

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 53, No 2 (2002)



### Epidemiological investigation of avian influenza in regions of Northern Greece

J. PAPANIKOLAOU (Ι. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ), Μ.  
ΚΟΥΜΒΑΤΙ-ΑΡΤΟΠΟΙΟΥ (Μ. ΚΟΥΜΠΑΤΗ-  
ΑΡΤΟΠΟΙΟΥ)

doi: [10.12681/jhvms.15369](https://doi.org/10.12681/jhvms.15369)

Copyright © 2018, J PAPANIKOLAOU, Μ ΚΟΥΜΒΑΤΙ-ΑΡΤΟΠΟΙΟΥ



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

### To cite this article:

PAPANIKOLAOU (Ι. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ) J., & ΚΟΥΜΒΑΤΙ-ΑΡΤΟΠΟΙΟΥ (Μ. ΚΟΥΜΠΑΤΗ-ΑΡΤΟΠΟΙΟΥ) Μ. (2018). Epidemiological investigation of avian influenza in regions of Northern Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 53(2), 132–137. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15369>

## Επιδημιολογική διερεύνηση της γρίππης των πτηνών σε περιοχές της Βόρειας Ελλάδας.

Ι. Παπανικολάου<sup>1</sup>, Μ. Κουμπατί-Αρτοποίου<sup>2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επιτήρησης για την παρουσία ιών γρίππης σε συστηματικές εκτροφές ορνίθων και ινδορνίθων, καθώς και σε ορισμένα άγρια πτηνά σε περιοχές της Β. Ελλάδας, κατά τη διετία 1999-2000. Για το σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια απομόνωσης ιών γρίππης με ενοφθαλμισμό παθολογικού υλικού σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας. Το παθολογικό υλικό (κόπρανα) προερχόταν από όρνιθες ηλικίας 35-60 εβδομάδων που παρουσίαζαν συμπτώματα ύποπτα της ελαφράς μορφής της γρίππης των πτηνών (αναπνευστικά συμπτώματα, μείωση της ωοπαραγωγής). Προσπάθεια απομόνωσης ιών γρίππης έγινε επίσης και από 34 άγρια πτηνά (σπουργίτια, σπίνι, γλάροι), που προσκομίσθηκαν νεκρά στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης με σκοπό την αναζήτηση των αιτιών θανάτου. Ταυτόχρονα, εξετάστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοδιάχυσης σε άγαρ 720 οροί, που προέρχονταν από 30 σμήνη ορνίθων και 6 σμήνη ινδορνίθων. Κατά την ίδια χρονική περίοδο, στα πλαίσια του προγράμματος ελέγχου για την πρόληψη της εισαγωγής ιών γρίππης των πτηνών, εξετάστηκαν ορολογικά με την ίδια δοκιμή ζεύγη ορών από 2580 νεοσσούς που είχαν εισαχθεί από την Ιταλία, όπου κατά το ίδιο χρονικό διάστημα η νόσος ήταν σε εξέλιξη. Σε καμία από τις προαναφερθείσες εξετάσεις, ορολογικές ή απομόνωσης ιού, δε σημειώθηκαν θετικά αποτελέσματα.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** Γρίπη των πτηνών, επιδημιολογία

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γρίπη είναι πολύ μεταδοτική ιογενής λοιμώδης νόσος των οικόσιτων πτηνών. Εμφανίζεται sporadικά και εκδηλώνεται είτε ως οξεία γενικευμένη νόσος με πολύ υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (100%), γνωστή ως "γρίπη των πτηνών οφειλόμενη σε πολύ παθογόνους ιούς" (Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI), είτε ως αναπνευστική λοίμωξη που συνοδεύεται συνήθως από μείωση της ωοπαραγωγής και ονομάζεται "γρίπη των πτηνών οφειλό-

## Epidemiological investigation of avian influenza in regions of Northern Greece.

Papanikolaou J<sup>1</sup>, Koumbati-Artopiou M<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** The results of an avian influenza viruses surveillance program in chicken and turkey industrial flocks, as well as in some wild birds from regions of N. Greece during 1999-2000 are presented in this paper. For this purpose, avian influenza virus isolation was attempted by inoculation of samples from chickens and wild birds into embryonated chicken eggs. The samples originated from 35-60 week-old layers and breeders with mild respiratory signs and drop in egg production. 34 wild birds (sparrows, chaffinches, gulls), that were brought dead to the laboratory of Veterinary Research Institute of Thessaloniki, were also examined in order to investigate the cause of their death. At the same time, 720 serum samples from 30 chicken and 6 turkey flocks were examined by Agar Gel Immunodiffusion (AGID) test. During the same period and in the framework of a surveillance program for avian influenza viruses in Greece, 2580 paired serum samples from chicks were tested by AGID test. Chicks were imported from Italy, where a Highly Pathogenic Avian Influenza was in progress during 1999-2000. All virus isolation attempts and serological tests were negative.

