκαν σε 76 ίππους εκ των οποίων οι 21 απεβίωσαν. Μάλιστα ενδιαφέρον προξενεί το γεγονός ότι η πληγείσα περιοχή της χώρας επηρεάστηκε ακριβώς όπως είχε επηρεαστεί και στην επιδημία του 1962. Οι περιπτώσεις WNN που περιγράφηκαν το 2003 αφορούσαν άλογα και ανθρώπους, ενώ σύμφωνα με μια μεταγενέστερη ορολογική μελέτη που διενεργήθηκε σε άλογα ενδέχεται το συγκεκριμένο στέλεχος να απέκτησε αντοχή προκαλώντας σε επόμενα έτη επίμονες στην περιοχή λοιμώξεις (Durand et al., 2005).

Πριν από την επιδημία του 2008 είχαν προηγηθεί το 1998 στην Ιταλία 14 περιστατικά νευρολογικής προσβολής ιπποειδών και 4 ασυμπτωματικά ανθρώπινα περιστατικά. Τότε μάλιστα ο επιπολασμός του WNV στα άλογα ήταν 38% (Rezza et al., 2007). Τα έτη 2008-2009 αναφέρθηκαν περιπτώσεις WNN τόσο ιπποειδών όσο και ανθρώπων. Στην Ουγγαρία, η ξαφνική εξάπλωση του ιού το 2008 προκάλεσε την εκδήλωση νευροδιηθητικής λοίμωξης σε 12 ιπποειδή και 22 ανθρώπους. Έπειτα από την μεγάλη επιδημία WNV που σημειώθηκε το 1999, η Ρωσία παρουσίασε ετήσιες καλοκαιρινές μεταδόσεις που εντοπιζόνταν κυρίως στα νότια της χώρας. Οι τρεις περιοχές που επλήγησαν περισσότερο ήταν το Αστραχάν και οι επαρχίες Ροστόφ και Βόλγκογκραντ, εμφανίζοντας κρούσματα το 2007, το 2010 και 2012, αν και πρόσφατα το εύρος του ιού διευρύνθηκε καθώς αναφέρθηκαν περιπτώσεις

βορειότερα και ανατολικότερα σε αρκετές επαρχίες της Σιβηρίας (Chancey et al., 2015).

Με τα κρούσματα να γίνονται ολοένα και πιο συχνά, ασκήθηκε πίεση στην Ευρώπη, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν κάποια προγράμματα επιτήρησης των λοιμώξεων που επάγονται από τον WNV σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες. Χάρη λοιπόν στα προγράμματα επιτήρησης κατέστη εφικτός ο εντοπισμός κρουσμάτων WNV κατά τη διάρκεια της μεγαλύτερης καταγεγραμμένης επιδημίας που έγινε στην Ιταλία το 2012, όπου υπήρχε ταυτόχρονη κυκλοφορία στελεχών του WNV τόσο της γενεαλογίας 1 όσο και της 2 (Sambri et al., 2013). Κατά τα έτη 2010–2013, αναφέρθηκαν ανθρώπινα κρούσματα λοίμωξης από WNV στην Αυστρία, στην Βοσνία-Ερζεγοβίνη, στην Κροατία, στην Ελλάδα, στην Ουγγαρία, στην Ιταλία, στο Κόσοβο, στην Πρώην Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της Μακεδονίας, στο Μαυροβούνιο, στη Ρωσική Ομοσπονδία, στη Σερβία, στην Ισπανία και στην Ουκρανία. Μάλιστα η Ελλάδα εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά λοιμώξεων από WNV σε ετήσια βάση (Para et al., 2011). Τέλος ο επιπολασμός του ιού στη Γερμανία και στην Πολωνία έχει εκτιμηθεί ότι είναι σχετικά χαμηλός (Linke et., 2007; Hubálek et al., 2008).

5.8 Νεότερα δεδομένα επιδημιολογικής επιτήρησης λοιμώξεων WNV στην ΕΕ

Για το 2019, έντεκα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) παρουσίασαν 443 λοιμώξεις από WNV, 425 (96%) από τις οποίες είχαν αποκτηθεί μέσω εγχώριας μετάδοσης (Πίνακας 4) (ECDC, 2021). Οι περισσότερες από τις λοιμώξεις αναφέρθηκαν στην Ελλάδα και στην Ιταλία, αντιπροσωπεύοντας το 65% και 13% των κρουσμάτων της ΕΕ αντίστοιχα. Ακόμη θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά το 2018 είχε σημειωθεί μια απότομη αύξηση στις λοιμώξεις από WNV που είχαν αναφερθεί στην ΕΕ, η οποία ξεπέρασε κατά πολύ τον συνολικό αριθμό των προηγούμενων τεσσάρων ετών. Το 2019, οι αναφερόμενες λοιμώξεις από WNV μειώθηκαν ξανά στις περισσότερες χώρες, εκτός από την Ελλάδα όπου ο αριθμός παρέμεινε σε υψηλό επίπεδο. Επιπλέον για το 2019, η Κύπρος ανέφερε 23 λοιμώξεις από WNV, αφού προηγουμένως είχε αναφέρει μόνο μία μόλυνση από WNV για το 2016 και 2018, αντίστοιχα (Young et al., 2021).

Κατά τη διάρκεια του 2019, η Σλοβακία και η Γερμανία ανέφεραν τις πρώτες λοιμώξεις από WNV που μεταδόθηκαν από κουνούπια. Επιπρόσθετα, αναφέρθηκαν 52 θάνατοι από λοιμώξεις από WNV στην Ελλάδα, στη Ρουμανία, στην Ιταλία, στην Ουγγαρία, στην Κύπρο και στη Βουλγαρία, την ίδια περίοδο. Μάλιστα, το ποσοστό θνησιμότητας για τον WNV εκτιμήθηκε ότι ήταν 12%. Άξιο αναφοράς είναι δε το γεγονός ότι όλα τα κράτη μέλη της ΕΕ, εκτός από τη Γερμανία και την Ιταλία, παρείχαν στοιχεία για την κατάσταση νοσηλείας των ασθενών. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι από τις 364 περιπτώσεις λοιμώξεων από WNV, το 94% χρειάστηκε νοσηλεία. Όσον αφορά την κλινική συμπτωματολογία των νοσηλευόμενων ασθενών και την μορφή της λοίμωξης, το 67% εμφάνισε νευροδιηθητική λοίμωξη, το 31% αφορούσε περιπτώσεις με μη νευρολογικά συμπτώματα και το 2% ήταν ασυμπτωματικοί αιμοδοτές. Οι μοναδικές χώρες της ΕΕ στις οποίες αναφέρθηκαν λοιμώξεις μεταξύ των αιμοδοτών για το 2019, ήταν η Ιταλία και η Ρουμανία (Young et al., 2019). Επιπλέον, το ίδιο χρονικό διάστημα καταγράφηκαν 18 κρούσματα σχετιζόμενα με ταξίδια. Από αυτά τα 18 κρούσματα, οι 10 περιπτώσεις σχετίζονταν με ταξίδια εντός της ΕΕ, 5 σχετίζονταν με ταξίδια εκτός της ΕΕ (Τζιμπουτί, Σερβία, Τυνησία, Τουρκία και Ηνωμένες Πολιτείες), ενώ για 3 κρούσματα, ο τύπος μόλυνσης παρέμεινε άγνωστος. Στην εικόνα 27 απεικονίζεται η κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης στην ΕΕ για τα έτη 2015–2019. Εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση για τα 2015–2019 αναφορικά με τις επαγόμενες από τον WNV λοιμώξεις στην ΕΕ επί του συνόλου. Ωστόσο σε εγχώριο επίπεδο, η Ελλάδα παρουσίασε σημαντική αυξητική τάση κατά τα έτη 2015–2019 (ECDC, 2021).

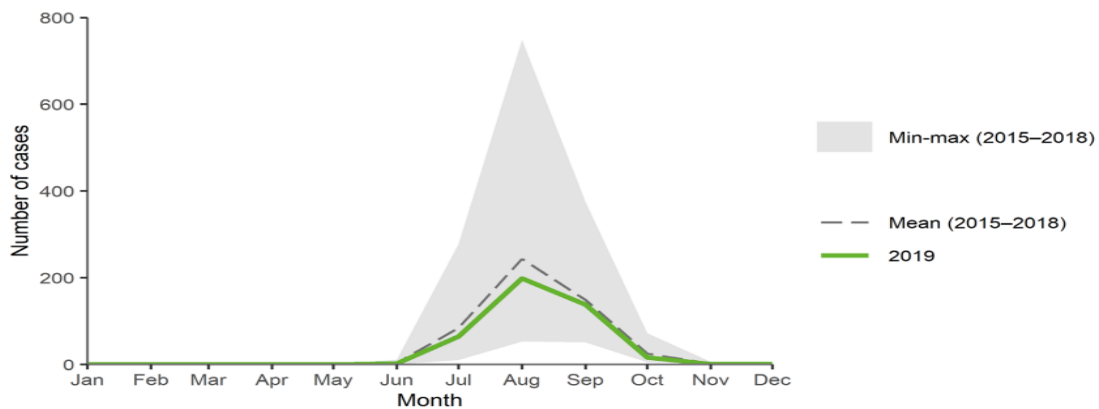
Country	2015		2016		2017		2018		2019		
	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	ASR
Austria	6	0.1	5	0.1	6	0.1	21	0.2	4	0.0	0.0
Belgium	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Bulgaria	2	0.0	2	0.0	1	0.0	15	0.2	5	0.1	0.1
Croatia	1	0.0	2	0.0	5	0.1	58	1.4	0	0.0	0.0
Cyprus	0	0.0	1	0.1	0	0.0	1	0.1	23	2.6	2.7
Czechia	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	0.0	1	0.0	0.0
Denmark
Estonia	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Finland	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
France	1	0.0	0	0.0	2	0.0	27	0.0	2	0.0	0.0
Germany	-	-	-	-	-	-	1	0.0	5	0.0	0.0
Greece	0	0.0	0	0.0	48	0.4	315	2.9	227	2.1	1.8
Hungary	18	0.2	44	0.4	20	0.2	215	2.2	36	0.4	0.3
Iceland	-	-	-	-	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Ireland	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Italy	61	0.1	76	0.1	53	0.1	610	1.0	54	0.1	0.1
Latvia	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Liechtenstein
Lithuania	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Luxembourg	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Malta	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Netherlands	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Norway	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Poland	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Portugal	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0
Romania	32	0.2	93	0.5	66	0.3	277	1.4	67	0.3	0.3
Slovakia	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.0	0.0

Πίνακας 4: Κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης ανά ευρωπαϊκή χώρα και έτος, για τα έτη 2015–2019.



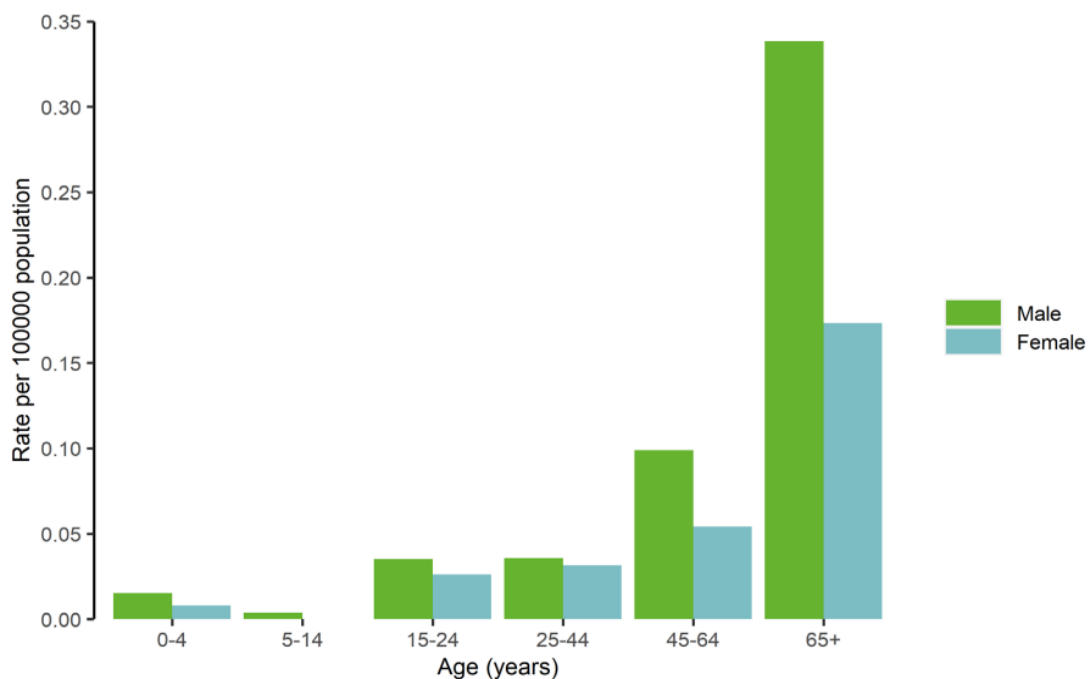
Εικόνα 27: Κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης στην ΕΕ για τα έτη 2015–2019.

Οι λοιμώξεις από WNV παρουσιάζουν ένα έντονο εποχιακό μοτίβο, με τα πρώτα κρούσματα να αναφέρονται συνήθως τον Ιούνιο και η πλειονότητα των κρουσμάτων να καταγράφεται από τον Ιούλιο έως και τον Οκτώβριο. Μάλιστα η κορύφωση των λοιμώξεων για το 2019 καταγράφηκε τον Αύγουστο, κάτι που συνάδει και με τα προηγούμενα έτη (Γράφημα 1) (Angelou, Kioutsioukis, & Stilianakis, 2021; ECDC, 2021).



Γράφημα 1: Κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης στην ΕΕ ανά μήνα, για τα έτη 2015–2018 και 2019.

Ακόμη αξίζει να αναφερθεί ότι το 2019, το συνολικό ποσοστό των λοιμώξεων από τον WNV ήταν υψηλότερο μεταξύ των ανδρών παρά των γυναικών (0,10 περιπτώσεις και 0,06 περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού, αντίστοιχα) και η συνολική αναλογία ανδρών προς γυναίκες ήταν 1,8:1. Επίσης βρέθηκε τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες ότι τα κρούσματα ακολουθούσαν μια αυξητική τάση αυξανομένης της ηλικίας, με εξαίρεση την ηλικιακή ομάδα 5-14 ετών, ενώ το αριθμητικό μέγιστο των λοιμώξεων αφορούσε άτομα άνω των 64 ετών. Στο γράφημα 2 απεικονίζεται η κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης στην ΕΕ ανά 100.000 πληθυσμού, βάσει ηλικίας και φύλου (ECDC, 2021).

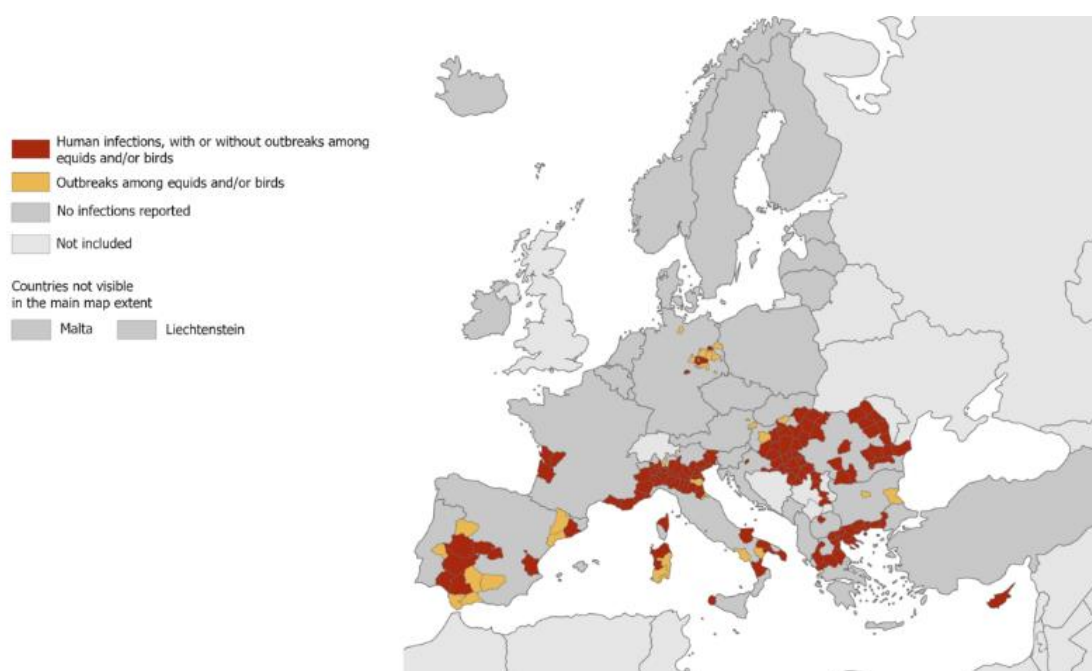


Γράφημα 2: Κατανομή των περιπτώσεων λοίμωξης από WNV λόγω εγχώριας μετάδοσης στην ΕΕ ανά 100.000 πληθυσμού, βάσει ηλικίας και φύλου.

Συγκρίνοντας λοιπόν τα επιδημιολογικά δεδομένα για τα έτη 2018 και 2019, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι αν και αριθμητικά τα κρούσματα ήταν περισσότερα κατά το 2018, το ποσοστό των νευροδιηθητικών λοιμώξεων του 2019 ήταν ελαφρώς υψηλότερο συγκριτικά με εκείνο του 2018 (64%), ενώ το ποσοστό θνητότητας του 2019 ήταν επίσης ελαφρώς υψηλότερο από εκείνο του 2018 (12% έναντι 11%) (ECDC, 2021; Young et al., 2021).