**Key words:** Avian influenza, epidemiology.

### INTRODUCTION

Avian influenza is a highly contagious viral disease affecting domestic poultry. It sporadically appears either as an acute generalized disease with very high mortality known as "Highly Pathogenic Avian Influenza" (HPAI) or as a mild respiratory infection with a drop in egg production, named "Low Pathogenic Avian Influenza" (LPAI)<sup>1</sup>. HPAI has a particular significance for the poultry industry due to enormous economic losses. For this reason it is classified in

<sup>1</sup> Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε, Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Γρίππης των Πτηνών,

<sup>2</sup> Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Λοιμωδών Νοσημάτων, Τομέας Λοιμωδών & Παρασιτικών νοσημάτων, Παθολογίας Πτηνών & Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Α.Π.Θ., 540 06 Θεσ/νίκη

<sup>1</sup> Veterinary Research Institute of Thessaloniki, NAGREF National Reference Laboratory for Avian Influenza

<sup>2</sup> Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Aristotle University, Thessaloniki 540 06 Greece

μενη σε ελαφρά παθογόνους ιούς" (Low Pathogenic Avian Influenza, LPAI)<sup>1</sup>. Η οξεία και θανατηφόρος μορφή της νόσου έχει ιδιαίτερη σημασία για τη συστηματική πτηνοτροφία των εκτρεφόμενων πτηνών, διότι όταν εμφανιστεί προκαλεί τεράστιες οικονομικές απώλειες. Για το λόγο αυτό η νόσος αυτή ανήκει στα νοσήματα του καταλόγου Α του διεθνούς γραφείου επιζωοτιών. Η γρίπη των πτηνών πρέπει να θεωρείται ζωοανθρωπονόσος, καθόσον στο Χονγκ-Κονγκ το 1997 μεταδόθηκε από μολυσμένες όρνιθες σε 18 ανθρώπους, από τους οποίους οι 6 κατέληξαν<sup>2</sup>.

Το παθογόνο αίτιο της νόσου είναι ιός που ταξινομείται<sup>3</sup> στο γένος *Influenzavirus A* της οικογένειας *Orthomyxoviridae* και έχει τεράστιο αριθμό υποτύπων. Οι υπότυποι, που χαρακτηρίζονται από ποικίλο βαθμού παθογόνου δράση, αναφέρονται ως ιοί της γρίπης των πτηνών. Από αυτούς άλλοι είναι μη παθογόνοι, ενώ η παθογόνος δράση των παθογόνων ιών, όπως προαναφέρθηκε, ποικίλλει. Οι ιοί αυτοί, ανάλογα με τη μορφή της νόσου που προκαλούν στις όρνιθες, διακρίνονται στους πολύ και τους ελαφρά παθογόνους<sup>4</sup>. Μέχρι σήμερα, έχει απομονωθεί περιορισμένος αριθμός πολύ παθογόνων ιών, οι οποίοι ανήκουν σε υπότυπους με τύπους αιμοσυγκολλητίνης H<sub>5</sub> και H<sub>7</sub>. Αντίθετα, οι ελαφρά παθογόνοι ιοί ανήκουν σε πολλούς και διαφορετικούς υπότυπους (π.χ. H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>9</sub>, κ.ά.), ακόμη και στους H<sub>5</sub> και H<sub>7</sub>. Από αυτούς ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζουν μόνο εκείνοι των υπότυπων H<sub>5</sub> και H<sub>7</sub>, διότι μετά την είσοδό τους σε συστηματικές εκτροφές οικόστων πτηνών είναι πιθανό να υποστούν μεταλλάξεις και να μεταβληθούν σε πολύ παθογόνους, όπως αυτό έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια της επιζωοτίας του 1999-2000 στην Ιταλία<sup>5</sup>.

Η επιδημιολογία της νόσου συνδέεται άμεσα με τα υδροβία πτηνά, τα οποία αποτελούν τους φυσικούς ξενιστές και την αποθήκη των ιών της γρίπης στη φύση. Διάφορα είδη (92) άγριων υδροβίων πτηνών και ιδιαίτερα εκείνα που ανήκουν στην τάξη των χηνόμορφων (*Anseriformes*), καθώς και διάφορα θαλασσοπούλια, κυρίως της τάξης των χαρδριόμορφων (*Charadriiformes*), αποτελούν τους κύριους ξενιστές και φιλοξενούν τεράστιο αριθμό υπότυπων<sup>6</sup>. Τα αποτελέσματα επιδημιολογικών ερευνών δείχνουν ότι πρωταρχικός ξενιστής των ιών της γρίπης είναι οι πάπιες, άγριες ή εκτρεφόμενες. Ο ρόλος των καλλωπιστικών πτηνών φαίνεται ότι είναι περιορισμένος, αφού ιοί γρίπης που ανήκουν κυρίως σε υπότυπους H<sub>3</sub> και H<sub>4</sub> έχουν απομονωθεί τυχαία, συνήθως από διάφορα είδη πτηνών της τάξης των στρουθιόμορφων (*Passeriformes*) και σπανιότερα από είδη της τάξης των ψιττακόμορφων (*Psittaciformes*)<sup>4</sup>.

Η γρίπη των πτηνών περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1878 από τον Peroncito στην Ιταλία. Η νόσος που παλαιότερα ήταν γνωστή με το όνομα "πανώλης των ορνίθων" είχε παγκόσμια εξάπλωση. Τα τελευταία 50 χρόνια παγκοσμίως έχουν σημειωθεί σποραδικά 19 επιζωοτίες γρίπης οφειλόμενης σε πολύ παθογόνους ιούς. Από αυτές, ιδιαίτερα καταστροφική ήταν η επιζωοτία που εμφανίστηκε στις ΗΠΑ το 1983 και προκάλεσε οικονομικές απώλειες πολλών εκατομμυρίων δολαρίων. Στη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, καταστροφικές επιζωοτίες παρατη-

την τη list A of the International Office of Epizootics. Avian influenza should be considered as a zoonosis, since in Hong-Kong, during 1997, it was transmitted to 18 humans, 6 of which died<sup>2</sup>.

The causal agent of avian influenza is a virus classified<sup>3</sup> in the genus *Influenzavirus A* of the *Orthomyxoviridae* family and has numerous subtypes. These subtypes are characterized by different pathogenicity, since there are apathogenic avian influenza viruses, as well as pathogenic ranging in pathogenicity, as already mentioned<sup>4</sup>. Highly pathogenic viruses isolated up to now in a limited number belong to H<sub>5</sub> and H<sub>7</sub> subtypes. Other viruses, that cause a much milder disease, are distributed in different subtypes (e.g. H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>9</sub> etc.), even in H<sub>5</sub> and H<sub>7</sub>. Only H<sub>5</sub> and H<sub>7</sub> are particularly important, as they may be mutated and become highly pathogenic after being introduced to poultry, just as it happened during the last outbreak of HPAI in Italy<sup>5</sup>.

The epidemiology of avian influenza is directly related to waterfowl, which is the natural host and source of influenza virus infection. Several species (92) of wild waterfowl especially those belonging to the order *Anseriformes*, as well as seabirds of the order *Charadriiformes*, are usually the main hosts and carry huge number of avian influenza viruses<sup>6</sup>. However, evidence from epidemiological investigations indicates that the primary hosts for these viruses are wild or domestic ducks. The role of caged birds seems to be limited, since H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> viruses have been occasionally isolated from birds belonging to the order *Passeriformes* and rarely from psittacinae species (*Psittaciformes*)<sup>4</sup>.

Avian influenza was reported for the first time by Peroncito in 1878 in Italy. This disease, former known as "fowl plague", had worldwide distribution. During the last 50 years, 19 epizootics of HPAI have been reported. From these, the most devastating one appeared in the USA in 1983. During the last decade, devastating epizootics appeared in Australia, Pakistan, Mexico and Italy. Particularly in Italy, after 1997, two outbreaks of HPAI were recorded. The first, during 1997-1998, was restricted in a limited area, while the second, during 1999-2000, affected chicken and turkey commercial flocks, in a densely populated area of N. Italy, with losses reaching 20 million birds<sup>7</sup>. In Greece neither HPAI nor LPAI outbreaks have been reported up to date. Avian influenza viruses were not detected during a study which targeted to investigate the implication of these viruses in respiratory infections of broiler chickens<sup>8</sup>.

The purpose of the present study was to investigate the presence of avian influenza viruses in poultry industrial flocks, as well as if they might be the causal agent of mortality for wild birds in several regions of N. Greece. Moreover, to check the possibility of introduction of avian influenza viruses with chicks imported from Italy, where an outbreak of HPAI was in progress during the same period of time.

γήθηκαν στην Αυστραλία, το Πακιστάν, το Μεξικό, όπως και στην Ιταλία. Ιδιαίτερα στην Ιταλία, μετά το 1997, παρατηρήθηκαν δύο επιζωοτίες γρίπης οφειλόμενης σε πολύ παθογόνους ιούς. Η πρώτη που εμφανίσθηκε το 1997-98 ήταν περιορισμένης έκτασης, ενώ η δεύτερη σημειώθηκε την περίοδο 1999-2000 σε σμήνη ορνίθων και ινδορνίθων στη Β. Ιταλία με απώλειες 20 περίπου εκατομμυρίων πτηνών<sup>7</sup>. Στην Ελλάδα καμία μορφή της νόσου δεν έχει αναφερθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε όρνιθες κρεοπαραγωγικών σμηνών και αφορούσε τη διερεύνηση των παθογόνων παραγόντων που προκαλούν αναπνευστικές λοιμώξεις, ιού γρίπης δε διαπιστώθηκαν<sup>8</sup>.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να διερευνηθεί η παρουσία ιών γρίπης σε εκτροφές ορνίθων και ινδορνίθων της συστηματικής πτηνοτροφίας, αλλά και να διαπιστωθεί, αν αυτοί αποτελούν αιτία θανάτου για άγρια πτηνά σε περιοχές της Β. Ελλάδας. Επιπλέον, να διερευνηθεί η δυνατότητα εισαγωγής ιών γρίπης των πτηνών στη χώρα μας με νεοσσούς που προέρχονται από τη γειτονική Ιταλία, όπου η νόσος ήταν σε εξέλιξη κατά το ίδιο χρονικό διάστημα.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