Σύμφωνα με νεότερα επιδημιολογικά δεδομένα από την αρχή της περιόδου μετάδοσης του WNV κατά το έτος 2023 έως και τις 11 Οκτωβρίου 2023, οι χώρες της ΕΕ έχουν αναφέρει 632 ανθρώπινα κρούσματα από τον WNV. Μάλιστα τα 307 εξ αυτών εντοπίστηκαν στην Ιταλία, 157 στην Ελλάδα, 81 στην Ρουμανία, 33 στη Γαλλία, 29 στην Ουγγαρία, 14 στην Ισπανία, 6 στην Κροατία, 4 στην Γερμανία και 1 στην Κύπρο. Στο ίδιο χρονικό πλαίσιο οι χώρες της ΕΕ έχουν αναφέρει 50 θανάτους συνολικά, εκ των οποίων οι 20 εντοπίστηκαν στην Ελλάδα, οι 18 στην Ιταλία, οι 10 στην Ρουμανία και οι 2 στην Ισπανία. Οι γειτονικές χώρες της ΕΕ έχουν αναφέρει 88 ανθρώπινα κρούσματα WNV, εκ των οποίων τα 87 ήταν στη Σερβία και 1 στη Βόρεια Μακεδονία, ενώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν αναφέρθηκαν θάνατοι που να σχετίζονται με μολύνσεις από WNV από τις γειτονικές χώρες της ΕΕ (ECDC, 2023).

Ακόμη από την αρχή της περιόδου μετάδοσης του WNV κατά το 2023, έχουν αναφερθεί 93 εστίες μεταξύ ιπποειδών και 209 εστίες μεταξύ πτηνών από τις χώρες της ΕΕ. Επιδημίες μεταξύ ιπποειδών έχουν αναφερθεί στην Ισπανία (32), στην Ουγγαρία (25), στην Ιταλία (17), στη Γαλλία (10), στη Γερμανία (7), στην Αυστρία (1) και στην Πορτογαλία (1). Επιδημίες μεταξύ πτηνών έχουν αναφερθεί στην Ιταλία (161), στη Γερμανία (18), στην Ισπανία (17), στη Βουλγαρία (6), στην Ουγγαρία (3), στη Γαλλία (2), στην Αυστρία (1) και στην Ελλάδα (1). Συνολικά, η κατανομή των ανθρώπινων και ζωικών κρουσμάτων από WNV που έχουν καταγραφεί κατά το 2023 στην ΕΕ και τις γειτονικές χώρες, απεικονίζεται στην εικόνα 28 (ECDC, 2023).



Εικόνα 28: Κατανομή των ανθρώπινων και ζωικών κρουσμάτων από WNV που έχουν καταγραφεί κατά το 2023 στην ΕΕ και τις γειτονικές χώρες.

Ειδικά όσον αφορά την περίπτωση της Ελλάδας για τα έτη 2010-2022, φαίνονται στον πίνακα 5 αναλυτικά ανά έτη τα επιδημιολογικά δεδομένα, όπου καταγράφεται ο αριθμός των δηλωθέντων κρουσμάτων με λοίμωξη από τον WNV, ο αριθμός των θανάτων (% θνητότητα) σε ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό (στο σύνολο των κρουσμάτων και στα κρούσματα με προσβολή του ΚΝΣ) καθώς και η επίπτωση της νόσου με προσβολή του ΚΝΣ στην Ελλάδα (ΕΟΔΥ, 2023a, 2023b). Από την μελέτη των δεδομένων του πίνακα 5 καθίσταται σαφές ότι το 2022 παρατηρήθηκε έξαρση των κρουσμάτων με λοίμωξη από τον WNV στην Ελλάδα, με αυξημένο ταυτόχρονα αριθμό κρουσμάτων με προσβολή του ΚΝΣ καθώς και αυξημένο αριθμό θανάτων (τόσο με προσβολή του ΚΝΣ όσο και συνολικά). Μια πιθανή εξήγηση της

παρατηρούμενης έξαρσης θα μπορούσε να έγκειται στην κλιματική αλλαγή καθώς έχει διαπιστωθεί ότι οι υψηλότερες θερμοκρασίες είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση στην μετάδοση του ιού στους ανθρώπους. Η υψηλότερη υγρασία, οι ισχυρότερες βροχοπτώσεις και η αυξημένη βροχόπτωση συνδέονται επίσης με υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης από τον ιό του Δυτικού Νείλου, σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη (Watts et al., 2021).

Μεταβλητή	Έτος													Σύνολο 2010-2022
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	
Σύνολο κρουσμάτων	262	100	161	86	15	0	0	48	317	227	145	59	286	1.706
Κρούσματα ME προσβολή ΚΝΣ (%)	197 (75%)	75 (75%)	109 (68%)	51 (59%)	14 (93%)	0	0	28 (58%)	243 (77%)	140 (62%)	116 (80%)	38 (64%)	184 (64%)	1.195 (70%)
Επίπτωση νόσου με προσβολή ΚΝΣ (ανά 100.000 πληθ)	1,8	0,7	1,0	0,5	0,1	0	0	0,3	2,2	1,3	1,1	0,4	1,7	0,9*
Αριθμός (%) θανάτων	35 (13%)	9 (9%)	18 (11%)	11 (13%)	6 (40%)	0	0	5 (10%)	51 (16%)	35 (15%)	23 (16%)	8 (14%)	33 (12%)	234 (14%)
Αριθμός (%) θανάτων ασθενών με προσβολή ΚΝΣ	33 (17%)	9 (12%)	18 (17%)	10 (20%)	6 (43%)	0	0	5 (18%)	48 (20%)	33 (24%)	23 (20%)	7 (18%)	33 (18%)	225 (19%)

* Μέση ετήσια επίπτωση ετών 2010-2022

** Καταγράφονται οι θάνατοι ασθενών με λοίμωξη από ιό ΔΝ, κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους.

Πίνακας 5: Επιδημιολογικά δεδομένα Ελλάδα για τα έτη 2010-2022.

Επιπρόσθετα στον πίνακα 6, παρουσιάζεται ο αριθμός και το ποσοστό των κρουσμάτων με λοίμωξη από τον ιό του WNV με προσβολή του ΚΝΣ ανά ηλικιακή ομάδα, στην Ελλάδα, για τα έτη 2010-2022. Από τα δεδομένα του εν λόγω πίνακα προκύπτει ότι ο μεγαλύτερος αριθμός κρουσμάτων εμπίπτει στην ηλικιακή κατηγορία των 70-79 ετών, ενώ ακολουθείται από την ηλικιακή ομάδα των 80 ετών και άνω. Η αμέσως επόμενη ηλικιακή κατηγορία που εμφανίζει υψηλό αριθμό κρουσμάτων είναι η 60-69 ετών. Συνεπώς διαφαίνεται ότι στην Ελλάδα κατά τα έτη 2010-2022 τα περισσότερα κρούσματα με λοίμωξη από τον ιό του WNV ήταν στο υψηλότερο ηλικιακό φάσμα, από 60 έως και άνω των 80 ετών συνολικά. Με άλλα λόγια πρόκειται για μια νόσο που -όσον αφορά την Ελληνική επικράτεια- πλήττει κατά βάση ηλικιωμένα άτομα (ΕΟΔΥ, 2023a).

Ηλικιακή ομάδα (έτη)	%	Αριθμός κρουσμάτων
<20	1,6	19
20-29	1,4	17
30-39	3,4	41
40-49	3,8	46
50-59	9,5	113
60-69	17,6	210
70-79	33,1	395
≥80	29,6	354
Σύνολο	100	1.195

Πίνακας 6: Αριθμητική και ποσοστιαία κατανομή των κρουσμάτων με λοίμωξη από τον ιό του ΔΝ με προσβολή του ΚΝΣ ανά ηλικιακή ομάδα, στην Ελλάδα, για τα έτη 2010-2022.

6. Διάγνωση, Θεραπεία & πρόληψη έναντι WNV

6.1 Διάγνωση λοίμωξης από WNV & Διαφοροδιάγνωση από άλλες νόσους

Αρχικά εφόσον ο ασθενής φέρει την τυπική συμπτωματολογία της νόσου, θα πρέπει να ληφθεί το ιστορικό του. Οπότε θα πρέπει να έχει προηγηθεί έκθεση του ασθενούς σε κουνούπια μέσα από υπαίθριες δραστηριότητες για να υπάρχει η υπόνοια λοίμωξης από τον WNV. Μια αρχική φυσική εξέταση θα πρέπει να επιβεβαιώσει τα κλινικά συμπτώματα του πυρετού, της κεφαλαλγίας, της μυαλγίας ή της μηνιγγίτιδας και της οξείας χαλαρής παράλυσης. Φυσικά η παρουσία τσιμπημάτων κουνουπιών στο δέρμα βοηθά επίσης στη διάγνωση. Ωστόσο, για να επιβεβαιωθεί η αρχική διάγνωση, θα πρέπει να διενεργηθούν ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις. Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα βασικά εργαστηριακά τεστ που διενεργούνται για τη διάγνωση της λοίμωξης από τον WNV (Rossi et al., 2010). Σύμφωνα με τις οδηγίες του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ), εργαστηριακός έλεγχος πρέπει να γίνεται όταν υπάρχει κλινική υποψία λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου, η οποία τίθεται σε κάθε άτομο με πρόσφατη έκθεση σε κουνούπια, ή μετάγγιση αίματος ή μεταμόσχευση οργάνου, ιδίως κατά την περίοδο μετάδοσης του ιού (Μάιο – Νοέμβριο) ΚΑΙ εμφάνιση τουλάχιστον ενός από τα παρακάτω: i. εγκεφαλίτιδας, ii. άσηπτης μηνιγγίτιδας, iii. άλλων οξέων κλινικών νευρολογικών εκδηλώσεων από το κεντρικό ή το περιφερικό νευρικό σύστημα (π.χ. οξείας χαλαρής παράλυσης), iv. πυρετού χωρίς κλινικές εκδηλώσεις από το νευρικό

σύστημα (ορισμένες φορές συνοδεύεται από εξάνθημα) και απουσία άλλης πιθανότερης διάγνωσης. Ιδιαίτερη σημασία έχει ο εργαστηριακός έλεγχος για τον ιό του Δυτικού Νείλου περιστατικών εγκεφαλίτιδας, χωρίς εργαστηριακά επιβεβαιωμένο αίτιο (παθογόνο), ιδιαίτερα σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (ΕΟΔΥ, 2023a).

Η ανίχνευση του αντισώματος IgM στον ορό ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) χρησιμοποιώντας την ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία σύλληψης αντισωμάτων IgM (IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay, MAC-ELISA) συνιστά τον ακρογωνιαίο λίθο στη διάγνωση του ιού του Δυτικού Νείλου στα περισσότερα κλινικά περιβάλλοντα. Επειδή λοιπόν το αντίσωμα IgM δεν διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, η παρουσία τους στο ΕΝΥ είναι πάντα παθολογική, υποδηλώνοντας επί της ουσίας λοίμωξη του ΚΝΣ. Μάλιστα έχει διαπιστωθεί ότι τουλάχιστον το 90% των ασθενών με εγκεφαλίτιδα ή μηνιγγίτιδα έχει αποδεδειγμένα αντισώματα IgM στο ΕΝΥ εντός 8 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Ακόμη άξια αναφοράς είναι μια μελέτη η οποία έδειξε ότι μόνο το 58% των ασθενών με πυρετό του Δυτικού Νείλου είχε θετικό αποτέλεσμα σε έλεγχο δείγματος αίματος με MAC-ELISA (Tilley et al., 2006). Κατά συνέπεια το ειδικό για τον ιό του Δυτικού Νείλου αντίσωμα IgM δύναται να μην μπορεί να ανιχνευθεί στον ορό ή στο πλάσμα, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια.. Μάλιστα ο έλεγχος με MAC-ELISA σε ορούς οξείας φάσης και φάσης ανάρρωσης θα παρέχουν την οριστική διάγνωση. Όσον αφορά τον έλεγχο για τα IgG αντισώματα θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν έχουν καμία χρησιμότητα στη διάγνωση κατά την οξεία φάση της νόσου (Petersen, Brault, & Nasci, 2013).

Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι πρόσφατη ανοσοποίηση με εμβόλια κίτρινου πυρετού ή ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας ή πρόσφατη λοίμωξη με σχετικό φλαβοϊό (π.χ. εγκεφαλίτιδας του Saint Louis ή δάγκειος πυρετός) μπορεί να οδηγήσει σε θετική απόκριση κατά την ανίχνευση των αντισωμάτων IgM έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου. Επιπρόσθετα υπάρχει μια ακόμη δοκιμασία η οποία μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση των ορολογικά διασταυρούμενων αντιδράσεων μεταξύ των φλαβοϊών, αλλά το τεστ είναι διαθέσιμο μόνο σε συγκεκριμένα εργαστήρια. Σε μία άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι το 17% των ασθενών που είχαν αποδεδειγμένα τον ιό του Δυτικού Νείλου διέθεταν τα ειδικά αντισώματα IgM κατά του ιού ακόμη και ένα χρόνο μετά την αρχική μόλυνση. Κατά συνέπεια μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η

παρουσία των IgM αντισωμάτων δεν σχετίζεται μόνο με την οξεία, πρόσφατη ασθένεια αλλά μπορεί να έχει παραμείνει από κάποια προηγούμενη λοίμωξη από τον WNV (Busch et al., 2008).

Οι δοκιμασίες ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων θα μπορούσαν να έχουν σημαντική χρησιμότητα σε ορισμένες κλινικές περιπτώσεις και να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά με την διενέργεια της MAC-ELISA. Βάσει μιας μελέτης διαπιστώθηκε ότι το 45% των περιπτώσεων με λοίμωξη από τον WNV εντοπίστηκε με δοκιμασία νουκλεϊκών οξέων, το 58% με ορολογικές μεθόδους, ενώ το 93% διαγνώστηκε μέσω μιας συνδυασμένης προσέγγισης αυτών των 2 μεθόδων (Tilley et al., 2006). Ειδικότερα, όσον αφορά την δοκιμασία ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όπου η εμφάνιση αντισωμάτων καθυστερεί ή απουσιάζει. Μάλιστα η χρήση της μεθόδου αυτής κατά τον έλεγχο της αιμοδοσίας στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά έχει σχεδόν εξαλείψει τον κίνδυνο μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου μέσω μετάγγισης (Petersen et al., 2013).

Ο συνολικός αριθμός των λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα είναι τυπικά φυσιολογικός ή ελαφρώς αυξημένος, όμως η εξέταση του ENU των ασθενών με νευροδιηθητική νόσο συνήθως δείχνει φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης, αυξημένη πρωτεΐνη (γενικά <150 mg/dL) και μέτρια πλειοκυττάρωση (γενικά <500 κύτταρα/μL) με υπεροχή λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, τα ουδετερόφιλα μπορεί να κυριαρχούν σε ένα πρώιμο στάδιο της λοίμωξης (Tyler et al., 2006). Οι απεικονιστικές μελέτες είναι συνήθως φυσιολογικές, αλλά οι βλάβες στη γέφυρα, τα γάγγλια, τον θάλαμο και το πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού φαίνεται ότι εμφανίζονται περιστασιακά. Αυτές μάλιστα οι βλάβες μπορεί να εμφανίζονται με αύξηση του χρόνου T2 σε απεικόνιση MRI (Gyure, 2009).

Δοκιμασία	Θετικό αποτέλεσμα
CBC (Complete Blood Count)	Αναιμία, λεμφοπενία, θρομβοπενία
Ειδική για ανίχνευση IgM ELISA/MAC-ELISA	Ανίχνευση ειδικών κατά του WNV IgM Abs

PRNT (Plaque Reduction Neutralization Tests)	Η ανάπτυξη του ιού αναστέλλεται σε ιστοκαλλιέργεια σε δείγμα ορού, υποδεικνύοντας έτσι την παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων
NAT (Nucleic Amplification Test)	Η ενίσχυση με PCR συμβάλλει στην ανίχνευση του RNA του WNV
Ιική απομόνωση/ Δοκιμασία πλάκας	Σε δείγμα ορού ή ENY απομονώνεται ο ιός, όπως φαίνεται στην ανάλυση της πλάκας
Ανάλυση ENY (CSF)	Παρουσία Αντισωμάτων και/ή ικών σωματιδίων με δοκιμασία ELISA ή πλάκας Αυξημένη πρωτεΐνη και αυξημένα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα
EMG/NCS (Electromyography/Nerve Conduction Study)	Σοβαρές επιδράσεις στα κύτταρα του πρόσθιου κέρατος

Πίνακας 7: Βασικές εργαστηριακές δοκιμασίες που διενεργούνται για τη διάγνωση της λοίμωξης από WNV.

Δεδομένου του γεγονότος ότι αρκετές ασθένειες εκδηλώνονται με συμπτώματα παρόμοια με την λοίμωξη που επάγεται από τον WNV, συμπεριλαμβανομένης της βακτηριακής μηνιγγίτιδας και εκείνων που προκαλούνται από τους ιούς της εγκεφαλίτιδας, καθίσταται ζωτικής σημασίας να πραγματοποιείται η διαφορική διάγνωση της λοίμωξης WNV από άλλες νόσους. Μάλιστα η διαφορική διάγνωση απαιτείται όταν ένας ασθενής παρουσιάζει ανεξήγητη εμπύρετη ασθένεια, εγκεφαλίτιδα ή έντονο πονοκέφαλο ή μηνιγγίτιδα. Μέχρι στιγμής, ο μόνος τρόπος διαφοροποίησης μεταξύ των αιτιών της εγκεφαλίτιδας/μηνιγγίτιδας είναι η πραγματοποίηση διαγνωστικών και ορολογικών εργαστηριακών εξετάσεων για τον εντοπισμό του συγκεκριμένου παθογόνου που προκαλεί τα συμπτώματα (Rossi et al., 2010). Στον πίνακα 8 παρατίθενται οι πιο συχνές ασθένειες οι οποίες εμφανίζουν κοινή συμπτωματολογία με την λοίμωξη από τον WNV (Truemper & Romero, 2007).