*Δείγματα παθολογικού υλικού για την απομόνωση ιών γρίπης.* Τα δείγματα του παθολογικού υλικού που συγκεντρώθηκαν κατά το χρονικό διάστημα 1999-2000 προέρχονται από δύο ομάδες πτηνών. Η πρώτη περιλάμβανε 210 όρνιθες ηλικίας 35-60 εβδομάδων, που παρουσίαζαν αναπνευστικά συμπτώματα ή μείωση της ωοπαραγωγής και προέρχονταν από 10 σμήνη ωοπαραγωγής και 8 αναπαραγωγής. Οι εκτροφές των ορνίθων αυτών βρίσκονταν στους νομούς Θεσσαλονίκης, Χαλκιδικής, Πιερίας και Σερρών. Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από 34 άγρια πτηνά (12 σπουργίτια, 8 σπίνι, 14 γλάροι) που προσκομίσθηκαν νεκρά στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, για τον προσδιορισμό της αιτίας θανάτου. Από τις όρνιθες εξετάστηκαν δείγματα κοπράνων, τα οποία λαμβάνονταν με βαμβάκοφορο σπειρό από το τελευταίο τμήμα του παχέος εντέρου. Τα δείγματα του παθολογικού υλικού που εξετάστηκαν από τα άγρια πτηνά ήταν τμήματα τραχείας, πνευμόνων, εγκεφάλου, ήπατος, σπλήνας και εντέρων.

*Δείγματα ορών για την ανίχνευση αντισωμάτων.* Εξετάστηκαν συνολικά 3300 δείγματα ορών. Από αυτά τα 720 προέρχονταν από 30 σμήνη ορνίθων (10 κρεοπαραγωγικά, 10 ωοπαραγωγικά και 10 γεννητόρων) και 6 παχυνόμενων ινδορνίθων. Οι εκτροφές από τις οποίες προέρχονταν οι οροί βρίσκονταν στους νομούς Θεσσαλονίκης, Ημαθίας, Πιερίας, Σερρών και Χαλκιδικής. Από κάθε εκτροφή εξετάστηκαν 20 δείγματα ορών. Τα υπόλοιπα 2580 ήταν δείγματα ζευγών ορών από νεοσσούς που είχαν εισαχθεί στη χώρα μας από την Ιταλία. Το πρώτο δείγμα λαμβανόταν από νεοσσούς 2-5 ημερών και το δεύτερο τουλάχιστον 2 εβδομάδες μετά τη λήψη του πρώτου δείγματος.

*Απομόνωση ιού.* Για την απομόνωση ιών γρίπης εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι που αναφέρονται στην οδηγία

## MATERIALS AND METHODS

*Samples for virus isolation.* The samples were collected from two groups of birds. The first one included 210 samples from laying hens, 35-60 weeks of age, with respiratory signs or decline in egg production. These hens originated from 18 commercial flocks (10 laying, 8 breeding), which were situated in the prefectures of Thessaloniki, Halkidiki, Pieria and Serres. The second group consisted of 34 wild birds (12 sparrows, 8 chaffinches, 14 gulls) that were brought dead to the laboratory of Veterinary Research Institute of Thessaloniki, in order to determine the cause of their death. Cloacal swabs were examined from chickens, while portions of trachea, lung, brain, liver, spleen and intestine were taken from wild birds.

*Serum samples for antibody detection.* Out of 3300 serum samples totally tested, 720 originated from 30 chicken flocks (10 broilers, 10 laying hens, 10 breeders) and 6 from turkey flocks. Twenty serum samples were tested from each flock. The poultry holdings were situated in the prefectures of Thessaloniki, Halkidiki, Imathia, Pieria and Serres. The other 2580 serum samples were paired sera from chicks imported from Italy. The first of the paired serum sample was taken from chicks 2-5 days of age and the second one two weeks later.

*Virus isolation.* All samples were processed for virus isolation according to the Directive 92/40/EEC<sup>9</sup>. Faecal samples were initially homogenized by adding a diluent at the rate of 10% w/v. A phosphate buffer saline was used as a diluent, in which antibiotics were added (penicilline 10.000 units/ml, streptomycin 10 mg/ml, gentamycin 0.25 mg/ml and mycostatin 5.000 units/ml). Antibiotic concentration in the tissue samples was five times less than in fecal samples. After centrifuging for 10 minutes at 1000 g, homogenates were inoculated into a series of 4 embryonated chicken eggs in a volume of 0.2 ml. Embryonated chicken eggs originated from conventional flocks, free from avian influenza virus antibodies. Allantoic fluids collected from dead or chilled embryos 72-96 hours after inoculation were tested for haemagglutinating activity with a 1% suspension of chicken red blood cells. In case of negative haemagglutination two serial blind passages were performed for each sample. In order to verify the presence of an avian influenza virus in allantoic fluids of embryos that died 24-48 hours after inoculation, these fluids were filtered using a 450 nm filter pore size, and after adding antibiotics, the same volume of 0.2 ml was inoculated in a new series of 4 embryonated chicken eggs.

*Antibody Detection.* Agar Gel Immunodiffusion test (AGID) was used for the detection of antibodies in all serum samples. Agar (Noble) 1% volume /volume was diluted in distilled phosphate buffer solution with 7.2% NaCl. The antigen and positive reference serum were supplied by the reference laboratory of the European Commission (CVL, Weybridge). For antigen preparation a serotype A avian influenza virus was processed to release

92/40/EEC<sup>9</sup>. Αρχικά τα δείγματα ομοιογενοποιούνταν με λειοτριβήση και προσθήκη αραιωτικού σε αναλογία 10% βάρος/όγκο. Ως αραιωτικό χρησιμοποιούνταν ισότονο διάλυμα φωσφορικών αλάτων, στο οποίο είχαν προστεθεί αντιβιοτικά (10.000 μονάδες /ml πενικιλίνης, 10 mg /ml στρεπτομυκίνης, 0,25 mg/ml γενταμυκίνης και 5.000 μονάδες/ml μυκοστατίνης). Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών ήταν πέντε φορές μικρότερη για τα δείγματα ιστών. Ακολούθως, κάθε ομοιογενοποιημένο δείγμα, μετά τη φυγοκέντρωσή του επί 10 λεπτά σε 1000 g, ενοφθαλμιζόταν σε ποσότητα 0.2 ml στη χοριοαλλαντοειδή κοιλότητα καθενός από 4 εμβρυοφόρα αυγά με ηλικία εμβρύου 10 ημερών. Τα γονιμοποιημένα αυγά προέρχονταν από κοινά σμήνη αναπαραγωγής, τα οποία στερούνταν αντισωμάτων έναντι των ιών της γρίπης. Τα αυγά που περιείχαν νεκρά έμβρυα 72-96 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό ή τα έμβρυά τους που είχαν επιζήσει το χρονικό αυτό διάστημα, ψύχονταν και μικρή ποσότητα του χοριοαλλαντοειδούς υγρού εξετάζονταν για την ανίχνευση αιμοσυγκολλητίνης έναντι εναιωρήματος 1% ερυθρών αιμοσφαιρίων όρνιθας. Όταν παρατηρούνταν αρνητική αντίδραση στην αιμοσυγκόλληση, το χοριοαλλαντοειδές υγρό ενοφθαλμιζόταν σε νέα ομάδα 4 εμβρυοφόρων αυγών (τυφλή δίοδος). Σε περίπτωση θανάτου των εμβρύων 24-48 ώρες τόσο μετά τον πρώτο ενοφθαλμισμό όσο και μετά την τυφλή δίοδο, για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ιού και όχι βακτηρίων στο χοριοαλλαντοειδές υγρό, γινόταν διήθηση του υγρού από φίλτρο με διάμετρο πόρου 450 nm, το οποίο μετά από προσθήκη αντιβιοτικών ενοφθαλμιζόταν σε νέα ομάδα 4 εμβρυοφόρων αυγών.

**Ανίχνευση αντισωμάτων.** Για την ανίχνευση αντισωμάτων εφαρμόστηκε η δοκιμή της διπλής ανοσοδιάχυσης σε άγαρ. Για την πραγματοποίηση της δοκιμής χρησιμοποιήθηκε 1% άγαρ (Noble), που αραιώθηκε σε αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων, στο οποίο είχε προστεθεί 7,2% NaCl. Το αντιγόνο και οι θετικοί οροί αναφοράς προέρχονταν από το ειδικό εργαστήριο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης (CVL, Weybridge). Το αντιγόνο προήλθε από ειδική επεξεργασία ιού γρίπης του ορότυπου A, ώστε να απελευθερωθούν τα εσωτερικά του αντιγόνα της νουκλεοπρωτεΐνης και της βασικής μεμβράνης. Η αρχική ανάγνωση των αποτελεσμάτων γινόταν στις 48 ώρες και η τελική σε 72 ώρες μετά από την τοποθέτηση των αντιδραστηρίων στο άγαρ.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προσπάθεια απομόνωσης ιών γρίπης από τα κόπρανα όρνιθων, οι οποίες παρουσίαζαν συμπτώματα ύποπτα της νόσου, δηλαδή ελαφρά αναπνευστικά και μείωση της ωοπαραγωγής, δεν έδειξε την παρουσία αιμοσυγκολλητικού ιού σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν. Επειδή τα δείγματα του παθολογικού υλικού προέρχονταν από όρνιθες ηλικίας 35-60 εβδομάδων, που είναι πολύ μεγαλύτερη της ηλικίας εμβολιασμού κατά του ιού της ψευδοπανώλους, η μη ανίχνευση αυτού του αιμοσυγκολλητικού ιού ήταν αναμενόμενη. Ιοί γρίπης δεν ανιχνεύθηκαν ούτε και κατά την εξέταση των δειγμάτων εσωτερικών οργάνων από άγρια πτηνά που προσκομίστηκαν νεκρά στο

the internal antigens of nucleoprotein and matrix protein. The first reading was at 48 hours and the final at 72 hours after setting the reagents into the agar plate.

## RESULTS AND DISCUSSION

Any attempt for virus isolation from faecal samples of chickens showing signs indicative of avian influenza, such as respiratory distress and decrease of egg production, did not reveal any haemagglutinating agent. Isolation of haemagglutinating Newcastle disease virus was not expected, as the examined chickens were older than those vaccinated against this virus. Avian influenza viruses were not detected in the samples of tissues from wild birds either, that were brought to the laboratory for investigating the cause of death. Other pathological agents detected in sparrows were *Salmonella typhimurium*, in chaffins *Salmonella blockley* and in gulls *Escherichia coli*.