Predominant Clinical Feature(s)	Differential Diagnosis
Fever, Headache, Abdominal Complaints, Myalgias, Anorexia, Muscle Weakness	
With skin exanthem	Rocky Mountain spotted fever, ehrlichiosis, Colorado tick fever, atypical measles, meningococemia, leptospirosis, viral exanthems, idiosyncratic drug reactions (antibiotics, anticonvulsants)
With generalized lymphadenopathy	Tularemia, cat scratch fever, Lyme disease, CMV, EBV, toxoplasmosis, lymphoma, leukemia
With meningeal signs	Enteroviral and bacterial meningitis, lymphadenitis, tonsillitis, tonsillar abscess, cervical diskitis, osteomyelitis
With encephalitis, meningoencephalitis, seizures, coma	EEE, St Louis, WEE, Powassan, California, La Crosse, herpes, and rabies encephalitides, toxic encephalopathy, metabolic encephalopathy, SLE cerebritis, CVA, intracranial hemorrhage, bacterial meningitis, mycoplasma encephalitis, cat scratch encephalitis
With ocular inflammation	CMV, histoplasmosis, tuberculosis, syphilis, sarcoid, multifocal choroiditis, Lyme disease, SLE, JRA, JD
With flaccid paralysis, asymmetric weakness, myelitis, polyradiculopathy	Guillain-Barre syndrome, enteroviral poliomyelitis, rabies, CMV and varicella tranverse myelitis, spinal epidural abscess

EEE — Eastern equine encephalitis, WEE — Western equine encephalitis, EBV — Epstein-Barr virus, CMV — cytomegalovirus, SLE — systemic lupus erythematosus, JD — juvenile dermatomyositis, JRA — juvenile rheumatoid arthritis, CVA — cerebrovascular vascular accident

Πίνακας 8: Διαφοροδιάγνωση λοίμωξης από WNV από άλλες νόσους.

6.2 Θεραπεία λοίμωξης από WNV & Πρόληψη

Επί του παρόντος δεν υπάρχει οριστική θεραπεία για την αντιμετώπιση της λοίμωξης που επάγεται από τον WNV, οπότε το κλινικό πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι σε μεγάλο βαθμό υποστηρικτικό και στοχεύει στον έλεγχο της συμπτωματολογίας της λοίμωξης μέσω περιορισμού του άλγους των πονοκεφάλων, ενώ περιλαμβάνει αντιεμετική θεραπεία και λήψη ηλεκτρολυτών για τον έμετο, παρακολούθηση της ενδοκρανιακής πίεσης και περιορισμό των επιληπτικών κρίσεων στις περιπτώσεις που υπάρχουν (DeBiasi & Tyler, 2006). Φυσικά το ενδεδειγμένο πρωτόκολλο θεραπείας τροποποιείται κατά περίπτωση, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε μεταμοσχευμένους ασθενείς στους οποίους υπάρχει η υποψία μηνιγγοεγκεφαλίτιδας. Τότε συνήθως επιδιώκεται η άμεση διακοπή των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων (Kleinschmidt-DeMasters et al., 2004).

Ακόμη έχουν αναπτυχθεί διάφορες προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν καλλιέργεια ιστού και μελέτη ζωικών μοντέλων στο πλαίσιο εύρεσης πιο αποτελεσματικών μεθόδων προφύλαξης και θεραπείας. Έτσι, βρέθηκε ότι η ριμπαβιρίνη αναστέλλει το ένζυμο της αφυδρογονάσης της μονοφωσφορικής ινσίνης (IMP) και προκαλεί εξάντληση των ενδοκυτταρικών δεξαμενών γουανοσίνης (Leysen et al., 2005). Αν και η ριμπαβιρίνη έχει εμφανίσει ανασταλτική δράση έναντι του WNV σε κυτταρική καλλιέργεια σε υψηλές δόσεις, έχει εμφανίσει επίσης αυξημένη θνησιμότητα σε χάμστερ που έλαβαν την συγκεκριμένη θεραπεία (Morrey et al., 2004). Δυστυχώς τα προαναφερθέντα εργαστηριακά ευρήματα που αφορούν την ριμπαβιρίνη επιβεβαιώθηκαν σε μια επιδημία WNV στο Ισραήλ το 2000 (Chowers et al., 2001). Άξιο αναφοράς είναι και το μυκοφαινολικό οξύ, που συνιστά έναν αναστολέα της αφυδρογονάσης της IMP, ο οποίος αν και ανέστειλε τον WNV σε κυτταρική καλλιέργεια, εμφάνισε ανοσοκατασταλτικό αποτέλεσμα *in vivo*. Έτσι, η ριμπαβιρίνη και το μυκοφαινολικό οξύ δεν αποτελούν ιδανικούς θεραπευτικούς υποψηφίους κατά της λοίμωξης από WNV (Diamond, 2009). Ένα άλλο μόριο που έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της εγκεφαλίτιδας είναι η IFN- α (Kalil et al., 2005). Ειδικά σε άτομα τα οποία έχουν εμφανίσει προσβολή του ΚΝΣ, έχει χρησιμοποιηθεί η γ-ανοσοσφαιρίνη (Haley et al., 2003). Μάλιστα σε μια προσπάθεια περιορισμού των μειονεκτημάτων της ανθρώπινης γάμμα σφαιρίνης, έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί θραύσματα ανθρώπινων αντισωμάτων έναντι αυτής, με εξαιρετικά αποτελέσματα σε διάφορα ζωικά μοντέλα (Gould et al., 2005).

Μία από τις νεότερες προσεγγίσεις στο ζήτημα αυτό περιλαμβάνει την παρεμβολή RNA (RNAi). Πρόκειται για μια διαδικασία με την οποία το κυτταρικό RNA αποικοδομείται εντός του κυτταροπλάσματος των κυττάρων (Meister et al., 2004). Έτσι, σε 2 μελέτες που εφαρμόστηκε η τεχνική αυτή σε επίμυες βρέθηκε αφενός σημαντική μείωση του ιικού φορτίου και αφετέρου προστασία από θανατηφόρα προσβολή (Bai et al., 2005; Kumar et al., 2006). Επιπλέον χάρη στην πρόοδο της βιοτεχνολογίας, πολλά πεπτίδια με πιθανή φαρμακευτική δράση έχουν ελεγχθεί μέσω προγραμμάτων προσομοίωσης και διαλογής πριν την εφαρμογή τους σε ζωικούς οργανισμούς (Diamond, 2009).

Εφόσον λοιπόν δεν υπάρχει κάποια εξειδικευμένη θεραπεία για την αντιμετώπιση της νόσου προτείνεται η πρόληψη. Έτσι, όταν υπάρχει υποψία κάποιας επικείμενης εστίας κρουσμάτων WNV, ο πρωταρχικός στόχος είναι να περιοριστεί ο αριθμός των

μολυσμένων κουνουπιών με ευρεία εφαρμογή οργανοφωσφορικών ή συνθετικών πυρεθροειδών εντομοκτόνων. Τότε, το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης δεσμεύεται μη αντιστρεπτά από τα οργανοφωσφορικά. Άμεση συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι η διάνοιξη των καναλιών νατρίου των νευρωνικών μεμβρανών από τα πυρεθροειδή, με αποτέλεσμα την παράλυση του κουνουπιού. Συνήθως συνδυάζεται με το πιπερονυλοβουτοξείδιο, το οποίο αδρανοποιεί το ένζυμο της μικροσωμικής οξειδάσης των κουνουπιών, αποτρέποντάς τα έτσι από το να μεταβολίσουν τα πυρεθροειδή (David & Abraham, 2016).

Αναμφίβολα η πρόληψη του WNV είναι άμεσα συνυφασμένη με την μείωση του αριθμού των κουνουπιών σε μια κοινότητα. Πάνω λοιπόν σε αυτή την βασική αρχή έχουν στηριχθεί τα προγράμματα ελέγχου των κουνουπιών, τα οποία βοηθούν στον εντοπισμό της πηγής τους καθώς και στην εξάλειψη των τόπων αναπαραγωγής τους, προάγοντας μέτρα προνυμφοκτονίας και εστιάζοντας στον έλεγχο των πληθυσμών των ενηλίκων κουνουπιών. Όταν λοιπόν αναμένεται κάποια επιδημία WNV, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα μέτρα, όπως η χρήση οργανοφωσφορικών ή συνθετικών πυρεθροειδών εντομοκτόνων (Petersen et al., 2013). Μάλιστα μέχρι στιγμής έχουν εφαρμοστεί ανάλογα μέτρα σε 2 περιπτώσεις: στην κοιλάδα Coachella της Καλιφόρνια και στο Σακραμέντο των ΗΠΑ. Σε αυτές λοιπόν τις περιπτώσεις εφαρμόστηκε στρατηγικά χρονομετρημένη απελευθέρωση εξαιρετικά μικρής ποσότητας εντομοκτόνων στην αρχή της εποχής αναπαραγωγής των κουνουπιών με αποτέλεσμα τον περιορισμό των διαδοχικών μεταδόσεων του ιού και κατ'επέκταση του αριθμού των λοιμώξεων από WNV (Lothrop et al., 2008; Macedo et al., 2010).

Ωστόσο δεν θα πρέπει να παραλείπεται και η εφαρμογή απλών μέτρων ελέγχου, όπως είναι η χρήση κατάλληλων αποθητικών των κουνουπιών και η μείωση της εκτεθειμένης επιφάνειας του δέρματος φορώντας μακριά μανίκια και μακριά παντελόνια, καθώς έτσι μπορεί να μειωθεί σημαντικά ο κίνδυνος από τα τσιμπήματα των κουνουπιών. Επίσης δεδομένου ότι είναι γνωστό πως πολλά είδη κουνουπιών εμφανίζουν αιχμή στη δραστηριότητά τους κατά το σούρουπο και την αυγή, προτείνεται η μείωση της υπαίθριας δραστηριότητας σε αυτές τις ώρες. Άλλος ένας εύκολος τρόπος ελέγχου είναι η εγκατάσταση σίτας σε πόρτες και παράθυρα. Επίσης προτείνεται η αποφυγή της χρήσης αντικειμένων στα οποία δύναται να κατακρατηθεί νερό και να δημιουργηθούν μικρές εστίες μόλυνσης με λιμνάζοντα ύδατα (λάστιχα, κουβάδες, ζαρντινιέρες, παιχνίδια, πισίνες, γλάστρες ή δοχεία απορριμμάτων).

Μάλιστα έτσι θα αποφευχθεί ταυτόχρονα και η εναπόθεση αυγών κουνουπιών σε στάσιμα νερά. Αυτά τα προληπτικά μέτρα μαζί με τα προγράμματα ελέγχου θεωρείται ότι θα μπορούσαν να συμβάλουν στην μείωση του κινδύνου της νόσου (Saiz et al., 2021).

Στο πλαίσιο της πρόληψης φυσικά εντάσσονται και τα εμβόλια. Αν και δεν υπάρχει κάποιο εγκεκριμένο εμβόλιο από τον FDA για ανθρώπινη χρήση, υπάρχουν αποτελεσματικά αδειοδοτημένα εμβόλια για τους ίππους (πίνακας 9) (Saiz et al., 2021).

Type of vaccine	Vaccine name	Immunogen	Status
Inactivated	West Nile Innovator (US)	Inactivated whole virus	In the market
	Equip WNV (Europe)		
	Vetera WNV	Inactivated whole virus	In the market
Live attenuated virus	Prestige WNV	Whole inactivated WNV – flavivirus chimera	In the market
	Recombiteq Equine WNV (US)	Chimeric vaccine consisting in a canarypox expressing WNV prM and E	In the market
	Proteq West Nile (Europe)		
DNA	PreveNile	Chimeric vaccine encoding WNV prM and E genes in the backbone of YFV 17D	Recalled
	West Nile Innovator DNA	Plasmid encoding prM and E	Discontinued

Πίνακας 9: Εγκεκριμένα εμβόλια κατά του WNV σε ίππους.

Αυτή μάλιστα η επιτυχία έχει επιτρέψει να αναπτυχθούν νέες στρατηγικές για τα ανθρώπινα εμβόλια. Επί του παρόντος, υπάρχουν αρκετά εμβόλια υπό εξέλιξη στη φάση δηλαδή των κλινικών δοκιμών. Υπάρχουν λοιπόν διάφορες στρατηγικές που ακολουθούνται για την ανάπτυξη εμβολίου κατά του WNV, ενώ τα επικρατέστερα παρουσιάζονται στον πίνακα 10 (Saiz et al., 2021). Η πρώτη στρατηγική αφορά τον εμβολιασμό με πολλαπλές δόσεις του αδρανοποιημένου ιού (Ng et al., 2003; Samina et al., 2005). Η Fort Dodge Animal Health ανέπτυξε τη συγκεκριμένη στρατηγική απενεργοποιώντας ολόκληρο τον ιό με φορμαλίνη. Αυτό το σκεύασμα μάλιστα έχει λάβει έγκριση για χρήση σε άλογα. Η δεύτερη στρατηγική περιλαμβάνει την παραγωγή αντιγόνων WNV από τον υδατανθρακικό σκελετό ενός ετερόλογου ιού. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και το εμβόλιο Recombitek, το οποίο έχει επίσης λάβει άδεια χρήσης σε άλογα (Pletnev et al., 2003; Arroyo et al., 2004; Minke et al., 2004; Monath et al., 2006). Η τρίτη προσέγγιση είναι ο εμβολιασμός DNA, όπου τα δομικά αντιγόνα WNV (prM-E) εκφράζονται από πλασμίδια DNA (Davis, B.S. et al., 2001). Η τελική στρατηγική έγκειται στον εμβολιασμό με καθαρές ιικές πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να παραχθούν σε κυτταροκαλλιέργεια θηλαστικών, βακτηρίων ή

μυκήτων (Chu, Chiang, & Ng, 2007; Lieberman et al., 2007). Επιπρόσθετα, η μελέτη του Seino και των συνεργατών του συνέκρινε την αποτελεσματικότητα 3 διαθέσιμων εμβολίων. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα άλογα που εμβολιάστηκαν με τον ζωντανό, χμιαρικό ιό, ο οποίος είχε ενσωματωθεί σε κατάλληλους φορείς (πχ φορείς του κίτρινου πυρετού ή της ευλογιάς των καναρινιών) εμφάνισαν λιγότερα κλινικά σημεία λοίμωξης από WNV εν συγκρίσει με ζώα που έλαβαν τον αδρανοποιημένο ιό (Seino et al., 2007). Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι θα πρέπει να διεξαχθεί περισσότερη έρευνα στον τομέα των ανθρώπινων εμβολίων κατά του WNV προκειμένου αφενός να περιοριστεί η μελλοντική του επέκταση σε νέες θέσεις γύρω από τον κόσμο, αλλά και αφετέρου να αποτραπεί η ανάδυση νεότερων συγγενικών RNA ιών.

Type of vaccine	Vaccine name (Developer)	Immunogen	Clinical trial identifier (NCT Number)	Phase	Start	Relevant results
Live attenuated	ChimeriVax-WN02 (Sanofi Pasteur)	Chimeric vaccine encoding WNV prM and E genes in the backbone of YFV 17D	NA	I		Safe, well-tolerated, and induced high levels of neutralizing antibodies and CD4+ and CD8 + T cell responses
			NCT00442169	II	2005	Highly immunogenic in younger, adults and the elderly, including subjects ≥65 years old
			NCT00746798	II	2008	Highly immunogenic and well tolerated among subjects ≥50 years old
DNA	rWN/DEN4Δ30 (NIAID)	Chimeric vaccine encoding WNV prM and E genes in the backbone of DENV-4 with a 30 nt deletion	NCT02186626	I	2014	Safe and immunogenic in healthy adults, including those aged 50–65
	VRC-WNVDNA017 -00-VP (NIAID)	DNA vaccine encoding the prM and E genes	NCT00106769	I	2005	Safe and well-tolerated. Induced T cell and antibody responses
	VRC-WNVDNA020 -00-VP (NIAID)		NCT00300417	I	2006	Safe and well-tolerated. Induced T cell and neutralizing antibody responses, similar responses in young and older age group
Subunit	WN-80E HBV 002 (Hawaii Biotech)	Recombinant, truncated E protein	NCT00707642	I	2008	Safe and induced seroconversion
Inactivated	Formalin-inactivated WNV (Nanotherapeutics Inc.)	Formalin-inactivated whole virus		I/II		Safe and immunogenic
	HydroVax-001 (Najit Technologies)	Hydrogen peroxide-inactivated whole virion	NCT02337868	I	2015	Modestly immunogenic and well-tolerated

Πίνακας 10: Επιλεγμένες κλινικές δοκιμές ανθρώπινων εμβολίων κατά του WNV.