The serological tests in serum samples which derived from breeders, broilers or laying hens flocks, as well as from fattening turkey flocks, did not show positive results in any case. From every flock 20 serum samples were tested, in order that one positive serum could be detected with a probability of 99 %, regardless of the size of the flock, if 25% of their birds were seropositive<sup>9</sup>. Negative results were also obtained from serological tests of paired sera from chicks imported from Italy. The negative reaction in the first sample verified that chicks derived from seronegative breeders, whereas the same results in the second one indicated that chicks were not infected during transportation. Serological examinations were performed by AGID test, as this is the preferred method for epidemiological studies<sup>9</sup>. This is due to its ability to detect antibodies for any subtype, since the nucleoprotein and matrix protein common antigens in all type A influenza viruses are used as antigen. Moreover, the method is simple in use, with low cost and does not require specific reagents for every bird species, while its results are comparable with those of ELISA<sup>10</sup>.

The negative results, either by virus isolation or antibody detection in chicken and turkey flocks show that avian influenza viruses did not circulate in examined poultry industry holdings during 1999-2000. These results are in accordance with those of a previous study, in which an antigen detection ELISA was used in broiler chicken holdings situated in the same area<sup>8</sup>.

Epidemiological studies based on the detection of influenza viruses and specific antibodies are required for avian influenza surveillance, since this disease is not regarded as enzootic for chicken and turkey flocks, even in countries where the viruses are isolated in high frequency (e.g. Italy<sup>11</sup>, the USA<sup>6</sup>). In these countries, outbreaks occur initially in turkey flocks situated along the routes of migratory waterfowl and each time they are caused by a new virus introduction into the flocks. For instance, the HPAI epizootic that occurred in Italy during 1997-1998 resulted

εργαστήριο για να διερευνηθούν τα αίτια θανάτου. Σε παράλληλες εξετάσεις, που έγιναν στα πτηνά αυτά για την αναζήτηση άλλων παθογόνων παραγόντων, από τα σπυρίγια απομονώθηκε *Salmonella typhimurium*, τους σπίνους *Salmonella blockley* και τους γλάρους *Escherichia coli*.

Οι ορολογικές εξετάσεις των ορνίθων, οι οποίες προέρχονταν από σμήνη αναπαραγωγικά, κρεοπαραγωγικά ή ωοπαραγωγής, αλλά και των παχυνόμενων ινδορνίθων, σε καμία περίπτωση δεν έδωσαν θετική αντίδραση. Από κάθε εκτροφή εξετάστηκαν 20 δείγματα ορών, ώστε, ανεξάρτητα από το μέγεθος του σμήνους, να υπάρχει κατά 99% πιθανότητα ανίχνευσης ενός θετικού ορού, εάν το 25% των πτηνών του σμήνους είναι αντισώματα έναντι ιών γρίπης<sup>9</sup>. Αρνητικά επίσης ήταν και τα αποτελέσματα της ορολογικής εξέτασης που έγινε σε ζεύγη ορών από νεοσσούς, οι οποίοι εισήχθησαν στη χώρα μας από την Ιταλία. Η αρνητική αντίδραση του πρώτου δείγματος του ζεύγους επιβεβαίωσε ότι οι γεννήτορες των νεοσσών ήταν απαλλαγμένοι από ιούς γρίπης, ενώ του δεύτερου έδειξε ότι οι νεοσσοί δε μολύνθηκαν κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους. Οι ορολογικές εξετάσεις έγιναν με τη μέθοδο της διπλής ανοσοδιάχυσης σε άγαρ, καθόσον η δοκιμή αυτή, επειδή ανιχνεύει αντισώματα έναντι όλων των υπότυπων, συνιστάται για επιδημιολογικές μελέτες<sup>9</sup>. Η δυνατότητά της αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι ανιχνεύει τα εσωτερικά αντιγόνα της νουκλεοπροτεΐνης και της βασικής μεμβράνης, που είναι κοινά σε όλους τους ιούς γρίπης του ορότυπου Α. Επιπλέον, είναι απλή στη χρήση, οικονομική και δε χρειάζεται ειδικά για κάθε είδος πτηνού αντιδραστήρια, ενώ τα αποτελέσματά της είναι συγκρίσιμα με εκείνα που λαμβάνονται από την εξέταση των ορών με τη μέθοδο της ELISA<sup>10</sup>.

Όπως προκύπτει από τα αρνητικά αποτελέσματα τόσο της ανίχνευσης ιών όσο και αντισωμάτων, οι γρίπης δεν κυκλοφορούσαν στις εξετασθείσες εκτροφές της συστηματικής πτηνοτροφίας κατά το χρονικό διάστημα 1999-2000. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα προγενέστερης έρευνας, η οποία στηριζόταν στην ανίχνευση των εσωτερικών αντιγόνων των ιών της γρίπης με τη μέθοδο της ELISA και είχε πραγματοποιηθεί σε σμήνη κρεοπαραγωγικών ορνιθίων εκτροφών που βρισκόταν στις ίδιες περιοχές<sup>8</sup>.

Για την επιτήρηση της γρίπης των πτηνών απαιτείται να γίνονται συχνά επιδημιολογικές έρευνες που στηρίζονται στην ανίχνευση των ιών και των ειδικών αντισωμάτων, καθόσον η νόσος αυτή δε θεωρείται ότι είναι ενζωτική για τις συστηματικές εκτροφές των ορνίθων και των ινδορνίθων, ακόμη και σε χώρες στις οποίες οι υπεύθυνοι ιοί απομονώνονται πολύ συχνά (π.χ. στην Ιταλία<sup>11</sup> και τις Η.Π.Α.<sup>6</sup>). Στις χώρες αυτές, επιζωοτίες γρίπης συνήθως αρχικά παρατηρούνται σε σμήνη ινδορνίθων που εκτρέφονται σε περιοχές, οι οποίες βρίσκονται κατά μήκος των οδών μετανάστευσης των αποδημητικών υβριδίων πτηνών και μάλιστα σε κάθε περίπτωση οφείλονται στην είσοδο νέου ιού στις εκτροφές. Για παράδειγμα, η επιζωοτία γρίπης οφειλόμενης σε πολύ παθογόνους ιούς που παρατηρήθηκε το 1997-1998 στην Ιταλία οφειλόταν σε ιό του

from H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> virus subtype, whereas a virus of H<sub>7</sub>N<sub>1</sub> subtype was responsible for the epizootic of 1999-2000<sup>7</sup>. Avian influenza viruses are maintained in nature by circulating in a great number of wild waterfowl population, from which occasionally they are introduced into commercial poultry flocks. Fattening ducks and geese are the primary intermediate species transferring avian influenza viruses from wild birds to susceptible domestic poultry flocks. Turkeys, ostriches and other species raised in range have also been implicated. Slemmons and his colleagues<sup>12</sup>, inoculating in chickens several subtypes of avian influenza viruses isolated from wild birds, found that the pathogenicity index ranged from 0.00 to 0.49, while the pathogenicity index of highly pathogenic viruses ranged from 1.25-3.00. However, as a result of an experimental study, avirulent viruses maintained in waterfowl in nature and bearing the consensus type sequence R-E-T-R (R=Arginine) have the possibility to become highly pathogenic while circulating in chickens<sup>13</sup>.

Avian influenza virus isolation has been reported with low incidence from wild birds, such as gulls (order *Laraformes*, family *Laridae*), from several investigators in the USA and in some European countries. Graves<sup>14</sup> in the USA examined 3403 gulls from which avian influenza viruses were isolated in 70 (rate 2%). In another epidemiological study in Germany, Suss and his colleagues<sup>15</sup> examined 2182 gulls and avian influenza viruses were isolated only in 13 (rate 1.1%). As it is mentioned in the bibliography, the incidence of infection in birds of the order of *Passeriformes*, in which chuffincs (family *Frangillidae*) and sparrows (family *Proceidae*) belong, is very low. Therefore, isolation of avian influenza viruses from these birds was not expected, as the number of the examined samples was very small.

Avian influenza viruses are not pathogenic for wild and domestic waterfowl. The same is true for the most of wild birds, from which these viruses have been isolated. However, in a few cases and in predacious birds, HPAI viruses may result in death. As it has been reported, HPAI virus was the cause of death for a falcon (*Falco peregrinus*), that was infected after eating another infected bird<sup>16</sup>.

#### Acknowledgements

We gratefully thank the technician of ILPAN Mr Stavros Ntokas for his valuable help in the laboratory examinations. □

υπότυπου H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>, ενώ για την επιζωοτία του 1999-2000 υπεύθυνος ήταν ίσως του υπότυπου H<sub>7</sub>N<sub>1</sub><sup>7</sup>. Όπως προέκυψε από επιδημιολογικές έρευνες, οι ιοί της γρίπτης διατηρούνται στη φύση κυκλοφορώντας σε μεγάλους πληθυσμούς άγριων πτηνών, από τα οποία τυχαίως κατά διαστήματα εισάγονται στις συστηματικές εκτροφές των ορνίθων και των ινδορνίθων, διαμέσου άλλων πτηνών που εκτρέφονται σε ανοικτού τύπου εκτροφές<sup>6</sup>. Κυρίως τον ενδιάμεσο ρόλο της μεταφοράς των ιών από τα άγρια στα ευπαθή οικόσιτα πτηνά παίζουν οι παχυνόμενες πάπιες και χήνες και δευτερευόντως οι ινδορνίθες, οι στρουθοκάμηλοι και άλλα είδη πτηνών. Οι ιοί της γρίπτης που απομονώνονται από άγρια πτηνά είναι συνήθως ελαφρά παθογόνοι για τις όρνιθες. Οι Slemons και συνεργάτες<sup>12</sup> ενοφθαλμίζοντας σε όρνιθες ιούς γρίπτης διάφορων υπότυπων, που απομόνωσαν από άγρια πτηνά, βρήκαν ότι ο δείκτης της παθογένειας κυμαινόταν από 0.00 μέχρι 0.49, γεγονός που δείχνει τη μικρή λοιμογόνο τους δύναμη, δεδομένου ότι στους πολύ λοιμογόνους ιούς ο δείκτης κυμαίνεται από 1.25-3.00. Είναι όμως πιθανόν, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα πειραματικής μελέτης, ορισμένοι από τους ιούς αυτούς και ιδιαίτερα εκείνοι που φέρουν στο γονίδιο της αιμοσυγκολλητίνης τους την πρότυπη ακολουθία νουκλεοτιδίων R-E-T-R (R=Αργινίνη), να μεταβληθούν σε πολύ παθογόνους, όταν υποστούν διαδοχικές διόδους σε όρνιθες<sup>13</sup>.