7. Συμπεράσματα

Ο WNV απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1937 από μια γυναίκα στην περιοχή του Δυτικού Νείλου στην Ουγκάντα. Έκτοτε, ο ιός του Δυτικού Νείλου εξαπλώθηκε πέρα από την αρχική αυτή περιοχή προκαλώντας ανθρώπινες ασθένειες σε κάθε ήπειρο εκτός από την Ανταρκτική. Μάλιστα πλέον αποτελεί την πιο διαδεδομένη αιτία νευρολογικής νόσου στον κόσμο, προκαλούμενης από αρμποϊούς. Η απομόνωσή του κατέστησε εφικτό τον προσδιορισμό ποικίλων γονιδιωματικών πληροφοριών και σαφώς συνέβαλε στην καλύτερη κατανόησή του. Έτσι πλέον είναι γνωστό ότι ο WNV συνιστά έναν RNA ιό θετικής πολικότητας που ανήκει στην οικογένεια *Flaviviridae*. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 9 βασικές γενεαλογικές γραμμές του ιού, αλλά μόνο οι γενεαλογίες 1 και 2 φαίνεται να σχετίζονται με την πρόκληση ασθένειας στον άνθρωπο. Μάλιστα, πριν από την εμφάνιση ενός στελέχους της γενεαλογίας 2 στην Ουγγαρία το 2004, είχαν αναφερθεί μόνο περιστασιακά κάποια κρούσματα σε ζώα και ανθρώπους στην Ευρώπη τα οποία οφείλονταν σε στελέχη της γενεαλογίας 1. Από το 2008 και έπειτα, το στέλεχος της γενεαλογίας 2 εξαπλώθηκε στην κεντρική Ευρώπη και στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου. Αυτό το στέλεχος προκάλεσε σημαντικές επιδημίες σε ανθρώπους και ζώα σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, της Ουγγαρίας και της Σερβίας.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εισαγωγή του ιού στην ευρωπαϊκή λεκάνη. Ειδικότερα, ο WNV εισήχθη στην Ευρώπη μέσω αποδημητικών πτηνών που ταξιδεύουν από την υποσαχάρια Αφρική, τη Βόρεια Αφρική ή την Μέση Ανατολή, ενώ θεωρείται πιθανό εγχώρια είδη πτηνών της Ευρώπης να αποτελούν φορείς του ιού. Ειδικότερα, στην Ευρώπη, τα είδη κουνουπιών *Culex pipiens* και *Culex modestus* αποτελούν τους κύριους φορείς του WNV. Τα κουνούπια αυτά τρέφονται τόσο με πτηνά όσο και με θηλαστικά και πιθανότατα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως φορείς στην επιζωοτική μετάδοση του ιού στους ανθρώπους και στα ιπποειδή. Η μετάδοση του WNV συμβαίνει όταν τα κουνούπια είναι ενεργά, δηλαδή μεταξύ άνοιξης και φθινοπώρου και οι περισσότερες λοιμώξεις στους ανθρώπους και στα ιπποειδή παρατηρούνται μεταξύ Ιουλίου και Σεπτεμβρίου.

Στους ανθρώπους, η περίοδος επώασης κυμαίνεται συνήθως από δύο έως έξι ημέρες, αν και έχουν αναφερθεί περίοδοι επώασης έως και 21 ημέρες σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Η ιαμμία αν και είναι χαμηλή, εμφανίζεται από μία έως τρεις ημέρες μετά την

μόλυνση και μπορεί να διαρκέσει έως και 11 ημέρες. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι ο άνθρωπος θεωρείται ότι δεν μπορεί να μεταδώσει τον ιό στα κουνούπια. Η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο μπορεί να συμβεί μέσω της μετάγγισης αίματος και συστατικών αίματος και μέσω της μεταμόσχευσης ιστών, κυττάρων ή οργάνων από μολυσμένο και ιαμικό δότη. Επίσης έχει καταγραφεί και μια περίπτωση διαπλακουντιακής μετάδοσης από μητέρα σε παιδί και μία περίπτωση σε βρέφος μέσω του θηλασμού.

Οι περισσότερες λοιμώξεις από τον WNV στον άνθρωπο είναι ασυμπτωματικές. Περίπου το 20% των λοιμώξεων από WNV στους ανθρώπους μπορεί να προκαλέσει πυρετό, ενώ λιγότερο από 1% μπορεί να προκαλέσει νευρολογική λοίμωξη. Η λοίμωξη από WNV συνήθως χαρακτηρίζεται από μια αιφνίδια έναρξη συμπτωμάτων που μπορεί να περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, κακουχία, πυρετό, μυαλγία, έμετο, εξάνθημα, κόπωση και πόνο στα μάτια. Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων κυμαίνεται από μια ήπια αυτοπεριοριζόμενη νόσο από την οποία οι ασθενείς αναρρώνουν μέσα σε μία εβδομάδα έως και μια παρατεταμένη εξουθενωτική ασθένεια που μπορεί να διαρκέσει για μήνες. Η νευρολογική λοίμωξη που μπορεί να προκληθεί από τον WNV χαρακτηρίζεται από συμπτώματα που επηρεάζουν το ΚΝΣ συμπεριλαμβάνοντας μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση ή και συνδυασμό αυτών. Οι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη λοίμωξης περιλαμβάνουν την προχωρημένη ηλικία, κακοήθειες που διαταράσσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, υπέρταση, αιματολογικές διαταραχές, σακχαρώδη διαβήτη, νεφρική νόσο, κατάχρηση αλκοόλ και γενετικούς παράγοντες, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών με WNNND μπορεί να φτάσει έως και το 17%. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι η κλιματική αλλαγή αυξάνει τον κίνδυνο έκθεσης του ανθρώπου στον ιό του Δυτικού Νείλου. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι υψηλότερες θερμοκρασίες που σχετίζονται με την κλιματική αλλαγή μπορούν να επιταχύνουν την ανάπτυξη των κουνουπιών, τα ποσοστά των τσιμπημάτων και την επώαση της νόσου εντός των κουνουπιών. Μάλιστα οι κλιματικές συνθήκες, ιδιαίτερα η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η υγρασία και οι βροχοπτώσεις συμπεριλαμβάνονται μεταξύ των πιο κρίσιμων παραγόντων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αφθονία των κουνουπιών και την συνακόλουθη ενίσχυση του WNV.

Για την αποτελεσματική διάγνωση της λοίμωξης από τον WNV απαιτείται η λεπτομερής λήψη ιστορικού, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής έκθεσης σε μολυσμένα κουνούπια καθώς και η διενέργεια ορολογικών και ιολογικών δοκιμασιών. Τα δείγματα που επιλέγονται για το σκοπό αυτό είναι συνήθως το ολικό αίμα, το πλάσμα, ο ορός, το ENY (σε περίπτωση νευρολογικών περιπτώσεων) και τα ούρα. Η έμμεση ανίχνευση μιας λοίμωξης από WNV βασίζεται στην ανίχνευση των ειδικών για τον WNV IgM και/ή IgG, ενώ οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι βασίζονται στις αρχές της ενζυμικής ανοσοπροσοροφητικής δοκιμασίας (ELISA). Η λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου μπορεί να επιβεβαιωθεί και άμεσα με ανίχνευση του γονιδιώματος του ιού ή και απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες. Το γονιδίωμα του ιού είναι τυπικά ανιχνεύσιμο στο πλάσμα από 2-18 ημέρες μετά την μόλυνση και έως και πέντε ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, αν και έχει αναφερθεί παρατεταμένη ιαιμία (έως 35 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων).

Βάσει των δεδομένων της τελευταίας επιδημιολογικής επιτήρησης για τα έτη 2015-2019 στην Ευρώπη, προκύπτει ότι ο ιός εμφανίζει μια ελαφρώς υψηλότερη τάση προσβολής του ΚΝΣ και θνησιμότητας. Επίσης φαίνεται ότι η λοίμωξη από τον WNV αν και αρχικά εμφανίζονταν σε παιδιά πλέον εμφανίζεται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, κυρίως 65 ετών και άνω, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει μια μεγαλύτερη προτίμηση στο ανδρικό φύλο. Σύμφωνα με τα δεδομένα του ECDC, η Ελλάδα κατατάσσεται στις χώρες με αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων και θανάτων από τον WNV, ενώ συγκεκριμένα για το 2022 παρατηρήθηκε έξαρση των κρουσμάτων με λοίμωξη από τον WNV στην Ελλάδα, με αυξημένο ταυτόχρονα αριθμό κρουσμάτων με προσβολή του ΚΝΣ καθώς και αυξημένο αριθμό θανάτων. Αναμφισβήτητα, θα πρέπει να δοθεί μεγαλύτερη προσοχή στην πρόληψη της λοίμωξης από τον συγκεκριμένο ιό, τόσο μέσω λήψης ατομικών μέτρων πρόληψης όσο και μέσω εφαρμογής διαφόρων στρατηγικών από την πολιτεία. Στο πλαίσιο αυτό κρίνεται ζωτικής σημασίας η εύρεση κατάλληλης εξειδικευμένης θεραπείας, καθώς και εμβολίων.

8. Περίληψη

Ο WNV συνιστά έναν RNA ιό θετικής φοράς που ανήκει στην οικογένεια Flaviviridae. Οι περισσότερες λοιμώξεις από τον WNV στον άνθρωπο είναι ασυμπτωματικές. Περίπου το 20% των λοιμώξεων στους ανθρώπους μπορεί να προκαλέσει πυρετό, ενώ λιγότερο από το 1% μπορεί να προκαλέσει νευρολογική λοίμωξη. Μάλιστα η εκδήλωση της νευρολογικής λοίμωξης φαίνεται ότι αποτελεί συνάρτηση της προχωρημένης ηλικίας, της καταστολής του ανοσοποιητικού και της ύπαρξης άλλων χρόνιων παθολογιών, συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης, του διαβήτη και της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Επιπλέον οι κλιματικές συνθήκες και ιδιαίτερα η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η υγρασία και οι βροχοπτώσεις επηρεάζουν αριθμητικά τον πληθυσμό των κουνουπιών και κατά συνέπεια και τα περιστατικά των λοιμώξεων από τον WNV. Η βιβλιογραφική μελέτη της διαθέσιμης επιδημιολογίας των επαγόμενων από WNV λοιμώξεων αποδεικνύει ότι υπάρχει παγκόσμια διασπορά, με σποραδικό και ενδημικό χαρακτήρα. Όπως διαπιστώθηκε, ο ιός εμφανίζει μια ελαφρώς υψηλότερη τάση προσβολής του ΚΝΣ και θνησιμότητας κατά τα τελευταία έτη. Επίσης φαίνεται ότι η λοίμωξη από τον WNV αν και αρχικά εμφανίζονταν σε παιδιά πλέον εμφανίζεται κυρίως σε άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει μια μεγαλύτερη προτίμηση στο ανδρικό φύλο. Κρίνεται αναγκαία η εύρεση κατάλληλης εξειδικευμένης θεραπείας καθώς και εμβολίων προκειμένου αφενός να περιοριστεί η μελλοντική επέκταση του ιού σε νέες θέσεις στον κόσμο, αλλά και αφετέρου να αποτραπεί η ανάδυση νεότερων στελεχών του ιού του Δυτικού Νείλου.

9. Abstract

WNV is a positive-sense RNA virus which belongs to the Flaviviridae family. Even though most WNV infections in humans are asymptomatic, it is found that approximately 20% of the infections can cause fever, while less than 1% can cause a neurological infection. In fact, the occurrence of neurological infection appears to be related to advanced age, immunosuppression, and the presence of other chronic medical conditions, including hypertension, diabetes, and chronic renal failure. Furthermore, the climatic conditions and especially the ambient temperature, humidity and rainfall numerically affect the mosquito population and consequently the incidence of WNV infections. Review of the available epidemiology demonstrates that there is global distribution, both sporadic and endemic. As it was found, the virus exhibits slightly higher neuroinvasion and mortality rate in the most recent years. It also seems that WNV infection, although initially occurred in children, nowadays appears predominantly in males aged 65 and over. Thus, it is deemed necessary to find appropriate specialized treatment as well as vaccines in order to limit the future expansion of the virus around the world on the one hand, but also to prevent the emergence of newer strains of West Nile virus on the other hand.

10. Βιβλιογραφία

- Adams, S., Broom, A., Sammels, L., Hartnett, A., Howard, M., Coelen, R., . . . Hall, R. (1995). Glycosylation and antigenic variation among Kunjin virus isolates. *Virology*, *206*(1), 49-56.
- Ahmadnejad, F., Otarod, V., Fallah, M. H., Lowenski, S., Sedighi-Moghaddam, R., Zavareh, A., . . . Sabatier, P. (2011). Spread of West Nile virus in Iran: a cross-sectional serosurvey in equines, 2008-2009. *Epidemiol Infect*, *139*(10), 1587-1593. doi:10.1017/s0950268811000173
- Aliota, M. T., & Kramer, L. D. (2012). Replication of West Nile virus, Rabensburg lineage in mammalian cells is restricted by temperature. *Parasit Vectors*, *5*, 293. doi:10.1186/1756-3305-5-293
- Ambrose, R. L., & Mackenzie, J. M. (2011a). A conserved peptide in West Nile virus NS4A protein contributes to proteolytic processing and is essential for replication. *J Virol*, *85*(21), 11274-11282. doi:10.1128/jvi.05864-11
- Ambrose, R. L., & Mackenzie, J. M. (2011b). A Conserved Peptide in West Nile Virus NS4A Protein Contributes to Proteolytic Processing and Is Essential for Replication. *Journal of virology*, *85*(21), 11274-11282. doi:doi:10.1128/JVI.05864-11
- Anastasiadou, A., Kakoulidis, I., Butel, D., Kehagia, E., & Papa, A. (2013). Follow-up study of Greek patients with West Nile virus neuroinvasive disease. *International journal of infectious diseases*, *17*(7), e494-e497. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.12.006>
- Anderson, R. C., Horn, K. B., Hoang, M. P., Gottlieb, E., & Bennin, B. (2004). Punctate exanthem of West Nile Virus infection: report of 3 cases. *J Am Acad Dermatol*, *51*(5), 820-823. doi:10.1016/j.jaad.2004.05.031
- Angelou, A., Kioutsoukis, I., & Stilianakis, N. I. (2021). A climate-dependent spatial epidemiological model for the transmission risk of West Nile virus at local scale. *One Health*, *13*, 100330.
- Anis, E., Grotto, I., Mendelson, E., Bin, H., Orshan, L., Gandacu, D., . . . Lev, B. (2014). West Nile fever in Israel: The reemergence of an endemic disease. *Journal of Infection*, *68*(2), 170-175. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.10.009>
- Appler, K. K., Brown, A. N., Stewart, B. S., Behr, M. J., Demarest, V. L., Wong, S. J., & Bernard, K. A. (2010). Persistence of West Nile virus in the central nervous system and periphery of mice. *PLoS One*, *5*(5), e10649. doi:10.1371/journal.pone.0010649
- Arjona, A., Foellmer, H. G., Town, T., Leng, L., McDonald, C., Wang, T., . . . Bucala, R. (2007). Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion. *J Clin Invest*, *117*(10), 3059-3066. doi:10.1172/jci32218
- Armah, H. B., Wang, G., Omalu, B. I., Tesh, R. B., Gyure, K. A., Chute, D. J., . . . Kleinschmidt-DeMasters, B. K. (2007). Systemic distribution of West Nile virus infection: postmortem immunohistochemical study of six cases. *Brain Pathology*, *17*(4), 354-362.
- Arnold, S. J., Osvath, S. R., Hall, R. A., King, N. J., & Sedger, L. M. (2004). Regulation of antigen processing and presentation molecules in West Nile virus-infected human skin fibroblasts. *Virology*, *324*(2), 286-296. doi:10.1016/j.virol.2004.03.036
- Arroyo, J., Miller, C., Catalan, J., Myers, G. A., Ratterree, M. S., Trent, D. W., & Monath, T. P. (2004). ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *J Virol*, *78*(22), 12497-12507. doi:10.1128/jvi.78.22.12497-12507.2004
- Arya, S. C., Agarwal, N., Fratkin, J. D., & Leis, A. A. (2004). Spinal Cord Neuropathology in Human West Nile Virus Infection/In Reply. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *128*(11), 1210.

- Baba, M., Logue, C. H., Oderinde, B., Abdulmaleek, H., Williams, J., Lewis, J., . . . P, D. A. (2013). Evidence of arbovirus co-infection in suspected febrile malaria and typhoid patients in Nigeria. *J Infect Dev Ctries*, 7(1), 51-59. doi:10.3855/jidc.2411
- Bagnarelli, P., Marinelli, K., Trotta, D., Monachetti, A., Tavio, M., Del Gobbo, R., . . . Varaldo, P. (2011). Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill*, 16(43).
- Bai, F., Kong, K. F., Dai, J., Qian, F., Zhang, L., Brown, C. R., . . . Montgomery, R. R. (2010). A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J Infect Dis*, 202(12), 1804-1812. doi:10.1086/657416
- Bai, F., Wang, T., Pal, U., Bao, F., Gould, L. H., & Fikrig, E. (2005). Use of RNA Interference to Prevent Lethal Murine West Nile Virus Infection. *The Journal of infectious diseases*, 191(7), 1148-1154. doi:10.1086/428507
- Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis*, 12(4), 618-623. doi:10.3201/eid1204.051379
- Bardos, V., Adamcova, J., Dedei, S., Gjini, N., Rosický, B., & Simkova, A. (1959). Neutralizing antibodies against some neurotropic viruses determined in human sera in Albania. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 3(3), 277-282.
- Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Pagni, S., Martello, T., Cattai, M., . . . Palù, G. (2013). Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis*, 208(7), 1086-1092. doi:10.1093/infdis/jit290
- Baty, S. A., Gibney, K. B., Staples, J. E., Patterson, A. B., Levy, C., Lehman, J., . . . Fischer, M. (2012). Evaluation for West Nile Virus (WNV) RNA in urine of patients within 5 months of WNV infection. *J Infect Dis*, 205(9), 1476-1477. doi:10.1093/infdis/jis221
- Beasley, D. W., Davis, C., Whiteman, M., Granwehr, B., Kinney, R., & Barrett, A. D. (2004). *Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America*: Springer.
- Beasley, D. W., & Barrett, A. D. (2002). Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *Journal of virology*, 76(24), 13097-13100.
- Beasley, D. W., Davis, C. T., Estrada-Franco, J., Navarro-Lopez, R., Campomanes-Cortes, A., Tesh, R. B., . . . Barrett, A. D. (2004). Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2221.
- Beasley, D. W., Davis, C. T., Guzman, H., Vanlandingham, D. L., Travassos da Rosa, A. P., Parsons, R. E., . . . Barrett, A. D. (2003). Limited evolution of West Nile virus has occurred during its southwesterly spread in the United States. *Virology*, 309(2), 190-195. doi:10.1016/s0042-6822(03)00150-8
- Beasley, D. W., Whiteman, M. C., Zhang, S., Huang, C. Y.-H., Schneider, B. S., Smith, D. R., . . . Barrett, A. D. (2005). Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *Journal of virology*, 79(13), 8339-8347.
- Ben-Nathan, D., Huitinga, I., Lustig, S., van Rooijen, N., & Kobiler, D. (1996). West Nile virus neuroinvasion and encephalitis induced by macrophage depletion in mice. *Arch Virol*, 141(3-4), 459-469. doi:10.1007/bf01718310
- Bentler, K. T., Hall, J. S., Root, J. J., Klenk, K., Schmit, B., Blackwell, B. F., . . . Clark, L. (2007). Serologic evidence of West Nile virus exposure in North American mesopredators. *Am J Trop Med Hyg*, 76(1), 173-179.
- Bernkopf, H., Levine, S., & Nerson, R. (1953). Isolation of West Nile virus in Israel. *J Infect Dis*, 93(3), 207-218. doi:10.1093/infdis/93.3.207
- Best, S. M. (2017). The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. *J Virol*, 91(3). doi:10.1128/jvi.01970-16

- Bhuvanakantham, R., & Ng, M. L. (2013). West Nile virus and dengue virus capsid protein negates the antiviral activity of human Sec 3 protein through the proteasome pathway. *Cellular microbiology*, *15*(10), 1688-1706.
- Bielefeldt-Ohmann, H., Smirnova, N. P., Tolnay, A. E., Webb, B. T., Antoniazzi, A. Q., van Campen, H., & Hansen, T. R. (2012). Neuro-invasion by a 'Trojan Horse' strategy and vasculopathy during intrauterine flavivirus infection. *Int J Exp Pathol*, *93*(1), 24-33. doi:10.1111/j.1365-2613.2011.00795.x
- Bogachek, M. V., Protopopova, E. V., Loktev, V. B., Zaitsev, B. N., Favre, M., Sekatskii, S. K., & Dietler, G. (2008). Immunochemical and single molecule force spectroscopy studies of specific interaction between the laminin binding protein and the West Nile virus surface glycoprotein E domain II. *J Mol Recognit*, *21*(1), 55-62. doi:10.1002/jmr.866
- Botha, E. M., Markotter, W., Wolfaardt, M., Paweska, J. T., Swanepoel, R., Palacios, G., . . . Venter, M. (2008). Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerg Infect Dis*, *14*(2), 222-230. doi:10.3201/eid1402.070457
- Brand, M. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks essays in biochemistry. *Essays Biochem*, *47*, 53-67.
- Brault, A. C., Huang, C. Y., Langevin, S. A., Kinney, R. M., Bowen, R. A., Ramey, W. N., . . . Miller, B. R. (2007). A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet*, *39*(9), 1162-1166. doi:10.1038/ng2097
- Brinton, M. A. (2002). The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annual Reviews in Microbiology*, *56*(1), 371-402.
- Brown, A., Bolisetty, S., Whelan, P., Smith, D., & Wheaton, G. (2002). Reappearance of human cases due to Murray Valley encephalitis virus and Kunjin virus in central Australia after an absence of 26 years. *Commun Dis Intell Q Rep*, *26*(1), 39-44.
- Brown, A. N., Kent, K. A., Bennett, C. J., & Bernard, K. A. (2007). Tissue tropism and neuroinvasion of West Nile virus do not differ for two mouse strains with different survival rates. *Virology*, *368*(2), 422-430.
- Burt, F. J., Grobbelaar, A. A., Leman, P. A., Anthony, F. S., Gibson, G. V., & Swanepoel, R. (2002). Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates. *Emerg Infect Dis*, *8*(8), 820-826. doi:10.3201/eid0808.020027
- Busch, M. P., Kleinman, S. H., Tobler, L. H., Kamel, H. T., Norris, P. J., Walsh, I., . . . Caglioti, S. (2008). Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J Infect Dis*, *198*(7), 984-993. doi:10.1086/591467
- Busch, M. P., Wright, D. J., Custer, B., Tobler, L. H., Stramer, S. L., Kleinman, S. H., . . . Petersen, L. R. (2006). West Nile virus infections projected from blood donor screening data, United States, 2003. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(3), 395.
- Butenko, A. M., Semashko, I. V., Skvortsova, T. M., Gromashevskii, V. L., & Kondrashina, N. G. (1986). [Detection of the Koutango virus (Flavivirus, Togaviridae) in Somalia]. *Med Parazitol (Mosk)*(3), 65-68.
- Byk, L. A., Iglesias, N. G., De Maio, F. A., Gebhard, L. G., Rossi, M., & Gamarnik, A. V. (2016). Dengue virus genome uncoating requires ubiquitination. *MBio*, *7*(3), e00804-00816.
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., & Brandt, W. E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*, *70* (Pt 1), 37-43. doi:10.1099/0022-1317-70-1-37
- Calvo, E., & Ribeiro, J. M. (2006). A novel secreted endonuclease from *Culex quinquefasciatus* salivary glands. *Journal of experimental biology*, *209*(14), 2651-2659.

- Campbell, G. L., Ceianu, C. S., & Savage, H. M. (2001). Epidemic West Nile encephalitis in Romania: waiting for history to repeat itself. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951(1), 94-101.
- Cantile, C., Del Piero, F., Di Guardo, G., & Arispici, M. (2001). Pathologic and Immunohistochemical Findings in Naturally Occurring West Nile Virus Infection in Horses. *Veterinary Pathology*, 38(4), 414-431. doi:10.1354/vp.38-4-414
- Cardenas, V. M., Jaime, J., Ford, P. B., Gonzalez, F. J., Carrillo, I., Gallegos, J. E., & Watts, D. M. (2011). Yard flooding by irrigation canals increased the risk of West Nile disease in El Paso, Texas. *Ann Epidemiol*, 21(12), 922-929. doi:10.1016/j.annepidem.2011.08.001
- Centers for Disease Control & Prevention. (2001). Human West Nile virus surveillance--Connecticut, New Jersey, and New York, 2000. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 50(14), 265-268.
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., & Rios, M. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int*, 2015, 376230. doi:10.1155/2015/376230
- Chappell, K. J., Stoermer, M. J., Fairlie, D. P., & Young, P. R. (2008). West Nile Virus NS2B/NS3 protease as an antiviral target. *Curr Med Chem*, 15(27), 2771-2784. doi:10.2174/092986708786242804
- Charrel, R. N., Brault, A. C., Gallian, P., Lemasson, J. J., Murgue, B., Murri, S., . . . de Lamballerie, X. (2003). Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains: Evidence for viral gene flow between africa, the middle east, and europe. *Virology*, 315(2), 381-388. doi:[https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00536-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00536-1)
- Chaskopoulou, A., Dovas, C., Chaintoutis, S., Bouzalas, I., Ara, G., & Papanastassopoulou, M. (2011). Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Eurosurveillance*, 16(31).
- Cheeran, M. C., Hu, S., Sheng, W. S., Rashid, A., Peterson, P. K., & Lokensgard, J. R. (2005). Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection. *Journal of neurovirology*, 11(6), 512-524.
- Chinikar, S., Javadi, A., Ataei, B., Shakeri, H., Moradi, M., Mostafavi, E., & Ghiasi, S. M. (2012). Detection of West Nile virus genome and specific antibodies in Iranian encephalitis patients. *Epidemiol Infect*, 140(8), 1525-1529. doi:10.1017/s0950268811002056
- Chowdhury, P., & Khan, S. A. (2021). Global emergence of West Nile virus: Threat & preparedness in special perspective to India. *Indian J Med Res*, 154(1), 36-50. doi:10.4103/ijmr.IJMR_642_19
- Chowers, M. Y., Lang, R., Nassar, F., Ben-David, D., Giladi, M., Rubinshtein, E., . . . Weinberger, M. (2001). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis*, 7(4), 675-678. doi:10.3201/eid0704.010414
- Chu, J. H., Chiang, C. C., & Ng, M. L. (2007). Immunization of flavivirus West Nile recombinant envelope domain III protein induced specific immune response and protection against West Nile virus infection. *J Immunol*, 178(5), 2699-2705. doi:10.4049/jimmunol.178.5.2699
- Chu, J. J., & Ng, M. L. (2004). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol*, 78(19), 10543-10555. doi:10.1128/jvi.78.19.10543-10555.2004
- Chung, K. M., Liszewski, M. K., Nybakken, G., Davis, A. E., Townsend, R. R., Fremont, D. H., . . . Diamond, M. S. (2006). West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50), 19111-19116.
- Ciccozzi, M., Peletto, S., Cella, E., Giovanetti, M., Lai, A., Gabanelli, E., . . . Zehender, G. (2013). Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infect Genet Evol*, 17, 46-50. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.034

- Colmant, A. M. G., Hall-Mendelin, S., Ritchie, S. A., Bielefeldt-Ohmann, H., Harrison, J. J., Newton, N. D., . . . van den Hurk, A. F. (2018). The recently identified flavivirus Bamaga virus is transmitted horizontally by *Culex* mosquitoes and interferes with West Nile virus replication in vitro and transmission in vivo. *PLoS Negl Trop Dis*, *12*(10), e0006886. doi:10.1371/journal.pntd.0006886
- Colpitts, T. M., Conway, M. J., Montgomery, R. R., & Fikrig, E. (2012). West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clin Microbiol Rev*, *25*(4), 635-648. doi:10.1128/cmr.00045-12
- Cook, R. L., Xu, X., Yablonsky, E. J., Sakata, N., Tripp, J. H., Hess, R., . . . Rinaldo, C. R. (2010). Demographic and clinical factors associated with persistent symptoms after West Nile virus infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *83*(5), 1133.
- Couissinier-Paris, P. (2006). West Nile virus in Europe and Africa: still minor pathogen, or potential threat to public health? *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique (1990)*, *99*(5), 348-354.
- Danecek, P., & Schein, C. (2010). Flavitrack analysis of the structure and function of West Nile non-structural proteins. *International journal of bioinformatics research and applications*, *6*, 134-146. doi:10.1504/IJBRA.2010.032117
- Danis, K., Papa, A., Theocharopoulos, G., Dougas, G., Athanasiou, M., Detsis, M., . . . Bonovas, S. (2011). Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(10), 1868.
- Darwish, M. A., Hoogstraal, H., Roberts, T. J., Ahmed, I. P., & Omar, F. (1983). A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *77*(4), 442-445.
- David, S., & Abraham, A. M. (2016). Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect Dis (Lond)*, *48*(8), 571-586. doi:10.3109/23744235.2016.1164890
- Davis, B. S., Chang, G. J., Cropp, B., Roehrig, J. T., Martin, D. A., Mitchell, C. J., . . . Bunning, M. L. (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol*, *75*(9), 4040-4047. doi:10.1128/jvi.75.9.4040-4047.2001
- Davis, C. T., Ebel, G. D., Lanciotti, R. S., Brault, A. C., Guzman, H., Siirin, M., . . . Barrett, A. D. (2005). Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001-2004: evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology*, *342*(2), 252-265. doi:10.1016/j.virol.2005.07.022
- Davis, C. W., Nguyen, H. Y., Hanna, S. L., Sánchez, M. D., Doms, R. W., & Pierson, T. C. (2006). West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol*, *80*(3), 1290-1301. doi:10.1128/jvi.80.3.1290-1301.2006
- Davis, L. E., DeBiasi, R., Goade, D. E., Haaland, K. Y., Harrington, J. A., Harnar, J. B., . . . Tyler, K. L. (2006). West Nile virus neuroinvasive disease. *Annals of Neurology*, *60*(3), 286-300. doi:<https://doi.org/10.1002/ana.20959>
- Dawson, J. R., Stone, W. B., Ebel, G. D., Young, D. S., Galinski, D. S., Pensabene, J. P., . . . Kramer, L. D. (2007). Crow Deaths Caused by West Nile Virus during Winter. *Emerging Infectious Disease journal*, *13*(12), 1912. doi:10.3201/eid1312.070413
- DeBiasi, R. L., & Tyler, K. L. (2006). West Nile virus meningoencephalitis. *Nature Clinical Practice Neurology*, *2*(5), 264-275. doi:10.1038/ncpneuro0176
- DeGroot, J. P., Sugumaran, R., Brend, S. M., Tucker, B. J., & Bartholomay, L. C. (2008). Landscape, demographic, entomological, and climatic associations with human

- disease incidence of West Nile virus in the state of Iowa, USA. *Int J Health Geogr*, 7, 19. doi:10.1186/1476-072x-7-19
- Diamond, M. S. (2009). Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Res*, 83(3), 214-227. doi:10.1016/j.antiviral.2009.05.006
- Doherty, R. L., Carley, J., Mackerras, M. J., & Marks, E. N. (1963). STUDIES OF ARTHROPOD-BORNE VIRUS INFECTIONS IN QUEENSLAND: III. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF VIRUS STRAINS FROM WILD-CAUGHT MOSQUITOES IN NORTH QUEENSLAND. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 41(1), 17-39.
- Dong, H., Ren, S., Zhang, B., Zhou, Y., Puig-Basagoiti, F., Li, H., & Shi, P. Y. (2008). West Nile virus methyltransferase catalyzes two methylations of the viral RNA cap through a substrate-repositioning mechanism. *J Virol*, 82(9), 4295-4307. doi:10.1128/jvi.02202-07
- Dropulić, B., & Masters, C. L. (1990). Entry of Neurotropic Arboviruses into the Central Nervous System: An In Vitro Study Using Mouse Brain Endothelium. *The Journal of infectious diseases*, 161(4), 685-691. doi:10.1093/infdis/161.4.685
- Durand, B., Dauphin, G., Zeller, H., Labie, J., Schuffenecker, I., Murri, S., . . . Zientara, S. (2005). Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Veterinary Record*, 157(22), 711.
- Ebel, G. D., Carricaburu, J., Young, D., Bernard, K. A., & Kramer, L. D. (2004). Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000-2003. *Am J Trop Med Hyg*, 71(4), 493-500.
- ECDC. (2012). Annual epidemiological report Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>
- ECDC. (2021). Annual epidemiological report for 2019 West Nile virus infection Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-infection-annual-epidemiological-report-2019>
- ECDC. (2023). West Nile virus - infections among humans and outbreaks among equids and/or birds, 11 October 2023. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-infections-among-humans-and-outbreaks-among-equids-and-or-birds-11>
- Edeling, M. A., Diamond, M. S., & Fremont, D. H. (2014). Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(11), 4285-4290. doi:10.1073/pnas.1322036111
- Elizondo-Quiroga, D., & Elizondo-Quiroga, A. (2013). West Nile virus and its theories, a big puzzle in Mexico and Latin America. *Journal of Global Infectious Diseases*, 5(4), 168.
- Errett, J. S., Suthar, M. S., McMillan, A., Diamond, M. S., & Gale, M., Jr. (2013). The essential, nonredundant roles of RIG-I and MDA5 in detecting and controlling West Nile virus infection. *J Virol*, 87(21), 11416-11425. doi:10.1128/jvi.01488-13
- Fall, G., Diallo, M., Loucoubar, C., Faye, O., & Sall, A. A. (2014). Vector Competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for Lineages 1, 2, Koutango and a Putative New Lineage of West Nile Virus. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(4), 747-754. doi:10.4269/ajtmh.13-0405
- Faulde, M. K., Spiesberger, M., & Abbas, B. (2012). Sentinel site-enhanced near-real time surveillance documenting West Nile virus circulation in two *Culex* mosquito species indicating different transmission characteristics, Djibouti City, Djibouti. *J Egypt Soc Parasitol*, 42(2), 461-474. doi:10.12816/0006332
- Fiacre, L., Pagès, N., Albina, E., Richardson, J., Lecollinet, S., & Gonzalez, G. (2020). Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts. *Int J Mol Sci*, 21(23). doi:10.3390/ijms21239117

- Frost, M. J., Zhang, J., Edmonds, J. H., Prow, N. A., Gu, X., Davis, R., . . . Hick, P. (2012). Characterization of virulent west nile virus kunjin strain, australia, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 18(5), 792.
- Garcia-Tapia, D., Hasset, D. E., Mitchell, W. J., Johnson, G. C., & Kleiboeker, S. B. (2007). West Nile virus encephalitis: sequential histopathological and immunological events in a murine model of infection. *Journal of neurovirology*, 13(2), 130-138. doi:10.1080/13550280601187185
- Garcia-Tapia, D., Loiacono, C. M., & Kleiboeker, S. B. (2006). Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 110(3-4), 229-244. doi:10.1016/j.vetimm.2005.10.003
- George, S., Gourie-Devi, M., Rao, J., Prasad, S., & Pavri, K. (1984). Isolation of West Nile virus from the brains of children who had died of encephalitis. *Bulletin of the World Health Organization*, 62(6), 879.
- Girard, Y. A., Klingler, K. A., & Higgs, S. (2004). West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 4(2), 109-122. doi:10.1089/1530366041210729
- Goddard, L. B., Roth, A. E., Reisen, W. K., & Scott, T. W. (2002). Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Infect Dis*, 8(12), 1385-1391. doi:10.3201/eid0812.020536
- Goldblum, N., Sterk, V. V., & Paderski, B. (1954). West Nile fever; the clinical features of the disease and the isolation of West Nile virus from the blood of nine human cases. *Am J Hyg*, 59(1), 89-103.
- Gomes, B., Sousa, C. A., Vicente, J. L., Pinho, L., Calderón, I., Arez, E., . . . Pinto, J. (2013). Feeding patterns of molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization. *Parasit Vectors*, 6, 93. doi:10.1186/1756-3305-6-93
- Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Koonin, E. V., & Blinov, V. M. (1989). N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic acids research*, 17(10), 3889-3897.
- Gossner, C. M., Marrama, L., Carson, M., Allerberger, F., Calistri, P., Dilaveris, D., . . . Gervelmeyer, A. (2017). West Nile virus surveillance in Europe: moving towards an integrated animal-human-vector approach. *Eurosurveillance*, 22(18), 30526. doi:doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.18.30526>
- Gould, L. H., Sui, J., Foellmer, H., Oliphant, T., Wang, T., Ledizet, M., . . . Fikrig, E. (2005). Protective and therapeutic capacity of human single-chain Fv-Fc fusion proteins against West Nile virus. *J Virol*, 79(23), 14606-14613. doi:10.1128/jvi.79.23.14606-14613.2005
- Gray, T. J., & Webb, C. E. (2014). A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Int J Gen Med*, 7, 193-203. doi:10.2147/ijgm.S59902
- Gyure, K. A. (2009). West Nile virus infections. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(10), 1053-1060. doi:10.1097/NEN.0b013e3181b88114
- Habarugira, G., Moran, J., Colmant, A. M. G., Davis, S. S., O'Brien, C. A., Hall-Mendelin, S., . . . Bielefeldt-Ohmann, H. (2020). Mosquito-Independent Transmission of West Nile virus in Farmed Saltwater Crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Viruses*, 12(2), 198. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/2/198>
- Habarugira, G., Suen, W. W., Hobson-Peters, J., Hall, R. A., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2020). West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and "One Health" Implications. *Pathogens*, 9(7). doi:10.3390/pathogens9070589
- Haley, M., Retter, A. S., Fowler, D., Gea-Banacloche, J., & O'Grady, N. P. (2003). The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis. *Clin Infect Dis*, 37(6), e88-90. doi:10.1086/377172