Απομόνωση ιών γρίπτης από άγρια πτηνά της τάξης των λαρόμορφων, στην οποία ανήκουν οι γλάροι (οικογένεια *Laridae*) έχει αναφερθεί με χαμηλή συχνότητα από διάφορους ερευνητές στις Η. Π. Α., αλλά και σε χώρες της Ευρώπης. Ο Graves<sup>14</sup> στις Η.Π.Α. εξέτασε 3403 γλάρους από τους οποίους ιοί γρίπτης απομονώθηκαν σε 70 (ποσοστό 2%), ενώ οι Suss και συνεργάτες<sup>15</sup> στη Γερμανία από 2182 γλάρους, που εξέτασαν, απομόνωσαν ιούς γρίπτης μόνο από 13 (ποσοστό 1.1%). Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, η συχνότητα μόλυνσης στα στρουθιόμορφα, στα οποία ανήκουν οι σπίνιοι (οικογένεια *Frangillidae*) και τα σπουργίτια (οικογένεια *Proceidae*) είναι πολύ χαμηλή. Επομένως, η μη ανίχνευση ιών γρίπτης σε μικρό αριθμό δειγμάτων από τα πτηνά αυτά ήταν αναμενόμενη.

Οι ιοί της γρίπτης δεν είναι παθογόνοι για τα άγρια υδροβία πτηνά και τα εκτρεφόμενα, καθώς και για τα περισσότερα είδη άλλων άγριων πτηνών, από τα οποία έχουν απομονωθεί. Εντούτοις, σε σπάνιες περιπτώσεις και σε αρπακτικά πτηνά είναι δυνατό πολύ παθογόνος ιός γρίπτης να προκαλέσει θάνατο. Όπως έχει αναφερθεί<sup>16</sup>, από γεράκι (*Falco peregrinus*) που βρέθηκε νεκρό απομονώθηκε πολύ παθογόνος ιός γρίπτης, στον οποίο αποδόθηκε η αιτία θανάτου. Πηγή μόλυνσης για το άγριο αρπακτικό θεωρήθηκε η κατανώση μολυσμένου πτηνού.

### Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε θερμά τον παρασκευαστή του ΙΛΠΑΝ κ. Σταύρο Ντόκα για την πολύτιμη βοήθειά του στις εργαστηριακές εξετάσεις. □

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

1. Easterday B C, Hinsaw V S, Halvorson D A. Influenza. In: Diseases of Poultry, 10th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1997, 583-605.
2. Claas E C J, Osterhaus A D M E, Ruud van Beek, Dejong J C, Guus F, Rimmelzwaan, Senne D A, Kraus C, Shortridge K F, Webster R G: Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. The Lancet 1998, 351:472-477.
3. Pringle C R: The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV report in 1995. Arch Virol 1998, 143:203-210.
4. Alexander D J.: A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol 2000, 74: 3-13.
5. Capua I, Mutinelli F, Marangon S, Alexander D J: H7N1 avian influenza in Italy (1999-2000) in intensively reared chickens and turkeys. Av Pathol 2000, 29: 537-543.
6. Alexander D J: Epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. J Comp Pathol 1995, 112: 105-126.
7. Capua I, Marangon S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. Av Pathol 2000, 29: 289-294.
8. Georgiadis G. Contribution into the study of respiratory diseases of broilers in Greece. PhD thesis. Thessaloniki. 1998.
9. CEC Council Directive 92/40/EEC of 19 May 1992 introducing Community measures for the control of avian influenza. Official Journal of the European Commission, L167: 1-15.
10. Meulemans G, Carlier M C, Gonze M, Petit P.: Comparison of Hemmagglutination-Inhibition, Agar Gel Precipitin and Enzyme - Linked Immunosorbent Assay for measuring antibodies against influenza viruses in chickens. Av Dis 1987, 31: 560-563.
11. Franciosi C, D' Aprile P N, Alexander D J, Petek M.: Influenza A virus infections in commercial turkeys in North East Italy. Av Pathol 1981, 10:303-311.
12. Slemons R D, Condobery P K, Swayne D E.: Assessing pathogenicity potential of waterfowl-origin type A influenza viruses in chickens. Av Dis 1991, 35: 210-215.
13. Ito T, Goto H, Yamamoto E, Tanaka H, Takeuchi M, Kuwayama M, Kawaoka Y.: Generation of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from an avirulent isolate by passaging in chickens. J Virol 2001, 75: 4439-43.
14. Graves L.: Influenza viruses in birds of the Atlantic flyway. Av Dis 1992, 36: 1-10
15. Suss J, Schafer J, Sinnneker H, Webster R G.: Influenza viruses subtypes in aquatic birds of eastern Germany. Arch Virol 1994, 135: 101-114.
16. Manvell R J, McKinney P, Wernery U, Frost K.: Isolation of a highly pathogenic influenza A virus of subtype H7N3 from a peregrine falcon (*Falco peregrinus*). Av Pathol 2000, 29: 635-637.