- Hall, R. A., Scherret, J. H., & Mackenzie, J. S. (2001). Kunjin virus: an Australian variant of West Nile? *Ann N Y Acad Sci*, *951*, 153-160.
- Hall, R. A., Tan, S. E., Selisko, B., Slade, R., Hobson-Peters, J., Canard, B., . . . Khromykh, A. A. (2009). Monoclonal antibodies to the West Nile virus NS5 protein map to linear and conformational epitopes in the methyltransferase and polymerase domains. *J Gen Virol*, *90*(Pt 12), 2912-2922. doi:10.1099/vir.0.013805-0
- Hamer, G. L., Kitron, U. D., Goldberg, T. L., Brawn, J. D., Loss, S. R., Ruiz, M. O., . . . Walker, E. D. (2009). Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and West Nile virus amplification. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *80*(2), 268-278.
- Hayes, C. G. (2019). West Nile fever. In *The arboviruses: epidemiology and ecology* (pp. 59-88): CRC Press.
- Hayes, E. B., Komar, N., Nasci, R. S., Montgomery, S. P., O'Leary, D. R., & Campbell, G. L. (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis*, *11*(8), 1167-1173. doi:10.3201/eid1108.050289a
- Hayes, E. B., & O'Leary, D. R. (2004). West Nile virus infection: a pediatric perspective. *Pediatrics*, *113*(5), 1375-1381.
- Hayes, E. B., Sejvar, J. J., Zaki, S. R., Lanciotti, R. S., Bode, A. V., & Campbell, G. L. (2005). Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(8), 1174.
- Heinz, F., & Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology*, *55*(4), 289-295.
- Ho, L.-J., Wang, J.-J., Shaio, M.-F., Kao, C.-L., Chang, D.-M., Han, S.-W., & Lai, J.-H. (2001). Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *The Journal of Immunology*, *166*(3), 1499-1506.
- Huang, C., Slater, B., Rudd, R., Parchuri, N., Hull, R., Dupuis, M., & Hindenburg, A. (2002). First Isolation of West Nile virus from a patient with encephalitis in the United States. *Emerg Infect Dis*, *8*(12), 1367-1371. doi:10.3201/eid0812.020532
- Hubálek, Z., & Halouzka, J. (1999). West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*, *5*(5), 643-650. doi:10.3201/eid0505.990505
- Hubálek, Z., Wegner, E., Halouzka, J., Tryjanowski, P., Jerzak, L., Sikutová, S., . . . Włodarczyk, R. (2008). Serologic Survey of Potential Vertebrate Hosts for West Nile Virus in Poland. *Viral immunology*, *21*, 247-253. doi:10.1089/vim.2007.0111
- Hudson, A., Bowman, L., & Orr, C. (1960). Effects of absence of saliva on blood feeding by mosquitoes. *Science*, *131*(3415), 1730-1731.
- Hunsperger, E. A., McElroy, K. L., Bessoff, K., Colón, C., Barrera, R., & Muñoz-Jordán, J. L. (2009). West Nile virus from blood donors, vertebrates, and mosquitoes, Puerto Rico, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(8), 1298.
- Hunsperger, E. A., & Roehrig, J. T. (2006). Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice. *Journal of neurovirology*, *12*(2), 129-139.
- Hurlbut, H. S., Rizk, F., Taylor, R. M., & Work, T. H. (1956). A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg*, *5*(4), 579-620. doi:10.4269/ajtmh.1956.5.579
- Isberg, S. R., Moran, J. L., De Araujo, R., Elliott, N., Davis, S. S., & Melville, L. (2019). First evidence of Kunjin strain of West Nile virus associated with saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) skin lesions. *Aust Vet J*, *97*(10), 390-393. doi:10.1111/avj.12862
- Iwamoto, M., Jernigan, D. B., Guasch, A., Trepka, M. J., Blackmore, C. G., Hellinger, W. C., . . . Petersen, L. R. (2003). Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med*, *348*(22), 2196-2203. doi:10.1056/NEJMoa022987

- Jentes, E. S., Robinson, J., Johnson, B. W., Conde, I., Sakouvougui, Y., Iverson, J., . . . Bryan, J. (2010). Acute arboviral infections in Guinea, West Africa, 2006. *Am J Trop Med Hyg*, *83*(2), 388-394. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0688
- Jia, X.-Y., Briese, T., Jordan, I., Rambaut, A., Chi, H. C., Mackenzie, J. S., . . . Lipkin, W. I. (1999). Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *The Lancet*, *354*(9194), 1971-1972.
- Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., & Smith, D. R. (2004). Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*, *149*(5), 915-927. doi:10.1007/s00705-003-0263-x
- Jones, C. T., Ma, L., Burgner, J. W., Groesch, T. D., Post, C. B., & Kuhn, R. J. (2003). Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *Journal of virology*, *77*(12), 7143-7149.
- Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J. Y.-N., & Lipkin, W. I. (2000). Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *The Journal of infectious diseases*, *182*(4), 1214-1217.
- Jupp, P. G. (2001). The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. *Ann N Y Acad Sci*, *951*, 143-152. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb02692.x
- Kalaycioglu, H., Korukluoglu, G., Ozkul, A., Oncul, O., Tosun, S., Karabay, O., . . . Ertek, M. (2012). Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Eurosurveillance*, *17*(21), 20182. doi:doi:<https://doi.org/10.2807/ese.17.21.20182-en>
- Kalil, A. C., Devetten, M. P., Singh, S., Lesiak, B., Poage, D. P., Bargaquast, K., . . . Freifeld, A. G. (2005). Use of interferon-alpha in patients with West Nile encephalitis: report of 2 cases. *Clin Infect Dis*, *40*(5), 764-766. doi:10.1086/427945
- Kato, N., Mueller, C. R., Fuchs, J. F., McElroy, K., Wessely, V., Higgs, S., & Christensen, B. M. (2008). Evaluation of the function of a type I peritrophic matrix as a physical barrier for midgut epithelium invasion by mosquito-borne pathogens in *Aedes aegypti*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *8*(5), 701-712. doi:10.1089/vbz.2007.0270
- Khan, S. A., Dutta, P., Chowdhury, P., Borah, J., Topno, R., & Mahanta, J. (2011). Co-infection of arboviruses presenting as Acute Encephalitis Syndrome. *Journal of Clinical Virology*, *51*(1), 5.
- Khan, S. A., Dutta, P., Khan, A. M., Chowdhury, P., Borah, J., Doloi, P., & Mahanta, J. (2011). West Nile virus infection, Assam, India. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(5), 947.
- Kilpatrick, A. M., LaDeau, S. L., & Marra, P. P. (2007). Ecology of West Nile Virus Transmission and its Impact on Birds in the Western Hemisphere. *The Auk*, *124*(4), 1121-1136. doi:10.1093/auk/124.4.1121
- Kilpatrick, A. M., Meola, M. A., Moudy, R. M., & Kramer, L. D. (2008). Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog*, *4*(6), e1000092. doi:10.1371/journal.ppat.1000092
- Klein, C., Kimiagar, I., Pollak, L., Gandelman-Marton, R., Itzhaki, A., Milo, R., & Rabey, J. (2002). Neurological features of West Nile virus infection during the 2000 outbreak in a regional hospital in Israel. *Journal of the neurological sciences*, *200*(1-2), 63-66.
- Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Marder, B. A., Levi, M. E., Laird, S. P., McNutt, J. T., Escott, E. J., . . . Tyler, K. L. (2004). Naturally acquired West Nile virus encephalomyelitis in transplant recipients: clinical, laboratory, diagnostic, and neuropathological features. *Arch Neurol*, *61*(8), 1210-1220. doi:10.1001/archneur.61.8.1210
- Klenk, K., & Komar, N. (2003). Poor replication of West Nile virus (New York 1999 strain) in three reptilian and one amphibian species. *Am J Trop Med Hyg*, *69*(3), 260-262.
- Klenk, K., Snow, J., Morgan, K., Bowen, R., Stephens, M., Foster, F., . . . Bunning, M. (2004). Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis*, *10*(12), 2150-2155. doi:10.3201/eid1012.040264

- Koblischke, M., Spitzer, F. S., Florian, D. M., Aberle, S. W., Malafa, S., Fae, I., . . . Aberle, J. H. (2020). CD4 T Cell Determinants in West Nile Virus Disease and Asymptomatic Infection. *Frontiers in Immunology*, *11*. doi:10.3389/fimmu.2020.00016
- Kokernot, R. H., Smithburn, K. C., & Weinbren, M. P. (1956). Neutralizing antibodies to arthropod-borne viruses in human beings and animals in the Union of South Africa. *J Immunol*, *77*(5), 313-323.
- Komar, N., & Clark, G. G. (2006). West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Publica*, *19*(2), 112-117.
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., . . . Bunning, M. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis*, *9*(3), 311-322. doi:10.3201/eid0903.020628
- Komar, N., Panella, N. A., Langevin, S. A., Brault, A. C., Amador, M., Edwards, E., & Owen, J. C. (2005). Avian hosts for West Nile virus in St. Tammany Parish, Louisiana, 2002. *Am J Trop Med Hyg*, *73*(6), 1031-1037.
- Konishi, E., & Mason, P. W. (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol*, *67*(3), 1672-1675. doi:10.1128/jvi.67.3.1672-1675.1993
- Kostiukov, M. A., Gordeeva, Z. E., Bulychev, V. P., Nemova, N. V., & Daniiarov, O. A. (1985). [The lake frog (*Rana ridibunda*)--one of the food hosts of blood-sucking mosquitoes in Tadzhikistan--a reservoir of the West Nile fever virus]. *Med Parazitol (Mosk)*(3), 49-50.
- Kramer-Hämmerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J. E., & Brack-Werner, R. (2005). Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus research*, *111*(2), 194-213.
- Kramer, L. D., Ciota, A. T., & Kilpatrick, A. M. (2019). Introduction, spread, and establishment of West Nile virus in the Americas. *Journal of medical entomology*, *56*(6), 1448-1455.
- Kramer, L. D., Styer, L. M., & Ebel, G. D. (2008). A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol*, *53*, 61-81. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093258
- Krisztalovics, K., Ferenczi, E., Molnar, Z., Csohan, A., Ban, E., Zöldi, V., & Kaszas, K. (2008). West Nile virus infections in Hungary, August–September 2008. *Eurosurveillance*, *13*(45), 19030.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., . . . Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, *108*(5), 717-725. doi:10.1016/s0092-8674(02)00660-8
- Kumar, P., Lee, S. K., Shankar, P., & Manjunath, N. (2006). A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses. *PLoS Med*, *3*(4), e96. doi:10.1371/journal.pmed.0030096
- Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol*, *72*(1), 73-83. doi:10.1128/jvi.72.1.73-83.1998
- Ladbury, G. A., Gavana, M., Danis, K., Papa, A., Papamichail, D., Mourelatos, S., . . . Benos, A. (2013). Population seroprevalence study after a West Nile virus lineage 2 epidemic, Greece, 2010. *PLoS One*, *8*(11), e80432.
- LaDeau, S. L., Kilpatrick, A. M., & Marra, P. P. (2007). West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature*, *447*(7145), 710-713. doi:10.1038/nature05829
- Lan, D., Ji, W., Yu, D., Chu, J., Wang, C., Yang, Z., & Hua, X. (2011). Serological evidence of West Nile virus in dogs and cats in China. *Archives of virology*, *156*, 893-895.
- Lanciotti, R. S., Ebel, G. D., Deubel, V., Kerst, A. J., Murri, S., Meyer, R., . . . Roehrig, J. T. (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus

- strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, 298(1), 96-105. doi:10.1006/viro.2002.1449
- Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., . . . Gubler, D. J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*, 286(5448), 2333-2337. doi:10.1126/science.286.5448.2333
- Larrieu, S., Cardinale, E., Ocquidant, P., Roger, M., Lepec, R., Delatte, H., . . . Michault, A. (2013). A fatal neuroinvasive West Nile virus infection in a traveler returning from Madagascar: clinical, epidemiological and veterinary investigations. *Am J Trop Med Hyg*, 89(2), 211-213. doi:10.4269/ajtmh.12-0003
- Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J. M., & Khromykh, A. A. (2008). Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of virology*, 82(10), 4731-4741.
- Leyssen, P., Balzarini, J., De Clercq, E., & Neyts, J. (2005). The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J Virol*, 79(3), 1943-1947. doi:10.1128/jvi.79.3.1943-1947.2005
- Li, F., Wang, Y., Yu, L., Cao, S., Wang, K., Yuan, J., . . . Fu, Z. F. (2015). Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. *J Virol*, 89(10), 5602-5614. doi:10.1128/jvi.00143-15
- Li, K., Phoo, W. W., & Luo, D. (2014). Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors. *Virol Sin*, 29(2), 74-85. doi:10.1007/s12250-014-3438-6
- Li, S., Roupael, N., Duraisingham, S., Romero-Steiner, S., Presnell, S., Davis, C., . . . Pulendran, B. (2014). Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. *Nat Immunol*, 15(2), 195-204. doi:10.1038/ni.2789
- Li, X.-L., Fu, S.-H., Liu, W.-B., Wang, H.-Y., Lu, Z., Tong, S.-X., . . . Cui, Y. (2013). West Nile virus infection in Xinjiang, China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(2), 131-133.
- Liao, M., Sánchez-San Martín, C., Zheng, A., & Kielian, M. (2010). In vitro reconstitution reveals key intermediate states of trimer formation by the dengue virus membrane fusion protein. *J Virol*, 84(11), 5730-5740. doi:10.1128/jvi.00170-10
- Lieberman, M. M., Clements, D. E., Ogata, S., Wang, G., Corpuz, G., Wong, T., . . . Weeks-Levy, C. (2007). Preparation and immunogenic properties of a recombinant West Nile subunit vaccine. *Vaccine*, 25(3), 414-423. doi:10.1016/j.vaccine.2006.08.018
- Lim, J. K., McDermott, D. H., Lisco, A., Foster, G. A., Krysztof, D., Follmann, D., . . . Murphy, P. M. (2010). CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection but not for viral transmission. *J Infect Dis*, 201(2), 178-185. doi:10.1086/649426
- Lim, P. Y., Behr, M. J., Chadwick, C. M., Shi, P. Y., & Bernard, K. A. (2011). Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. *J Virol*, 85(10), 5197-5201. doi:10.1128/jvi.02692-10
- Lim, S. M., Koraka, P., Osterhaus, A. D. M. E., & Martina, B. E. E. (2011). West Nile Virus: Immunity and Pathogenesis. *Viruses*, 3(6), 811-828. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1999-4915/3/6/811>
- Lindsey, N. P., Staples, J. E., Lehman, J. A., & Fischer, M. (2012). Medical risk factors for severe West Nile Virus disease, United States, 2008-2010. *Am J Trop Med Hyg*, 87(1), 179-184. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0113
- Linke, S., Niedrig, M., Kaiser, A., Ellerbrok, H., Müller, K., Müller, T., . . . Pauli, G. (2007). Serologic evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. *Am J Trop Med Hyg*, 77(2), 358-364.

- Loeb, M., Eskandarian, S., Rupp, M., Fishman, N., Gasink, L., Patterson, J., . . . Lemire, M. (2011). Genetic variants and susceptibility to neurological complications following West Nile virus infection. *J Infect Dis*, 204(7), 1031-1037. doi:10.1093/infdis/jir493
- Loeb, M., Hanna, S., Nicolle, L., Eyles, J., Elliott, S., Rathbone, M., . . . Mahony, J. (2008). Prognosis after West Nile virus infection. *Annals of internal medicine*, 149(4), 232-241.
- Lohitharajah, J., Malavige, G. N., Chua, A. J. S., Ng, M. L., Arambepola, C., & Chang, T. (2015). Emergence of human west nile virus infection in Sri Lanka. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 1-6.
- Londono-Renteria, B., & Colpitts, T. M. (2016). A brief review of West Nile virus biology. *West Nile Virus: Methods and Protocols*, 1-13.
- López-Denman, A. J., Tuipulotu, D. E., Ross, J. B., Trenerry, A. M., White, P. A., & Mackenzie, J. M. (2021). Nuclear localisation of West Nile virus NS5 protein modulates host gene expression. *Virology*, 559, 131-144. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.03.018>
- Lothrop, H. D., Lothrop, B. B., Goms, D. E., & Reisen, W. K. (2008). Intensive early season adulticide applications decrease arbovirus transmission throughout the Coachella Valley, Riverside County, California. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8(4), 475-489. doi:10.1089/vbz.2007.0238
- Lvov, D. K., Butenko, A. M., Gromashevsky, V. L., Kovtunov, A. I., Prilipov, A. G., Kinney, R., . . . Voronina, A. G. (2004). West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. In C. H. Calisher & D. E. Griffin (Eds.), *Emergence and Control of Zoonotic Viral Encephalitides* (pp. 85-96). Vienna: Springer Vienna.
- Macdonald, J., Tonry, J., Hall, R. A., Williams, B., Palacios, G., Ashok, M. S., . . . Briese, T. (2005). NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. *Journal of virology*, 79(22), 13924-13933.
- Macedo, P. A., Schleier, J. J., 3rd, Reed, M., Kelley, K., Goodman, G. W., Brown, D. A., & Peterson, R. K. (2010). Evaluation of efficacy and human health risk of aerial ultra-low volume applications of pyrethrins and piperonyl butoxide for adult mosquito management in response to West Nile virus activity in Sacramento County, California. *J Am Mosq Control Assoc*, 26(1), 57-66. doi:10.2987/09-5961.1
- Mackenzie, J., Lindsay, M., Coelen, R., Broom, A., Hall, R., & Smith, D. (1994). Arboviruses causing human disease in the Australasian zoogeographic region. *Archives of virology*, 136, 447-467.
- Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Jones, M. K., & Westaway, E. G. (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*, 245(2), 203-215. doi:10.1006/viro.1998.9156
- Maharaj, P. D., Langevin, S. A., Bolling, B. G., Andrade, C. C., Engle, X. A., Ramey, W. N., . . . Huang, C. Y.-H. (2019). N-linked glycosylation of the West Nile virus envelope protein is not a requisite for avian virulence or vector competence. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(7), e0007473.
- Mandalakas, A. M., Kippes, C., Sedransk, J., Kile, J. R., Garg, A., McLeod, J., . . . Marfin, A. A. (2005). West Nile virus epidemic, northeast Ohio, 2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(11), 1774.
- Mandl, C. W., Guirakhoo, F., Holzmann, H., Heinz, F. X., & Kunz, C. (1989). Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *J Virol*, 63(2), 564-571. doi:10.1128/jvi.63.2.564-571.1989
- Mann, R. A., Fegan, M., O'Riley, K., Motha, J., & Warner, S. (2013). Molecular characterization and phylogenetic analysis of Murray Valley encephalitis virus and West Nile virus (Kunjin subtype) from an arbovirus disease outbreak in horses in

- Victoria, Australia, in 2011. *J Vet Diagn Invest*, 25(1), 35-44.
doi:10.1177/1040638712467985
- Martín-Acebes, M. A., & Saiz, J. C. (2012). West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World J Virol*, 1(2), 51-70. doi:10.5501/wjv.v1.i2.51
- A. S., Carvalho, F. A., Faustino, A. F., Martins, I. C., & Santos, N. C. (2019). West Nile Virus Capsid Protein Interacts With Biologically Relevant Host Lipid Systems. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. doi:10.3389/fcimb.2019.00008
- Martins, I. C., Gomes-Neto, F., Faustino, A. F., Carvalho, F. A., Carneiro, F. A., Bozza, P. T., . . . Santos, N. C. (2012). The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *Biochemical Journal*, 444(3), 405-415.
- Maximova, O. A., Bernbaum, J. G., & Pletnev, A. G. (2016). West Nile Virus Spreads Transsynaptically within the Pathways of Motor Control: Anatomical and Ultrastructural Mapping of Neuronal Virus Infection in the Primate Central Nervous System. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(9), e0004980. doi:10.1371/journal.pntd.0004980
- May, F. J., Davis, C. T., Tesh, R. B., & Barrett, A. D. (2011). Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol*, 85(6), 2964-2974. doi:10.1128/jvi.01963-10
- McIntosh, B., Jupp, P., Dos Santos, I., & Meenehan, G. (1976). Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) univittatus* Theobald as vector. *South African Journal of Science*, 72(10), 295-300.
- McLean, R. G., Ubico, S. R., Bourne, D., & Komar, N. (2002). West Nile Virus in Livestock and Wildlife. In J. S. Mackenzie, A. D. T. Barrett, & V. Deubel (Eds.), *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses* (pp. 271-308). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- McMullen, A. R., Albayrak, H., May, F. J., Davis, C. T., Beasley, D. W. C., & Barrett, A. D. T. (2013). Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *J Gen Virol*, 94(Pt 2), 318-325. doi:10.1099/vir.0.046888-0
- Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y., & Tuschl, T. (2004). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna*, 10(3), 544-550. doi:10.1261/rna.5235104
- Melian, E. B., Hinzman, E., Nagasaki, T., Firth, A. E., Wills, N. M., Nouwens, A. S., . . . Atkins, J. F. (2010). NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. *Journal of virology*, 84(3), 1641-1647.
- Merdić, E., Perić, L., Pendak, N., Kurolt, I. C., Sudarić Bogojević, M., & Markotić, A. (2013). West Nile virus outbreak in humans in Croatia, 2012. *Collegium antropologicum*, 37(3), 943-947.
- Meyer, T. E., Bull, L. M., Cain Holmes, K., Pascua, R. F., Travassos da Rosa, A., Gutierrez, C. R., . . . Murray, K. O. (2007). West Nile virus infection among the homeless, Houston, Texas. *Emerg Infect Dis*, 13(10), 1500-1503. doi:10.3201/eid1310.070442
- Miller, B. R., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Savage, H. M., Lutwama, J. J., Lanciotti, R. S., & Peters, C. J. (2000). First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 62(2), 240-246. doi:10.4269/ajtmh.2000.62.240
- Miller, D. L., Mauel, M. J., Baldwin, C., Burtle, G., Ingram, D., Hines, M. E., 2nd, & Frazier, K. S. (2003). West Nile virus in farmed alligators. *Emerg Infect Dis*, 9(7), 794-799. doi:10.3201/eid0907.030085
- Minke, J. M., Siger, L., Karaca, K., Austgen, L., Gordy, P., Bowen, R., . . . Nordgren, B. (2004). Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Arch Virol Suppl*(18), 221-230. doi:10.1007/978-3-7091-0572-6_20

- Monath, T., Cropp, C., & Harrison, A. (1983). Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 48(4), 399-410.
- Monath, T. P., Liu, J., Kanasa-Thanan, N., Myers, G. A., Nichols, R., Deary, A., . . . Bedford, P. (2006). A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6694-6699.
doi:doi:10.1073/pnas.0601932103
- Montgomery, R. R., & Murray, K. O. (2015). Risk factors for West Nile virus infection and disease in populations and individuals. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(3), 317-325.
- Morgan, D. (2006). Control of arbovirus infections by a coordinated response: West Nile Virus in England and Wales. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(3), 305-312.
- Morrey, J. D., Day, C. W., Julander, J. G., Blatt, L. M., Smee, D. F., & Sidwell, R. W. (2004). Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir Chem Chemother*, 15(2), 101-109.
doi:10.1177/095632020401500202
- Mostashari, F., Bunning, M. L., Kitsutani, P. T., Singer, D. A., Nash, D., Cooper, M. J., . . . Fine, A. D. (2001). Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *The Lancet*, 358(9278), 261-264.
- Moudy, R. M., Meola, M. A., Morin, L.-L. L., Ebel, G. D., & Kramer, L. D. (2007). A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by *Culex* mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(2), 365-370.
- Mukhopadhyay, S., Kim, B. S., Chipman, P. R., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2003). Structure of West Nile virus. *Science*, 302(5643), 248. doi:10.1126/science.1089316
- Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral research*, 98(2), 192-208.
- Murgue, B., Murri, S., Triki, H., Deubel, V., & Zeller, H. (2001). West nile in the mediterranean basin: 1950-2000. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951(1), 117-126.
- Murray, K., Baraniuk, S., Resnick, M., Arafat, R., Kilborn, C., Cain, K., . . . Hellums, J. (2006). Risk factors for encephalitis and death from West Nile virus infection. *Epidemiology & Infection*, 134(6), 1325-1332.
- Murray, K., Walker, C., & Gould, E. (2011). The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. *Epidemiology & Infection*, 139(6), 807-817.
- Murray, K. O., Mertens, E., & Desprès, P. (2010). West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Veterinary research*, 41(6).
- Napoli, C., Bella, A., Declich, S., Grazzini, G., Lombardini, L., Nanni Costa, A., . . . Russo, F. (2013). Integrated human surveillance systems of West Nile virus infections in Italy: the 2012 experience. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 7180-7192.
- Nathanson, N. (1980). Slow viruses and chronic disease: the contribution of epidemiology. *Public Health Reports*, 95(5), 436.
- Nevarez, J. G., Mitchell, M. A., Kim, D. Y., Poston, R., & Lampinen, H. M. (2005). West Nile virus in alligator, *Alligator mississippiensis*, ranches from Louisiana. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 15(3), 4-9.
- Ng, T., Hathaway, D., Jennings, N., Champ, D., Chiang, Y. W., & Chu, H. J. (2003). Equine vaccine for West Nile virus. *Dev Biol (Basel)*, 114, 221-227.

- Nolan, M. S., Podoll, A. S., Hause, A. M., Akers, K. M., Finkel, K. W., & Murray, K. O. (2012). Prevalence of chronic kidney disease and progression of disease over time among patients enrolled in the Houston West Nile virus cohort. *PLoS One*, *7*(7), e40374.
- Nolan, M. S., Zangeneh, A., Khuwaja, S. A., Martinez, D., Rossmann, S. N., Cardenas, V., & Murray, K. O. (2012). Proximity of residence to bodies of water and risk for west nile virus infection: a case-control study in Houston, Texas. *J Biomed Biotechnol*, *2012*, 159578. doi:10.1155/2012/159578
- Ochieng, C., Lutomiah, J., Makio, A., Koka, H., Chepkorir, E., Yalwala, S., . . . Sang, R. (2013). Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007 – 2012. *Virology journal*, *10*(1), 140. doi:10.1186/1743-422X-10-140
- Oh, W., Yang, M.-R., Lee, E.-W., Park, K.-m., Pyo, S., Yang, J.-s., . . . Song, J. (2006). Jab1 mediates cytoplasmic localization and degradation of West Nile virus capsid protein. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 30166-30174.
- Orshan, L., Bin, H., Schnur, H., Kaufman, A., Valinsky, A., Shulman, L., . . . Pener, H. (2008). Mosquito vectors of West Nile Fever in Israel. *J Med Entomol*, *45*(5), 939-947. doi:10.1603/0022-2585(2008)45[939:mvownf]2.0.co;2
- Pachler, K., Lebl, K., Berer, D., Rudolf, I., Hubalek, Z., & Nowotny, N. (2014). Putative New West Nile Virus Lineage in *Uranotaenia unguiculata* Mosquitoes, Austria, 2013. *Emerging Infectious Disease journal*, *20*(12), 2119. doi:10.3201/eid2012.140921
- Panthier, R. (1968). [Epidemiology of the West Nile virus: study of an outbreak in Camargue. I. Introduction]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, *114*(4), 518-520.
- Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., & Nowotny, N. (2011). Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(5), 920.
- Papa, A., Danis, K., Baka, A., Bakas, A., Dougas, G., Lytras, T., . . . Kamaria, F. (2010). Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July–August 2010. *Eurosurveillance*, *15*(34), 19644.
- Papa, A., Politis, C., Tsoukala, A., Eglezou, A., Bakaloudi, V., Hatzitaki, M., & Tsergouli, K. (2012). West Nile virus lineage 2 from blood donor, Greece. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(4), 688.
- Papa, A., Xanthopoulou, K., Gewehr, S., & Mourelatos, S. (2011). Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(8), 1176-1180.
- Paramasivan, R., Mishra, A. C., & Mourya, D. T. (2003). West Nile virus: the Indian scenario. *Indian J Med Res*, *118*, 101-108.
- Paz, S., Malkinson, D., Green, M. S., Tsioni, G., Papa, A., Danis, K., . . . Ferenczi, E. (2013). Permissive summer temperatures of the 2010 European West Nile fever upsurge. *PLoS One*, *8*(2), e56398.
- Paz, S., & Semenza, J. C. (2013). Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia--a review. *Int J Environ Res Public Health*, *10*(8), 3543-3562. doi:10.3390/ijerph10083543
- Pealer, L. N., Marfin, A. A., Petersen, L. R., Lanciotti, R. S., Page, P. L., Stramer, S. L., . . . Chamberland, M. E. (2003). Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med*, *349*(13), 1236-1245. doi:10.1056/NEJMoa030969
- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., & Amara, A. (2013). Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses*, *6*(1), 69-88.
- Petersen, L. R., Brault, A. C., & Nasci, R. S. (2013). West Nile virus: review of the literature. *Jama*, *310*(3), 308-315. doi:10.1001/jama.2013.8042

- Philip, C., & Smadel, J. (1943). Transmission of West Nile virus by infected *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 53(1), 49-50.
- Pisani, G., Cristiano, K., Pupella, S., & Liumbruno, G. M. (2016). West Nile Virus in Europe and Safety of Blood Transfusion. *Transfus Med Hemother*, 43(3), 158-167. doi:10.1159/000446219
- Platonov, A. E., Shipulin, G. A., Shipulina, O. Y., Tyutyunnik, E. N., Frolochkina, T. I., Lanciotti, R. S., . . . Zhukov, A. N. (2001). Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 128.
- Platt, K. B., Tucker, B. J., Halbur, P. G., Blitvich, B. J., Fabiosa, F. G., Mullin, K., . . . Rowley, W. A. (2008). Fox squirrels (*Sciurus niger*) develop West Nile virus viremias sufficient for infecting select mosquito species. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8(2), 225-233. doi:10.1089/vbz.2007.0182
- Pletnev, A. G., Claire, M. S., Elkins, R., Speicher, J., Murphy, B. R., & Chanock, R. M. (2003). Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. *Virology*, 314(1), 190-195. doi:10.1016/s0042-6822(03)00450-1
- Prow, N. A. (2013). The changing epidemiology of Kunjin virus in Australia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6255-6272.
- Prow, N. A., Edmonds, J. H., Williams, D. T., Setoh, Y. X., Bielefeldt-Ohmann, H., Suen, W. W., . . . Hall, R. A. (2016). Virulence and Evolution of West Nile Virus, Australia, 1960-2012. *Emerg Infect Dis*, 22(8), 1353-1362. doi:10.3201/eid2208.151719
- Prow, N. A., Setoh, Y. X., Biron, R. M., Sester, D. P., Kim, K. S., Hobson-Peters, J., . . . Bielefeldt-Ohmann, H. (2014). The West Nile virus-like flavivirus Koutango is highly virulent in mice due to delayed viral clearance and the induction of a poor neutralizing antibody response. *J Virol*, 88(17), 9947-9962. doi:10.1128/jvi.01304-14
- Qian, F., Goel, G., Meng, H., Wang, X., You, F., Devine, L., . . . Montgomery, R. R. (2015). Systems immunology reveals markers of susceptibility to West Nile virus infection. *Clin Vaccine Immunol*, 22(1), 6-16. doi:10.1128/cvi.00508-14
- Qian, F., Wang, X., Zhang, L., Lin, A., Zhao, H., Fikrig, E., & Montgomery, R. R. (2011). Impaired interferon signaling in dendritic cells from older donors infected in vitro with West Nile virus. *J Infect Dis*, 203(10), 1415-1424. doi:10.1093/infdis/jir048
- Racsa, L., Gander, R., Chung, W., Southern, P., Le, J., Beal, S., . . . Alatoon, A. (2014). Clinical features of West Nile virus epidemic in Dallas, Texas, 2012. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78(2), 132-136. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.006
- Rao, T. R. (1971). Immunological surveys of arbovirus infections in South-East Asia, with special reference to dengue, chikungunya, and Kyasanur Forest disease. *Bulletin of the World Health Organization*, 44(5), 585.
- Rappole, J. H., & Hubálek, Z. (2003). Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol*, 94 Suppl, 47s-58s. doi:10.1046/j.1365-2672.94.s1.6.x
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology journal*, 13, 1-10.
- Ratterree, M. S., Gutierrez, R. A., Travassos da Rosa, A. P., Dille, B. J., Beasley, D. W., Bohm, R. P., . . . Tesh, R. B. (2004). Experimental infection of rhesus macaques with West Nile virus: level and duration of viremia and kinetics of the antibody response after infection. *J Infect Dis*, 189(4), 669-676. doi:10.1086/381461
- Reisen, W. K., Fang, Y., & Martinez, V. M. (2005). Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol*, 42(3), 367-375. doi:10.1093/jmedent/42.3.367

- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, *375*(6529), 291-298.
- Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., & Del Angel, R. M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol*, *79*(8), 4557-4567. doi:10.1128/jvi.79.8.4557-4567.2005
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., . . . Cassone, A. (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, *370*, 1840-1846.
- Ribeiro, J., Rossignol, P., & Spielman, A. (1985). *Aedes aegypti*: model for blood finding strategy and prediction of parasite manipulation. *Experimental parasitology*, *60*(1), 118-132.
- Rios, M., Zhang, M. J., Grinev, A., Srinivasan, K., Daniel, S., Wood, O., . . . Dayton, A. I. (2006). Monocytes-macrophages are a potential target in human infection with West Nile virus through blood transfusion. *Transfusion*, *46*(4), 659-667.
- Rizzoli, A., Jimenez-Clavero, M. A., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., . . . Tenorio, A. (2015). The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Euro Surveill*, *20*(20). doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.20.21135
- Roosendaal, J., Westaway, E. G., Khromykh, A., & Mackenzie, J. M. (2006). Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol*, *80*(9), 4623-4632. doi:10.1128/jvi.80.9.4623-4632.2006
- Rossi, S. L., Ross, T. M., & Evans, J. D. (2010). West Nile virus. *Clin Lab Med*, *30*(1), 47-65. doi:10.1016/j.cll.2009.10.006
- Ruan, Q., Qian, F., & Yu, Z. (2014). Effects of polymorphisms in immunity-related genes on the immune system and successful aging. *Curr Opin Immunol*, *29*, 49-55. doi:10.1016/j.coi.2014.04.003
- Russell, R. C., & Dwyer, D. E. (2000). Arboviruses associated with human disease in Australia. *Microbes and Infection*, *2*(14), 1693-1704.
- Saiz, J. C., Martín-Acebes, M. A., Blázquez, A. B., Escribano-Romero, E., Poderoso, T., & Jiménez de Oya, N. (2021). Pathogenicity and virulence of West Nile virus revisited eight decades after its first isolation. *Virulence*, *12*(1), 1145-1173. doi:10.1080/21505594.2021.1908740
- Sambri, V., Capobianchi, M., Charrel, R., Fyodorova, M., Gaibani, P., Gould, E., . . . Landini, M. P. (2013). West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(8), 699-704. doi:<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12211>
- Samina, I., Khinich, Y., Simanov, M., & Malkinson, M. (2005). An inactivated West Nile virus vaccine for domestic geese—efficacy study and a summary of 4 years of field application. *Vaccine*, *23*(41), 4955-4958. doi:10.1016/j.vaccine.2005.03.052
- Samuel, M. A., & Diamond, M. S. (2005). Alpha/Beta Interferon Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Restricting Cellular Tropism and Enhancing Neuronal Survival. *Journal of virology*, *79*(21), 13350-13361. doi:doi:10.1128/jvi.79.21.13350-13361.2005
- Samuel, M. A., Wang, H., Siddharthan, V., Morrey, J. D., & Diamond, M. S. (2007). Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(43), 17140-17145. doi:10.1073/pnas.0705837104

- Scherret, J. H., Mackenzie, J. S., Hall, R. A., Deubel, V., & Gould, E. A. (2002). Phylogeny and Molecular Epidemiology of West Nile and Kunjin Viruses. In J. S. Mackenzie, A. D. T. Barrett, & V. Deubel (Eds.), *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses* (pp. 373-390). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schneider, B. S., & Higgs, S. (2008). The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *102*(5), 400-408.
- Schneider, B. S., Soong, L., Coffey, L. L., Stevenson, H. L., McGee, C. E., & Higgs, S. (2010). *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. *PLoS One*, *5*(7), e11704. doi:10.1371/journal.pone.0011704
- Schneider, B. S., Soong, L., Girard, Y. A., Campbell, G., Mason, P., & Higgs, S. (2006). Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding. *Viral immunology*, *19*(1), 74-82.
- Seino, K. K., Long, M. T., Gibbs, E. P., Bowen, R. A., Beachboard, S. E., Humphrey, P. P., . . . Bourgeois, M. A. (2007). Comparative efficacies of three commercially available vaccines against West Nile Virus (WNV) in a short-duration challenge trial involving an equine WNV encephalitis model. *Clin Vaccine Immunol*, *14*(11), 1465-1471. doi:10.1128/cvi.00249-07
- Sejvar, J. J. (2003). West Nile virus: an historical overview. *Ochsner Journal*, *5*(3), 6-10.
- Sghaier, W., Bahri, O., Kedous, E., Fazaa, O., Rezig, D., Touzi, H., . . . Triki, H. (2012). [Retrospective study of viral causes of central nervous system infections in Tunisia (2003-2009)]. *Med Sante Trop*, *22*(4), 373-378. doi:10.1684/mst.2012.0080
- Shah, P. S., Link, N., Jang, G. M., Sharp, P. P., Zhu, T., Swaney, D. L., . . . Krogan, N. J. (2018). Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell*, *175*(7), 1931-1945.e1918. doi:10.1016/j.cell.2018.11.028
- Shaw, A. C., Goldstein, D. R., & Montgomery, R. R. (2013). Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, *13*(12), 875-887. doi:10.1038/nri3547
- Shiryaev, S. A., Chernov, A. V., Aleshin, A. E., Shiryaeva, T. N., & Strongin, A. Y. (2009). NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J Gen Virol*, *90*(Pt 9), 2081-2085. doi:10.1099/vir.0.012864-0
- Shukla, J., Saxena, D., Rathinam, S., Lalitha, P., Joseph, C. R., Sharma, S., . . . Parida, M. (2012). Molecular detection and characterization of West Nile virus associated with multifocal retinitis in patients from southern India. *International journal of infectious diseases*, *16*(1), e53-e59.
- Sirbu, A., Ceianu, C., Panculescu-Gatej, R., Vazquez, A., Tenorio, A., Rebreanu, R., . . . Pistol, A. (2011). Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Eurosurveillance*, *16*(2).
- Slon Campos, J. L., Mongkolsapaya, J., & Sreaton, G. R. (2018). The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol*, *19*(11), 1189-1198. doi:10.1038/s41590-018-0210-3
- Smit, J. M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., & Wilschut, J. (2011). Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*, *3*(2), 160-171. doi:10.3390/v3020160
- Smithburn, K., Hughes, T., Burke, A., & Paul, J. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American journal of tropical medicine*, *20*, 471-472.
- Smithburn, K. C., Taylor, R. M., Rizk, F., & Kader, A. (1954). Immunity to certain arthropod-borne viruses among indigenous residents of Egypt. *Am J Trop Med Hyg*, *3*(1), 9-18. doi:10.4269/ajtmh.1954.3.9

- Southam, C. M., & Moore, A. E. (1951). West Nile, Ilheus, and Bunyamwera virus infections in man. *American journal of tropical medicine*, 31(6), 724-741.
- Southam, C. M., & Moore, A. E. (1954). Induced virus infections in man by the Egypt isolates of West Nile virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3(1), 19-50.
- Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J., & Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*, 71(11), 8475-8481. doi:10.1128/jvi.71.11.8475-8481.1997
- Stiasny, K., Aberle, S. W., & Heinz, F. X. (2013). Retrospective identification of human cases of West Nile virus infection in Austria (2009 to 2010) by serological differentiation from Usutu and other flavivirus infections. *Eurosurveillance*, 18(43).
- Styer, L. M., Kent, K. A., Albright, R. G., Bennett, C. J., Kramer, L. D., & Bernard, K. A. (2007). Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts. *PLoS pathogens*, 3(9), e132.
- Su, X.-C., Ozawa, K., Qi, R., Vasudevan, S., Lim, S., & Otting, G. (2009). NMR Analysis of the Dynamic Exchange of the NS2B Cofactor between Open and Closed Conformations of the West Nile Virus NS2B-NS3 Protease. *PLoS neglected tropical diseases*, 3, e561. doi:10.1371/journal.pntd.0000561
- Taylor, R., Work, T., Hurlbut, H., & Rizk, F. (1956). A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 5(4), 579-620.
- Taylor, R. M., Hurlbut, H. S., Dressler, H. R., Spangler, E. W., & Thrasher, D. (1953). Isolation of West Nile virus from Culex mosquitoes. *J Egypt Med Assoc*, 36(3), 199-208.
- Thackray, L. B., Shrestha, B., Richner, J. M., Miner, J. J., Pinto, A. K., Lazear, H. M., . . . Diamond, M. S. (2014). Interferon regulatory factor 5-dependent immune responses in the draining lymph node protect against West Nile virus infection. *J Virol*, 88(19), 11007-11021. doi:10.1128/jvi.01545-14
- Tilley, P. A., Fox, J. D., Jayaraman, G. C., & Preiksaitis, J. K. (2006). Nucleic acid testing for West Nile virus RNA in plasma enhances rapid diagnosis of acute infection in symptomatic patients. *The Journal of infectious diseases*, 193(10), 1361-1364.
- Tobler, L. H., Cameron, M. J., Lanteri, M. C., Prince, H. E., Danesh, A., Persad, D., . . . Busch, M. P. (2008). Interferon and interferon-induced chemokine expression is associated with control of acute viremia in West Nile virus-infected blood donors. *J Infect Dis*, 198(7), 979-983. doi:10.1086/591466
- Tonry, J. H., Xiao, S. Y., Siirin, M., Chen, H., da Rosa, A. P., & Tesh, R. B. (2005). Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters. *Am J Trop Med Hyg*, 72(3), 320-324.
- Truemper, E. J., & Romero, J. R. (2007). West Nile Virus. *Pediatric Annals*, 36(7), 414-422. doi:doi:10.3928/0090-4481-20070701-09
- Tsai, T., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G., & Nedelcu, N. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *The Lancet*, 352(9130), 767-771.
- Tuplin, A., Evans, D., Buckley, A., Jones, I., Gould, E., & Gritsun, T. (2011). Replication enhancer elements within the open reading frame of tick-borne encephalitis virus and their evolution within the Flavivirus genus. *Nucleic acids research*, 39(16), 7034-7048.
- Tyler, K. L., Pape, J., Goody, R. J., Corkill, M., & Kleinschmidt-DeMasters, B. K. (2006). CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus meningitis and encephalitis. *Neurology*, 66(3), 361-365. doi:10.1212/01.wnl.0000195890.70898.1f
- Ulloa, A., Ferguson, H. H., Méndez-Sánchez, J. D., Danis-Lozano, R., Casas-Martínez, M., Bond, J. G., . . . Rodríguez-Pérez, M. A. (2009). West Nile virus activity in mosquitoes and domestic animals in Chiapas, México. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(5), 555-560. doi:10.1089/vbz.2008.0087

- Valiakos, G., Athanasiou, L., A, T., Papatsiros, V., Spyrou, V., Petrovska, L., & Billinis, C. (2013). West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence. In.
- Valiakos, G., Plavos, K., Vontas, A., Sofia, M., Giannakopoulos, A., Giannoulis, T., . . . Billinis, C. (2019). Phylogenetic Analysis of Bird-Virulent West Nile Virus Strain, Greece. *Emerg Infect Dis*, 25(12), 2323-2325. doi:10.3201/eid2512.181225
- Valiakos, G., Touloudi, A., Iacovakis, C., Athanasiou, L., Birtsas, P., Spyrou, V., & Billinis, C. (2011). Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Eurosurveillance*, 16(18), 19862.
- van Leur, S. W., Heunis, T., Munnur, D., & Sanyal, S. (2021). Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*, 12(1), 2814-2838. doi:10.1080/21505594.2021.1996059
- Van Marle, G., Antony, J., Ostermann, H., Dunham, C., Hunt, T., Halliday, W., . . . Peeling, J. (2007). West Nile virus-induced neuroinflammation: glial infection and capsid protein-mediated neurovirulence. *Journal of virology*, 81(20), 10933-10949.
- Vázquez, A., Sánchez-Seco, M. P., Ruiz, S., Molero, F., Hernández, L., Moreno, J., . . . Tenorio, A. (2010). Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain. *Emerging Infectious Disease journal*, 16(3), 549. doi:10.3201/eid1603.091033
- Verma, S., Kumar, M., Gurjav, U., Lum, S., & Nerurkar, V. R. (2010). Reversal of West Nile virus-induced blood–brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology*, 397(1), 130-138.
- Verma, S., Lo, Y., Chapagain, M., Lum, S., Kumar, M., Gurjav, U., . . . Nerurkar, V. R. (2009). West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology*, 385(2), 425-433.
- Wünschmann, A., Shivers, J., Bender, J., Carroll, L., Fuller, S., Saggese, M., . . . Redig, P. (2005). Pathologic and immunohistochemical findings in goshawks (*Accipiter gentilis*) and great horned owls (*Bubo virginianus*) naturally infected with West Nile virus. *Avian Dis*, 49(2), 252-259. doi:10.1637/7297-103104r
- Wünschmann, A., & Ziegler, A. (2006). West Nile Virus–Associated Mortality Events in Domestic Chukar Partridges (*Alectoris chukar*) and Domestic Impeyan Pheasants (*Lophophorus impeyanus*). *Avian Diseases*, 50(3), 456-459, 454. Retrieved from <https://doi.org/10.1637/7507-012106R.1>
- Wang, H., Siddharthan, V., Hall, J. O., & Morrey, J. D. (2009). West Nile virus preferentially transports along motor neuron axons after sciatic nerve injection of hamsters. *J Neurovirol*, 15(4), 293-299. doi:10.1080/13550280902973978
- Wang, P., Yang, L., Cheng, G., Yang, G., Xu, Z., You, F., . . . Sutton, R. E. (2013). UBXN1 interferes with Rig-I-like receptor-mediated antiviral immune response by targeting MAVS. *Cell Rep*, 3(4), 1057-1070. doi:10.1016/j.celrep.2013.02.027
- Wang, T., Scully, E., Yin, Z., Kim, J. H., Wang, S., Yan, J., . . . Fikrig, E. (2003). IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection. *J Immunol*, 171(5), 2524-2531. doi:10.4049/jimmunol.171.5.2524
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature medicine*, 10(12), 1366-1373.
- Wang, W., Sarkodie, F., Danso, K., Addo-Yobo, E., Owusu-Ofori, S., Allain, J. P., & Li, C. (2009). Seroprevalence of west nile virus in ghana. *Viral Immunol*, 22(1), 17-22. doi:10.1089/vim.2008.0066

- Watts, M. J., Sarto, I. M. V., Mortyn, P. G., & Kotsila, P. (2021). The rise of West Nile Virus in Southern and Southeastern Europe: A spatial-temporal analysis investigating the combined effects of climate, land use and economic changes. *One Health*, *13*, 100315. doi:10.1016/j.onehlt.2021.100315
- Weinberger, M., Pitlik, S. D., Gandacu, D., Lang, R., Nassar, F., Ben David, D., . . . Shohat, T. (2001). West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis*, *7*(4), 686-691. doi:10.3201/eid0704.010416
- Wengler, G., Czaya, G., Färber, P. M., & Hegemann, J. H. (1991). In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *Journal of General Virology*, *72*(4), 851-858.
- Wengler, G., & Wengler, G. (1981). Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: Absence of poly (A) and possible role in RNA replication. *Virology*, *113*(2), 544-555.
- Wengler, G., & Wengler, G. (1989). Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J Virol*, *63*(6), 2521-2526. doi:10.1128/jvi.63.6.2521-2526.1989
- White, G., Ottendorfer, C., Graham, S., & Unnasch, T. R. (2011). Competency of reptiles and amphibians for eastern equine encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg*, *85*(3), 421-425. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0006
- Wicker, J. A., Whiteman, M. C., Beasley, D. W., Davis, C. T., McGee, C. E., Lee, J. C., . . . Barrett, A. D. (2012). Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology*, *426*(1), 22-33. doi:10.1016/j.virol.2011.11.022
- Williams, S. A., Richards, J. S., Faddy, H. M., Leydon, J., Moran, R., Nicholson, S., . . . Lester, R. (2013). Low seroprevalence of Murray Valley encephalitis and Kunjin viruses in an opportunistic serosurvey, Victoria 2011. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, *37*(5), 427-433.
- Yakub, I., Lillibridge, K. M., Moran, A., Gonzalez, O. Y., Belmont, J., Gibbs, R. A., & Tweardy, D. J. (2005). Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection. *The Journal of infectious diseases*, *192*(10), 1741-1748.
- Yango, A. F., Fischbach, B. V., Levy, M., Chandrakantan, A., Tan, V., Spak, C., . . . Rajagopal, A. (2014). West Nile virus infection in kidney and pancreas transplant recipients in the Dallas-Fort Worth Metroplex during the 2012 Texas epidemic. *Transplantation*, *97*(9), 953-957.
- Yeh, J.-Y., Park, J.-Y., & Ostlund, E. N. (2011). Serologic evidence of West Nile Virus in wild ducks captured in major inland resting sites for migratory waterfowl in South Korea. *Veterinary microbiology*, *154*(1-2), 96-103.
- Youn, S., Li, T., McCune, B. T., Edeling, M. A., Fremont, D. H., Cristea, I. M., & Diamond, M. S. (2012). Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *J Virol*, *86*(13), 7360-7371. doi:10.1128/jvi.00157-12
- Young, J. J., Coulombier, D., Domanović, D., Group, E. U. W. N. F. W., Zeller, H., & Gossner, C. M. (2019). One Health approach for West Nile virus surveillance in the European Union: relevance of equine data for blood safety. *Eurosurveillance*, *24*(16), 1800349.
- Young, J. J., Haussig, J. M., Aberle, S. W., Pervanidou, D., Riccardo, F., Sekulić, N., . . . Gossner, C. M. (2021). Epidemiology of human West Nile virus infections in the European Union and European Union enlargement countries, 2010 to 2018. *Eurosurveillance*, *26*(19), 2001095.

- Yun, T., Ye, W., Ni, Z., Zhang, D., & Zhang, C. (2012). Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from Pekin ducklings in China. *Veterinary microbiology*, *157*(3-4), 311-319.
- Zaayman, D., & Venter, M. (2012). West Nile virus neurologic disease in humans, South Africa, September 2008–May 2009. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(12), 2051.
- Zainah, S., Wahab, A. A., Mariam, M., Fauziah, M., Khairul, A., Roslina, I., . . . Chua, K. (2009). Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. *Journal of Virological Methods*, *155*(2), 157-160.
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., . . . Li, H. (2007). Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J Virol*, *81*(8), 3891-3903. doi:10.1128/jvi.02704-06
- Zmurko, J., Neyts, J., & Dallmeier, K. (2015). Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention: The flaviviral NS4b. *Reviews in medical virology*, *25*. doi:10.1002/rmv.1835
- ΕΟΔΥ. (2023a). Ενημέρωση επαγγελματιών υγείας για την ανάγκη ενισχυμένης επιτήρησης της λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου, 2023.
- ΕΟΔΥ. (2023b). Ιός του Δυτικού Νείλου. Retrieved from <https://eody.gov.gr/disease/ios-toy-dytikoy-neiloy/>